

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences biologiques et sciences
agronomiques
Département BMC



Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Master
En Biotechnologies

Biotechnologies et valorisation des plantes

Thème :

*Evaluation de l'activité
antifongique des extraits
d'Asphodelus microcarpus*

Encadré par :

D^r OUSSAID.S

Présenté par:

ALLAB Lamia

Présenté devant le jury composé de :

Président : P^r HAOUALI K.

Professeur à l'UMMTO

Promotrice : D^r OUSSAID S. Maitre de conférences à l'UMMTO

Examinatrice : M^{me} HELLAL Z.

Maitre assistante UMMTO

Examineur : M^r SEBANE H.

Maitre assistante UMMTO

2018-2019

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma promotrice Dr OUSSAID Saliha pour avoir accepté de m'encadrer, pour son soutien inconditionnel et pour les conseils qu'elle m'a accordés durant toutes les étapes de ce travail. Puisse-t-elle trouver ici mes expressions de gratitude.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur HOUALI Karim d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je remercie également Mme HELLAL Zohra et Mr SEBANE Hilal d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Docteur Ben Sidhoum, pour avoir identifiée la plante étudiée.

Mes sincères remerciements pour les membres des laboratoires pédagogiques (microbiologie et analyses physicochimiques) pour leur disponibilité et leur précieuse assistance

Je remercie vivement tous les enseignants que j'ai croisés durant mon cursus de formation, qu'ils retrouvent à travers ce mémoire le résultat de leur travail incommensurable. Toutes mes expressions de respect !

Mes sentiments de gratitude vont également à l'encontre de toute personne ayant participé de près ou loin à la concrétisation de mon modeste travail.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction 01

Première partie : Partie bibliographique

Chapitre 1 : Données générales sur *Asphodelus microcarpus*

I. Généralités sur l' <i>asphodelus microcarpus</i>	02
I.1. Taxonomie	02
I.2. Répartition géographique.....	03
I.3. Description botanique	03
I.4. composition chimique	04
I.5. Utilisation	04
I.6. Aspects Pharmacologiques	04

Chapitre 2 : Composés phénoliques

II. Les composés phénoliques	05
II.1. Classification des composés phénoliques	05
II.1.1. Les Phénols simples	06
II.1.2. Les coumarines	07
II.1.3. Stilbènes	08
II.1.4. Les flavonoïdes	08
II.1.5. Les tannins	10
II.1.6. Les lignines ou lignanes	12
II.2. Localisation des polyphénols dans la plante	12

Chapitre 3 : activité antioxydante et antifongique des polyphénols

III.1. Activité antioxydante	13
III.1.1. Stress oxydant	13
III.1.2. Espèces réactives et radicaux libres	13
III. 1.3. Les antioxydants	14
III. 1. 4. Pouvoir antioxydant des polyphénols	14

III. 2. Activité antifongique	15
III. 2. 1. Infections fongiques humaines	15
III. 2. 2. Traitement des infections fongiques	16
III.2.3. Place des polyphénols dans la lutte contre les champignons	16

Deuxième partie : Partie expérimentale

II : Matériels et Méthodes	18
II. 1. Matériel végétal	18
II.1. 1. Préparation des échantillons	18
II.2. Optimisation d'extraction des composés phénoliques	18
II. 2. 1. Dosage des polyphénols totaux	20
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	20
II.3. Evaluation de l'activité antioxydante	21
II.3.1. Test au phosphomolybdate	21
II.3.2. Activité scavenger du test de DPPH	21
II.4. Détermination de l'activité antifongique	22

III : Résultat et Discussion

III. 1. Effet des paramètres individuels	23
III.1. 1. Teneur en polyphénols totaux	23
III. 1. 2. Teneur en flavonoïdes	24
III. 2. Effet de la combinaison des solvants	25
III.2.1. Effet sur la teneur en polyphénols totaux	25
III.2.2. Effet sur la teneur en flavonoïdes	26
III.3. Activité antioxydante	27
III. 3. 1. Test au phosphomolybdate	27
III.3.2. Activité scavenger du DPPH	29

III. 4. Activité antifongique	30
III. 4. 1. Activité anti-<i>Candida albicans</i>	30
III. 4. 2. Activité anti- <i>Fusarium</i>sp et<i>Trichophyton rubrum</i>	31
<i>Conclusion</i>	33
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexe</i>	

Liste de figures

Figure 01 : Photographie d' <i>Asphodelus microcarpus</i>	02
Figure 02 : Photographie des différentes parties d' <i>A. microcarpus</i>	03
Figure 03 : Structure du groupement phénolique	05
Figure 04 : Structure de base d'Acide benzoïque (a) et acide cinnamique (b).	07
Figure 05: Structure d'une molécule de coumarine.	07
Figure 06: Structure chimique de stilbène.	08
Figure 07: Structure de base des flavonoïdes.	09
Figure 08: Origine biogénétique des flavonoides (C6-C3-C6)	09
Figure 09: Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique.	11
Figure 10 : Structure de quelques proanthocyanidines (TCs).	11
Figure 11 : Préparation de l'échantillon de l' <i>Asphodelus microcarpus</i>	19
Figure 12 : évaluation de l'activité de l'extrait n°6 sur la souche de <i>Trichophyton rubrum</i>	22
Figure 13 : Teneur en composés phénoliques en fonction du solvant	23
Figure 14 : Teneur en flavonoïdes des extraits phénoliques	24
Figure 15 : Teneurs en polyphénols dans les extraits obtenus avec différents mélanges de solvants	25
Figure 16 : Teneurs en flavonoides dans les extraits obtenus avec différents mélanges de solvants	26
Figure 17 : Mesure de l'activité antioxydante des différents extraits phénoliques	28
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH dans les extraits éthanolique (a), aqueux (b), extrait optimisé (c) et acide ascorbique (d).	29
Figure19 : Activité de l'extrait phénolique d' <i>A. Microcarpus</i> vis-à- vis de <i>Candida albicans</i>	30
Figure 20 : Activité de l'extrait phénolique d' <i>A. Microcarpus</i> vis-à- vis de <i>Fusarium sp</i>	31
Figure 21 : Activité de l'extrait phénolique d' <i>A. Microcarpus</i> vis-à- vis de <i>Trichophyton rubrum</i>	32

Liste des tableaux

Tableau I : Les principales classes de composés phénoliques	06
Tableau 2 : extraction des polyphénols par combinaison des solvants.....	20
Tableau 3: diamètres de croissances des souches fongiques	31

Liste des abréviations

CPs : composés phénoliques

THs : tannins hydrolysables

TCs : tannins condensés

DPPH : 2.2 diphenyl 1 picryle hydrazyl

DO : La densité optique

IC50 : concentration inhibitrice médiane

Résumé

Asphdeslusmicrocarpus est une plante médicinale appartenant à la famille des Liliacées, connue sous le nom de « Barouag » ou « Ighri ». Les extraits organiques et aqueux ont été obtenus par macération à des temps différents, en utilisant trois solvants: l'eau distillée, l'acétone et l'éthanol. Dans l'objectif d'optimiser le solvant extracteur, des combinaisons de solvants ont été élaborées et la teneur de leurs produits en polyphénols et flavonoïdes a été mesurée. L'optimisation de l'extraction a permis d'améliorer significativement les teneurs en polyphénols (4.96 mg EAG/ g MS) et en flavonoïdes (8557 µgEQ/gMS) mesurées dans les extraits au solvant combinés, en comparaison aux solvants absolus. L'extrait éthanolique a donné une meilleure inhibition du radical DPPH ($IC_{50} = 15 \mu g / mL$), alors que l'extrait de la combinaison acétone/éthanol a permis une meilleure activité antioxydante, évaluée par le test de test molybdate d'ammonium. L'activité antifongique a été déterminée sur trois souches fongiques : *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* et *Fusarium sp.* L'extrait optimisé a été ajouté en concentrations de 1%, 2%, 5% et 10% au milieu de culture et le champignon à tester, inoculé dans un puits central. À partir de 5%, l'extrait s'est avéré inhibiteur de la croissance des champignons *Trichophyton rubrum* et *Fusarium sp.* Pour la levure *Candida albicans*, il semble que l'extrait ait des propriétés à limiter la propagation des colonies dans le Pétri.

Mots clés : *Asphdeslusmicrocarpus*, Polyphénols, optimisation, activité antioxydante, activité antifongique.

Abstract

Asphdeslusmicrocarpus is a medicinal plant belonging to the Liliaceae family, known as "Barouag" or "Ighri". The organic and aqueous extracts were obtained by maceration at different times, using three solvents: distilled water, acetone and ethanol. In order to optimize the extraction solvent, solvent combinations have been developed and the content of their products in polyphenols and flavonoids has been measured. The optimization of the extraction significantly improved the polyphenol (4.96 mg EAG / g MS) and flavonoid (8557 µg EQ / g MS) levels measured in extracts of combined solvent, compared to absolute solvents. The ethanol extract gave a better inhibition of the radical DPPH ($IC_{50} = 15 \mu\text{g} / \text{mL}$), whereas the extract of the acetone / ethanol combination allowed a better antioxidant activity, evaluated by the ammonium molybdate test. Antifungal activity was determined on three fungal strains: *Candida albicans*, *Trichophytonrubrum* and *Fusarium sp.* The optimized extract was added in concentrations of 1%, 2%, 5% and 10% to the culture medium and the test fungus inoculated in a central well. At 5%, the extract was found to inhibit the growth of *Trichophytonrubrum* and *Fusarium sp.* For yeast *Candida albicans*, it appears that the extract has properties to limit the spread of colonies in Petri.

Key words: *Asphdeslusmicrocarpus*, Polyphenols, optimization, antioxidant activity, antifungal activity.

Introduction générale

Introduction générale

A côté des métabolites primaires, les végétaux accumulent des métabolites dits secondaires dont l'absence n'est pas létale, mais ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent (**Bruneton, 1993 ; Krief, 2003**). Par ailleurs, les métabolites secondaires sont des molécules bioactives exploitables dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Jeaun *et al.*, 2005**).

Les composés phénoliques extraits de plantes connaissent un grand intérêt pour leurs propriétés biologiques, entre-autres, les activités antioxydantes et antimicrobiennes. Ces principes actifs constituent, donc, une alternative prometteuse aux substances chimiques et aux agents antibactériens et antifongiques synthétiques dont l'utilisation excessive a engendré le phénomène de résistance.

Le continent africain est doté d'une biodiversité importante et l'Algérie qui s'y situe possède une flore considérable qui comporte un très grand nombre d'espèces, cependant cette richesse reste peu explorée.

Ce présent travail vise à valoriser la plante *Asphodelus microcarpus*. Il s'agit d'une plante endémique du bassin méditerranéen, et est réputée pour son usage en médecine traditionnelle contre toutes les formes d'abcès (Baba Aissa, 1991) et pour traiter les infections fongiques (Zellagui, 1998).

Ce travail est subdivisé en deux parties : la première est une revue bibliographique portant sur la plante *Asphodelus Microcarpus*, les infections fongiques, les composés phénoliques et leur rôles comme agents antioxydants et antifongiques naturels et la deuxième partie porte sur le travail expérimental. Ce dernier consiste en l'optimisation de l'extraction des polyphénols et flavonoides à partir des racines d'*A. Microcarpus* ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes et antifongique de la plante.

Première partie
Partie bibliographique

I. Généralités sur *Asphodelusmicrocarpus*

Asphodèle (**figure1**) est une plante médicinale, vivace, appartient à un genre d'environ 20 espèces. Elle est caractérisée par une tolérance écologique très large contribuant à sa résistance dans des écosystèmes perturbés et fragilisés(Bouazza. et al 2001).



Figure 01 : Photographie d'*Asphodelusmicrocarpus*

I.1. Taxonomie

D'après **GHILEB.(1987)**, *A. microcarpus* a été classée comme suit :

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Monocotylédones

Ordre : Lileflorae

Famille : Liliaceae

Genre : *Asphodelus*

Espèce : *Asphodelusmicrocaptus*

Nom commun : *Asphodele*

Noms vernaculaires :

Barouag (dans l'est Algérien)

Balouaz (dans le centre Algérien)

Ighri (Chez les berbères)

I.2. Répartition Géographique

A. microcarpus est une plante endémique du bassin méditerranéen, poussant sur les terrains pauvres et moyennement arrosés, dans les régions sableuses et rocailleuses des forêts du Nord de l'Afrique et les hauts plateaux de l'Est Algérien. **MAIRE (1957) & BENISTON (1984).**

I.3. Description botanique

C'est une plante vivace de 1 mètre de hauteur environ. Les feuilles sont longues (50 à 60 cm) et étroites (1 à 4 cm), creusées en gouttière triangulaire et groupées en rosettes à la base de la tige.

Les fruits sont sous forme de petites capsules, un peu rétrécies à la base à valves minces. Les racines sont fortement renflées en forme de navets. **FOURNIER P. (1947).** Fleurs en pédicellées étoile de 2 cm de diamètre, avec 6 tépales striés en partie centrale et 6 étamines longues, saillantes à anthères jaunâtre, bractée membraneuse. La **figure 02** montre les différentes parties de la plante.



Figure 02 : Photographie des différentes parties d' *A. microcarpus*

I.4. Composition chimique

D'après **FOURNIER P. (1947)**, les racines tuberculeuses de l'Asphodèle contiennent des Alcaloïdes tels que choline et Stachydrin, des Anthraquinones principalement de l'Asphodeline, des Mucilages des Lipides. Elles contiennent des glucides, à savoir le ructose et le glucose. Les feuilles de la plante sont riches en glucosides, quant aux graines, elles sont riches en stérols, lipides et en glucides.

I.5. Utilisation

Les racines, sous forme de tubercules, sont les plus utilisées pour le suc qu'elles contiennent. Les tubercules sont aussi utilisés dans l'alimentation du bétail sous forme crue ou dans l'alimentation humaine après ébullition dans l'eau salée pour éliminer leur âcreté naturelle. **FOURNIER P. (1947)**. Ces mêmes tubercules sont utilisés aussi en alimentation du poulet.

En industrie, la plante entière est utilisée dans la fabrication de la colle et aussi de l'alcool éthylique puisque l'extrait des tubercules donne après fermentation de l'alcool presque pur. **LEYLE (1954)**.

I.6. Aspects Pharmacologiques

L'Asphodèle est une plante importante dans la pharmacopée traditionnelle. **FOURNIER P. (1947)**. En effet, au Maroc, la décoction des racines est utilisée contre toutes les formes d'abcès et la décoction de feuilles en cataplasmes contre les rhumatismes, **BABA AISSA (1991)**.

En Inde, **KOTB (1983)** rapporte que l'Asphodèle est utilisé pour traiter l'ulcère gastrique chez l'homme en lui faisant absorber la poudre de la plante séchée dans un verre de lait.

En Algérie, les racines fraîches de l'Asphodèle, macérées dans de l'huile, servent à traiter les otites. La poudre sèche de ces racines est utilisée en cataplasmes dans les douleurs des rhumatismes.

Mélangée avec l'orge, la poudre d'Asphodèle est conseillée comme diurétique, alors que la propriété curative la plus certaine et confirmée scientifiquement est l'utilisation du suc de la racine de l'Asphodèle dans le traitement des mycoses cutanées. **GHILEB (1987)**.

II. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (CPs), dénommés aussi polyphénols, sont des molécules naturelles très largement répandues dans le règne végétal. Leurs répartitions qualitative et quantitative varient selon les espèces, les organes de la plante et les différents stades physiologiques. **ROBARDS K et al., (1999)**. Les CPS sont qualifiés de métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de la plante, comme la croissance ou la reproduction. Des études ont cependant révélé leur rôle dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

II.1. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques correspondent à une très large gamme de structure chimique **BRUNETON J(1999)**, dont plus de 8000 ont été identifiées **WAKSMUNDZKA-HAJNOS M (2011)**, allant de simples molécules à des substances hautement polymérisées. L'élément structural fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un groupement phénolique (**Figure 03**), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside. **BRUNETON J (1999)**

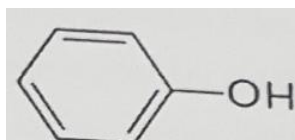


Figure 03 : Structure du groupement phénolique

En fonction de la complexité du squelette de base, les CPs sont répartis en différentes classes allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées. Ensuite ils sont classés en fonction du degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...) ou par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des CPs) **CROZIER et al., (2008)**

Partie bibliographique

Le tableau 0I regroupe les principales classes des CPs

Tableau I : Les principales classes de composés phénoliques **CROZIER et al., (2008)**

squelette Carboné		Classe	Principaux composés	Source principale
C6		Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
Acides Phénoliques	C6-C1	Acides Hydroxybenzoïques	P-Hydroxybenzoïque acide gallique	Epices, fraises, feuilles de thé.
		Acides Hydroxybenzoïques	Acide caféique (acide chlorogénique), acide férulique	Pomme de terre, pomme, café, artichaut, carotte, blé, riz.
	C6-C3			
		Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus.
C6-C2-C6		Stilbènes	Resvératrol	Vigne, vin, soja, arachides.
C6-C3-C6 / Flavonoides		* Flavonols	Kamphérols, quercétine	Oignon, brocoli.
		* Flavones	Apigénine, luéoline	Persil, céleri, olive, poivron rouge.
		* Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs et fruits rouges, aubergines, raisins.
		* Flavanols	Catéchine, épictéchine	Pomme,raisins, abricots, chocolat, thé vert.
		* Flavanones	Naringénine	Citrus (agrumes).
		* Isoflavonols	Daidzéine, génistéine	Soja et produits dérivés.
		* Chalcones		Pomme.
(C6-C3)n		Lignines	Lignane (C6-C3-C3-C6)	Bois, noyau de fruits, pin.
(C15)n		Tanins	Polyphénols de HPM	Raisin rouge, kaki, thé.

II.1.1. Les phénols simples : Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6.

Les Acides phénoliques : Ces composés sont dérivés de deux sous-groupes distingués : les acides Hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïque, et sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles, médicinales et chez toutes les céréales. **LARAOUI.H. (2007).**

Les acides hydroxybenzoïque : Ce sont des phénols simples ayant une structure générale de base de type (C6-C1) (**Fig. 3.a**). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides **HARRAR A.E.N. (2012)** et dont les acides les plus répandus sont : l'acide salicylique et l'acide gallique **BRUNETON J. (1999).**

Les acides hydroxycinnamiques : Ce sont les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique, dont la structure de base est de type C6-C3 (**Fig. 04**). Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique qui est naturellement présent dans toutes les plantes, intervenant dans la synthèse de la lignine (molécule formant les parois des, est identifié dans les grains d'orge, maïs, mils, avoine, seigle, blé, riz.

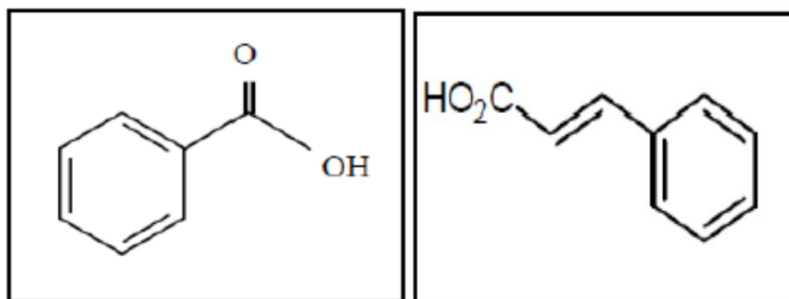


Figure 04 : Structure de base d'Acide benzoïque (a) et acide cinnamique (b).GORHAM J. (1977)

II.1.2. Les coumarines

Les coumarines (**Fig. 04**) tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine, d'où fut isolée en 1982. **BRUNETON J. (1993)** . Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone. **FORD.R.A et al., (2001)**.

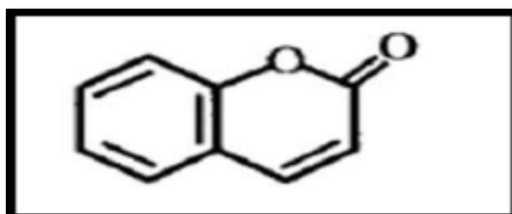


Figure 05: Structure d'une molécule de coumarine. COWAN N. M. (1999).

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des

algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines **GUIGNARD J.L. (1998)**. Les familles les plus riches en coumarines sont les Légumineuse, Rutacées, Apiécées et Thymeleacées.

II.1.3. Stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, (**Fig. 05**). Le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes oxydase et les peroxydases **PERRET C.(2001)**.

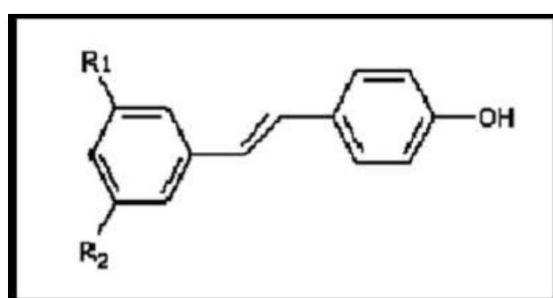


Figure 06: Structure chimique de stilbène **PERRET.C.(2001)**.

II.1.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal **GHEDIRA.K. (2005)**. Le squelette de base est à 15 atomes de carbone et constitué de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (**Fig. 06**) **BRUNETON.J. (1999)**.

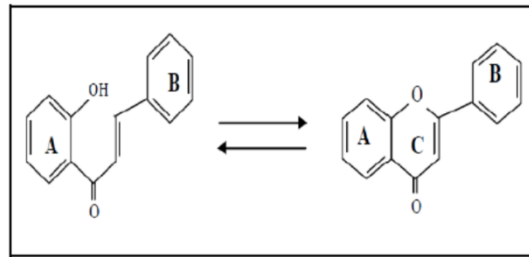


Figure 07: Structure de base des flavonoïdes. SARAF.S et al. (2007).

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes de flavonoïdes (les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, et les anthocyanidines). Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoïdes. Ces substitutions peuvent impliquer L'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation. **BALASUNDRAM.N (2006)**. La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun résumée la **figure 07**.

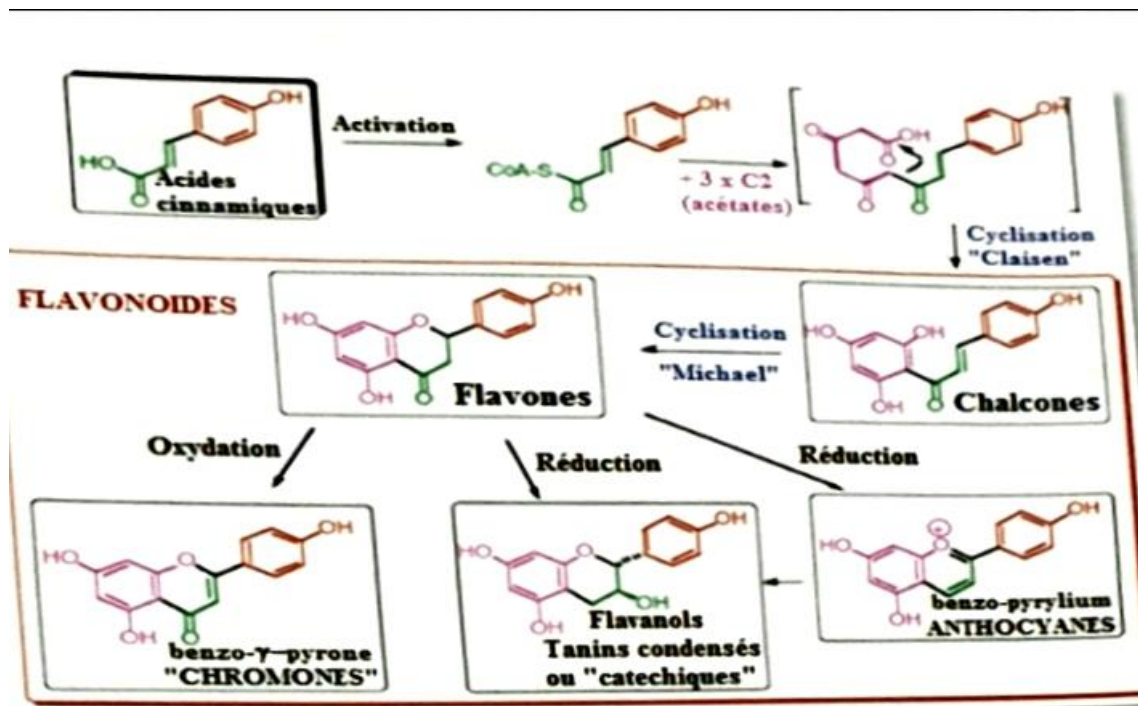


Figure 08: origine biogénétique des flavonoides (C6-C3-C6)

Propriétés physicochimiques

Les flavonoïdes sont des composés solides, cristallisés, d'un jaune plus au moins intense. Ils sont solubles dans les solutions alcalines donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.

Les génines sont solubles pour la plupart dans les solvants organiques peu polaires **BRUNETON.J. (1999)**, alors que les hétérosides sont solubles dans l'eau, les alcools et les solvants organiques polaires (la rutine a une hydrosolubilité plus faible), et insolubles dans les solvants organiques apolaires.

Biodisponibilité

La qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif. L'absorption des flavonoïdes provenant de l'alimentation est faible. Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour permettre leur absorption au niveau du colon. Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites glucuro- et sulfo conjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale. **MILANE.H (2004)**.

II.1.5. Les tannins

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

-Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, associés à des molécules d'acide-phénol **MUELLER-HARVEY et al.(1992)**.. Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol en tannins galliques possédant un acide gallique et en tannins éllagiques ont un acide hexahydroxyphénique. **HAGERMAN. (2002)**.

Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acideset alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannasse) pour donner des glucides et desacides phénoliques. **LEINMULLER et al. (1991)**. Ces hétéropolymères sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation

sont absorbés. Ils peuvent être responsables d'intoxication, lors d'ingestion trop massive, et provoquent des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les moutons **ZHU et al. (1992)**.

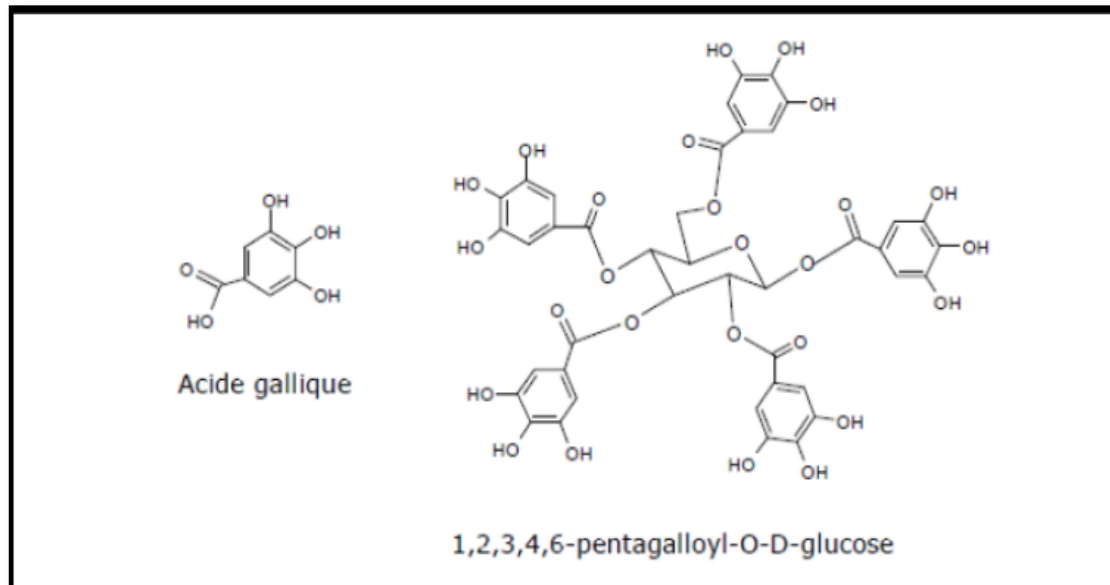


Figure 09: Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique. **BRUNET (2008)**.

- Tanins condensés

Les tannins condensés (TCs), ou proanthocyanidols, sont chimiquement définis comme étant des oligomères ou des polymères d'unités de flavanoïdes (Fig 09). L'unité de base (ou monomère) des TCs est un flavan-3-ol (catéchine), liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-O-C (type A) **MUELLER-HARVEY et al.(1992)**.

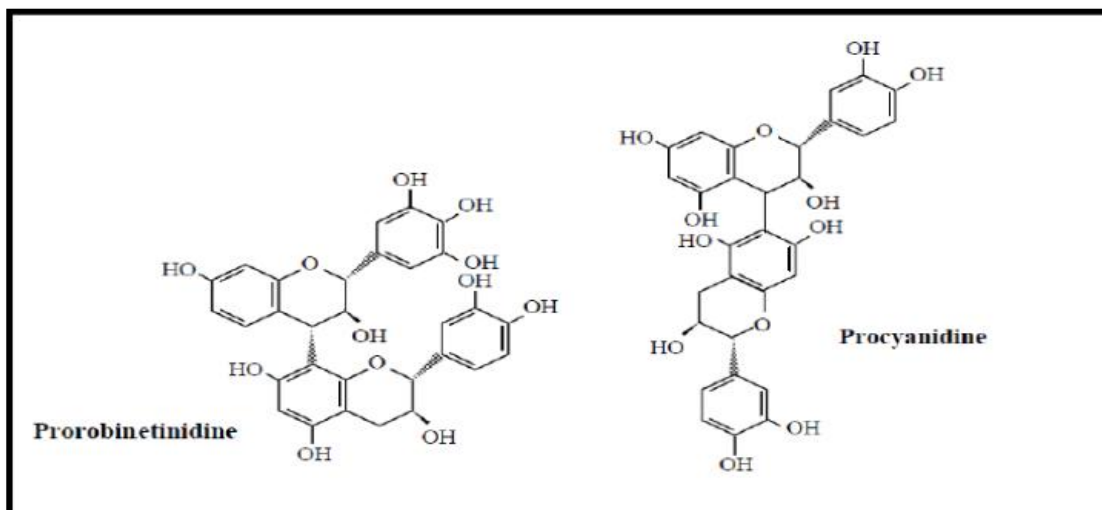


Figure 10 : Structure de quelques proanthocyanidines (TCs). **AKROUM (2011)**.

II.1.6. Les lignines ou lignanes

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936. Les lignanes sont les dimères des unités de phenylpropane (C₆ C₄) **BENAROUS. (2009)**. La distribution botanique des lignanes est large. Plusieurs centaines des composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les gymnospermes, ils sont surtout rencontrés dans les bois alors que chez les Angiospermes, ils ont été identifiés dans tous les tissus et dans toutes les parties des plantes (les racines, les feuilles, les fruits et les graines). **MIDOUN. (2011)**. Au niveau des végétaux, ils forment une barrière mécanique, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi et participent à la résistance aux microorganismes et aux herbivores. De plus, la lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure. **MURRY et al., (1982)**.

II.2. Localisation des polyphénols dans la plante

Le niveau d'accumulation des CPS dans les différents tissus et organes de la plante apparaît toujours comme la résultante entre leur biosynthèse et leur utilisation et/ou leur dégradation. Certains de ces composés peuvent se déplacer dans la plante, mais cet éventuel transport ne concerne pas la plupart des molécules phénoliques comme cela a été montré récemment dans le cas des flavonoïdes dont la synthèse et accumulation ont lieu dans les mêmes cellules. **Sarni-Manchado P & Cheynier V (2005)**.

À l'échelle cellulaire, les CPs synthétisés dans le cytosol s'accumulent principalement dans deux sites : La vacuole où sont stockées les molécules solubles (acide chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tanins...), conjugués avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Ils sont aussi localisés au niveau de la paroi cellulaire où sont présents les lignines comme l'acide férulique. Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique, mais toujours à très faible concentration. **Sarni-Manchado P & Cheynier V (2005)**.

À l'échelle tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique et très variable. **Macheix JJ et al., (2005)**. En effet, les anthocyanes et les flavonoïdes sont généralement présents dans l'épiderme des feuilles et des fruits, alors que certains fruits comme les fraises ou les cassis montrent cependant une accumulation des anthocyanes dans les tissus profonds.

Au niveau de la plante entière, certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Des différences très marquées existent également entre les différents organes d'une plante donnée, chacun d'entre eux (feuilles, fruits, graines, racines...) pouvant souvent être caractérisé par son profil polyphénolique. Ainsi, bien que l'accumulation des CPS soit fréquente dans les parties souterraines de la plante (les tubercules et les racines), certains phénols y sont cependant absents et sont au contraire caractéristiques des organes développés en pleine lumière, c'est le cas des hétérosides de flavonols (dérivés de la quercétine et du kaempférol...) et des anthocyanes des feuilles et des fruits **Sarni-Manchado P & Cheynier V (2005)..**

III. Activité antioxydante et antifongique des polyphénols

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est la résultante du déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), engendrant des dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

A l'état physiologique normal, l'oxygène produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO)) ayant pour but la défendre l'organisme contre des agents pathogènes. Ces molécules possèdent des propriétés oxydantes et réagissent des substrats biologiques, à savoir les lipides, les protéines, l'ADN... etc.. Au niveau moléculaire, ces ERO peuvent également jouer le rôle de messagers secondaires en activant différents facteurs ou indirectement des gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies.

Cependant, ces molécules ne sont pas des espèces sélectives, ainsi sont incapables de distinguer entre l'agresseur et l'agressé.**Desmier(2016).**

III.1.2. Espèces réactives et radicaux libres

Les radicaux libres constituent la proportion la plus importante des espèces réactives. Un radical libre est un atome ou molécule possédant un ou plusieurs électron(s) célibataire(s) sur sa couche externe, lui conférant une grande instabilité et donc une grande réactivité.

La genèse de ces radicaux libres au sein de l'organisme est une réponse aux facteurs exogènes tel que l'agression par des microorganismes, des métaux lourds, des rayonnements ionisants, des rayons ultra-violet ou encore la fumée de cigarette.**Desmier (2016).**

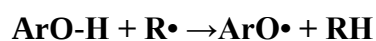
III. 1.3. Les antioxydants

Un antioxydant est par définition une espèce chimique diminuant le stress oxydant au sein. Un antioxydant peut donc soit prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ERO.

Les modes d'action des antioxydants sont divers. Ils peuvent agir comme inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux ou piègeurs de radicaux libres. Les antioxydants sont soit endogènes, sécrétés par l'organisme comme moyen d'autodéfense. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation. Ils sont identifiés dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, vin...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales (**Desmier, 2016**).

III. 1. 4. Pouvoir antioxydant des polyphénols :

De nombreuses études ont mis en évidence le pouvoir antioxydant des polyphénols **Jovanovic S.V. et al (1994)**. Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène, comme l'illustre la réaction suivante :



Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R•). Le radical ArO• ainsi formé sera stabilisé soit par délocalisation des électrons, par un nouveau transfert d'atome d'hydrogène

Les polyphénols sont capables d'interagir avec les métaux de transition, notamment avec le fer et le cuivre et freiner ainsi la réaction de Fenton.

III. 2. Activité antifongique

Les champignons appartiennent au règne Fungi ou Mycota. Ce sont des organismes hétérotrophes. Leur appareil végétatif appelé mycélium peut être unicellulaire dans le cas des levures, ou pluricellulaire dans le cas de champignons filamenteux. Les champignons présentent une reproduction sexuée, asexuée ou éventuellement parasexuée.

III. 2. 1. Infections fongiques humaines

Les infections fongiques représentent un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde. Les mycoses peuvent apparaître sous la forme d'une simple infection superficielle jusqu'à former des lésions systémiques graves (**Hay, et al., 2006**)

Les mycoses cutanées, qui atteignent la couche externe de la peau, sont généralement appelées mycoses inflammatoires ou dermatophytoses. Ces maladies sont cosmopolites et très fréquentes **Pfaller, et al.(2006)**.

Les dermatophytes sont composés des genres *Trichophyton*, *Microsporum*, et *Epidermophyton*. Ces champignons sont kératinophyles et ont une affinité pour les cheveux, les poils, la peau et les ongles. La prévalence des infections unguéales atteint des taux de 10 à 20%, faisant de son agent pathogène principal, *Trichophyton rubrum*, un des champignons infectieux le plus répandu **Aly et al.,(1994)**. La transmission se produit par inoculation traumatique du champignon dans la peau. L'agent pathogène peut rester confiné aux tissus sous-cutanés ou derme, mais certaines souches sont capables de causer des lésions graves, pouvant affecter les muscles et les os.

Les mycoses systémiques ou invasives provoquées par des pathogènes primaires sont des infections graves, car les champignons responsables peuvent se disséminer par les vaisseaux sanguins et lymphatiques de l'hôte, provoquant des blastomycoses, coccidioïdomycoses et histoplasmoses. Les organismes responsables des mycoses systémiques sont intrinsèquement virulents et atteignent les patients sains. L'augmentation du nombre de patients transplantés, de l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs et de la prévalence du SIDA favorisent l'apparition de maladies opportunistes dont les agents infectieux sont des souches habituellement non pathogènes. Les espèces de champignons les plus fréquentes sont *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. **Pinto et al.,(2007)**.

III. 2. 2. Traitement des infections fongiques

Jusqu'à la fin du XIXe siècle, les seuls médicaments disponibles pour le traitement des mycoses superficielles étaient les sels inorganiques comme le permanganate de potassium ou l'arsenic. Au début du XXe siècle, les premiers médicaments antifongiques organiques topiques ont été introduits, comme l'acriflavine, le violet de gentiane, l'acide benzoïque et l'acide acétylsalicylique **Gupta et al.,(2008)**. La difficulté principale dans la découverte de composés antifongiques est due à la ressemblance structurale entre les cellules fongiques et les cellules des mammifères. Cette ressemblance induit que les molécules antifongiques sont généralement toxiques pour les cellules des mammifères **Georgopapadakou, Walsh, T. J., (1996)**.

Les traitements plus spécifiques des infections fongiques ont été découverts au milieu du XXe siècle. La première molécule fut isolée de l'ascomycète *Penicillium griseofulvum* en 1939, la griséofulvine. En 1950 fut isolée la nystatine de l'actinobactérie *Streptomyces noursei* ; et en 1955 l'amphotéricine B de *Streptomyces nodusus* et en 1969 apparurent les azoles tels que le clotrimazole, l'éconazole, l'isoconazole et le tioconazole **Chabasse et al.,(1999)**.

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent agir au niveau de l'enveloppe cellulaire, souvent en altérant son intégrité, mais également en agissant dans le cytoplasme. Ainsi l'acide nucléique, les synthèses protéiques, les microtubules et surtout la voie de synthèse de l'ergostérol, sont les cibles privilégiées des molécules antifongiques disponibles sur le marché **Odds et al.,(2003)**.

III.2.3. Place des polyphénols dans la lutte contre les champignons

Les métabolites secondaires issus des plantes peuvent être de bons agents antifongiques, du fait de leur grande diversité structurale, et de la permanence de l'exposition des végétaux aux attaques fongique. en plus de leurs propriétés antibactériennes, les polyphénols possèdent des propriétés antifongiques en particulier à l'égard des champignons phytopathogènes, et peuvent être pour cette raison considérés comme des métabolites responsables de la défense naturelle des végétaux vis-à-vis des champignons.

Leur acidité relative et le nombre important de groupements hydroxyles semblent être un facteur important dans l'activité antifongique **Arreola-Cortés, et al.,(2007)**. Le rôle des polyphénols dans la perturbation de l'intégrité de la structure membranaire des champignon a

Partie bibliographique

été démontré **Nakayama et al.,(2006)**. L'augmentation de la perméabilité membranaire est due auxgroupements fonctionnels comme les phénols qui réagissent avec les enzymes membranaires **Giordani et Kaloustian, (2006)**.La destruction de la membraneprovoque la fuite du contenu cytoplasmique suivi de la mort de la souche **Fillatre, (2011)**.

Deuxième partie
Partie expérimentale

II. Matériel végétal

II.1. Préparation des échantillons

-Cueillette et identification: La plante *Asphodelus microcarpus* a été récoltée en hiver dans la région de Boubroune (Azazga, Tiziouzu). L'identification de la plante a été réalisée par le Dr Ben Sidhoum M., enseignant chercheur à la Faculté des Sciences Biologie et des Sciences Agronomiques de l'Université de M. Mammeri. (figure A 11)

-Séchage : Les racines ont été séparées du reste de la plante, lavée et rincée à l'eau distillée, puis découpées et séchées à l'air libre jusqu'à stabilité du poids (Figure B, C et D.11).

-Broyage et conservation : Après broyage, le matériel végétal est tamisé et la poudre dont le diamètre est inférieur à 250 μ m est stockée dans des flacons en verre hermétiquement fermés.

Ces différentes étapes sont schématisées par la (figure E et F.11)

II.2. Optimisation d'extraction des composés phénoliques

-Temps d'extraction

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon le protocole de **Oussaid et al. (2017)**. 0.5g de poudre sont macérés dans 25mL de solvant (eau distillée, éthanol 98% ou acétone 98%), sous agitation pendant 1h, 3h ou 3h avec renouvellement de solvant chaque 1h. Pour éviter l'oxydation, les préparations sont couvertes avec de l'aluminium. Les filtrats sont récupérés après centrifugation (9000 tours pendant 20 min).

-Solvant extracteur

Dans l'optique de sélectionner le meilleur solvant extracteur, une série d'extraction a été réalisée selon le tableau ci-dessous :

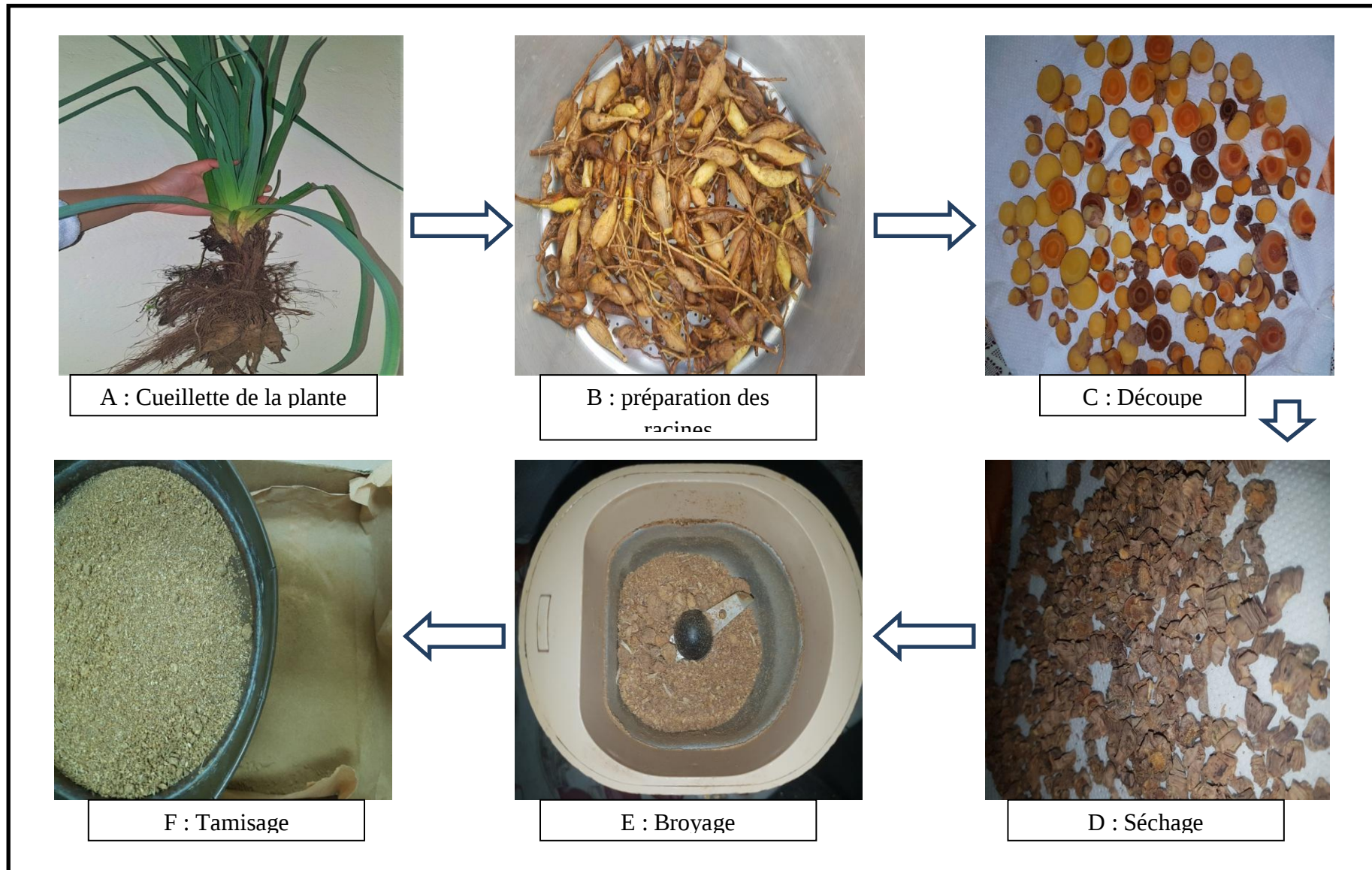


Figure 11 : Préparation de l'échantillon de l'*Asphodelus microcarpus*

Tableau 2 :extraction des polyphénols parcombinaison des solvants

Mix/Solvants	Eau	Acétone	Méthanol
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	½	½	0
5	½	0	½
6	0	½	½
7	1/3	1/3	1/3
8	1/6	1/6	2/3
9	2/3	1/6	1/6
10	1/6	2/3	1/6
11	1/3	1/3	1/3
12	1/3	1/3	1/3

II. 2. 1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols se fait par la méthode du FolinClicolteu qui est un mélange de d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Le réactif de folin, de couleur jaune, est réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange bleu.

Le protocole suivi consiste à mélanger 100 µL de l'extrait et 1 mL de Follinciolteu, dilué à un dixième. 1 mL de bicarbonate de sodium (7.5%) sont ajoutées à la préparation précédente. Après incubation à 50 °C pendant 15 min, les absorbances sont lues à 760nm. L'acide gallique est utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/ g de matière sèche (mg EAG/ g MS).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la plus grande famille des polyphénols, Leur teneur dans les échantillons a été mesurée selon le protocole de **Oussaidet al. (2017)**, 1.5 mL de solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 2%) est ajouté au même volume de chaque extrait et/ ou dilutions quand l'extrait s'avère être intensément riche en flavonoïdes. Après 10 min d'incubation à T° ambiante, la lecture des la densité optique (DO) a été effectuée à 415 nm. La quercetine est utilisée pour établir la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimées en mg équivalent quercetine / g de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante

II.3.1. Test au phosphomolybdate

L'activité antioxydante totale est déterminée par le test de molybdate d'ammonium. Son principe est d'évaluer la capacité de l'extrait phénolique à réduire la MO(VI) en Mo(V) avec la formation, en milieu acide, d'un complexe phosphate/Mo(V) de couleur verte **Bougatef et al.,(2009)**.

300µL de chaque extrait à différentes concentrations ont été ajoutées à 3 mL la solution de molybdate d'ammonium, préalablement préparée avec molybdate d'ammonium à 4 mM, du phosphate de sodium à 28 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 mM. L'acide ascorbique est utilisé comme standard. Après incubation à 95°C pendant 1h 30min, la lecture a été faite au spectrophotomètre à 595 nm **Prieto P. et al., (1999)**

II.3.2. Activité scavenger du test de DPPH

Le test DPPH est basé sur le suivi de la décoloration du composé DPPH• (de couleur violette) lors de sa réduction par un composé antioxydant en acquérant une couleur jaune pâle. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger les radicaux libres. Ce test est réalisé selon le protocole décrit par **Shirwaikar, Shirwaikar, Rajendran, et Punitha, (2006)**. Une quantité de 1 mL de la solution méthanolique de DPPH a été ajoutée au même volume. L'extrait brut optimisé en l'occurrence le n° 6 sur le (tableau 2) à différentes concentrations. Le mélange est incubé à 37°C pendant 20 minutes. Un contrôle est préparé avec 1 mL du solvant utilisé (méthanol) et 1 mL de la solution méthanolique de DPPH. L'absorbance est lue à 517nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en IC₅₀ (Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH)

Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance du contrôle}} \times 100$$

II.4.Détermination de l'activité antifongique

L'activité antifongique de l'extrait optimisé est testée vis-à-vis de deux souches : *Trichophyton Rubrum*, obtenu au centre de transfusion sanguine de Tizi-Ouzou et *Fusariumsp*, obtenu du laboratoire commun de microbiologie (Université de Tizi-Ouzou).

Un trou circulaire de 6 mm de diamètre a été découpé dans la gélose Mueller Hinton (MH) contenant l'extrait phénolique à différentes concentrations (1%, 2%, 5% et 10%). Dans chaque puits, le champignon à tester est déposé. Un témoin positif a été réalisé sur une gélose sans extrait. Le diamètre du champignon a été mesuré après 10 jours d'incubation à 28 °C (figure12).

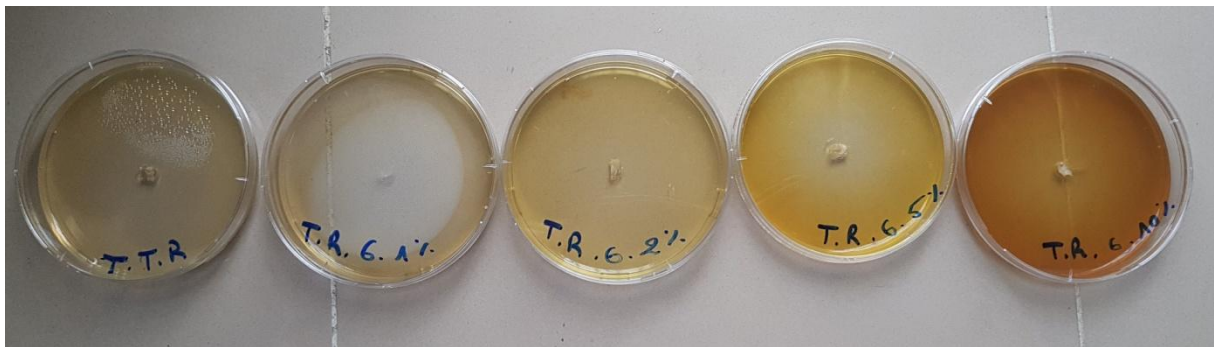


Figure 12 : évaluation de l'activité de l'extrait n°6 sur la souche de *Trichophyton rubrum*.

Résultats et discussion

III. 1. Effet des paramètres individuels

L'objectif de cette partie est de sélectionner le solvant ainsi que la durée d'extraction permettant d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et flavonoides.

III.1. 1. Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Annexe 1), et sont exprimées mg d'équivalent acide gallique (EAG)/g de matière sèche (MS). Les résultats sont dans la (figure 13)

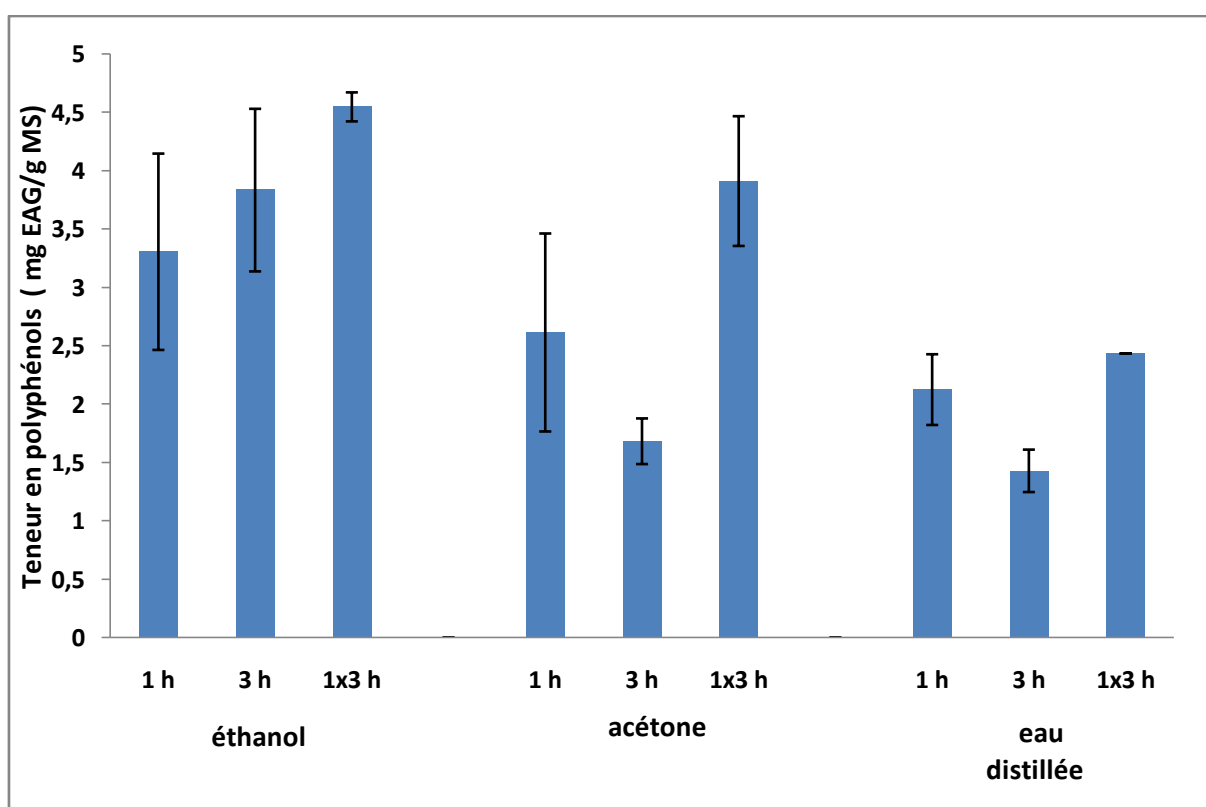


Figure 13 : Teneur en composés phénoliques en fonction du solvant

Quelque soit le solvant utilisé (acétone, éthanol ou eau), l'extraction avec épuisement (3X1h) permet un meilleur rendement. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Oussaid et al. (2016), attestant que le renouvellement de solvant améliore l'efficacité de l'extraction. Par ailleurs, Il s'avère que l'extract éthanolique est le plus riche en polyphénols avec une teneur de 4. 5 mg EAG/ g MS suivi de l'acétone puis l'eau distillée. Plusieurs

Résultats et discussion

études ont porté sur l'effet du solvant sur l'extraction de polyphénols. Brahmi et al. (2015) ont montré que l'éthanol est meilleur que l'acétone et l'eau distillée.

Les valeurs enregistrées dans la présente étude sont significativement inférieures à celles obtenues dans l'extrait méthanolique de la racine d'*A. microcapus* (128 à 230 mg EAG/ g MS) dans l'étude effectuée par Dorman et al. (2003).

III. 1. 2. Teneur en flavonoïdes

Le calcul des concentrations en flavonoïdes est effectué à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (annexe 2). Les meilleurs teneurs en flavonoïdes sont obtenues avec l'eau distillée. Comme dans le cas des polyphénols, l'extraction par épuisement améliore le rendement.

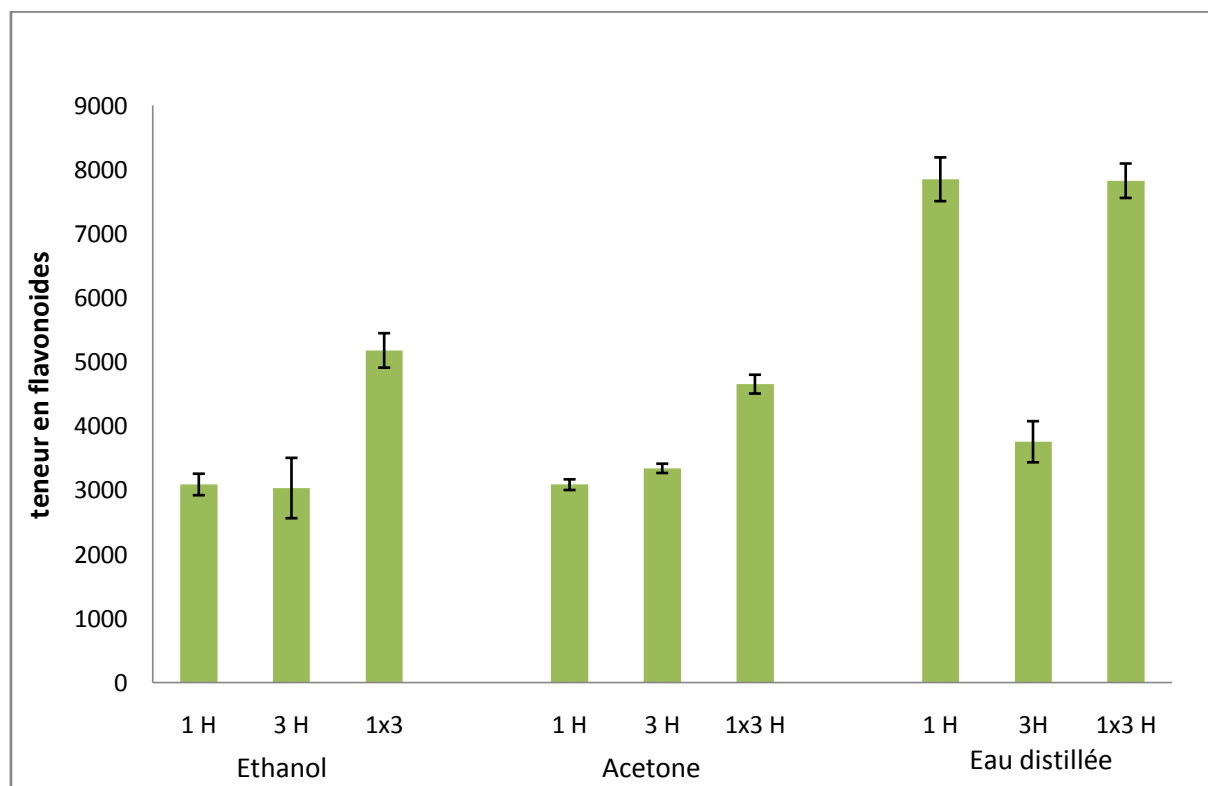


Figure 14 : Teneur en flavonoïdes des extraits phénoliques

D'après la (figure 14), nous constatons que quelque soit le solvant d'extraction, le meilleur temps d'extraction est 3h par épuisement.

III. 2. Effet de la combinaison des solvants

Afin d'affiner les résultats obtenus précédemment et d'améliorer le rendement, il a été question ici de préparer des mix de solvants tout en privilégiant la durée d'extraction 3*1heure qui s'est montrée plus efficace.

II.2.1. Effet sur la teneur en polyphénols totaux

Les résultats du dosage montrent que le mélange (1/2 acétone et 1/2 éthanol) affiche une meilleure teneur (4.96 mg EAG/ g MS). Les combinaisons (1/2 eau et 1/2 éthanol) et (1/2 eau et 1/2 acétone) affichent aussi des concentrations relativement élevées.

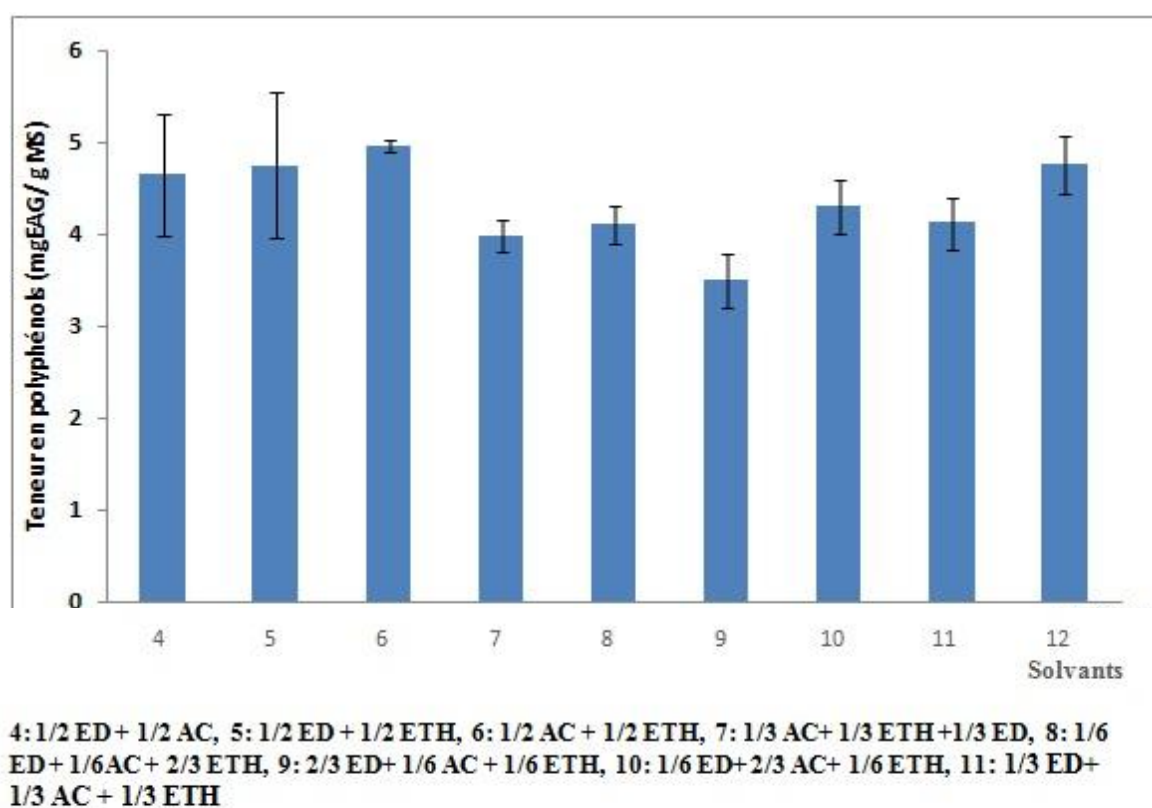


Figure 15 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits obtenus le mélanges de solvants

D'après les résultats obtenus dans la (figure 15) la teneur la plus élevée en polyphénols est enregistrée dans la combinaison n°6.

II.2. Effet sur la teneur en flavonoides

Les résultats montrent que l'optimum (combinaison e) correspondant au produit obtenu du mélange de solvants préparé à partir de (2/3 éthanol, 1/6 acétone, 1/6 eau distillée) avec une valeur de 8557 $\mu\text{gEQ/gMS}$.

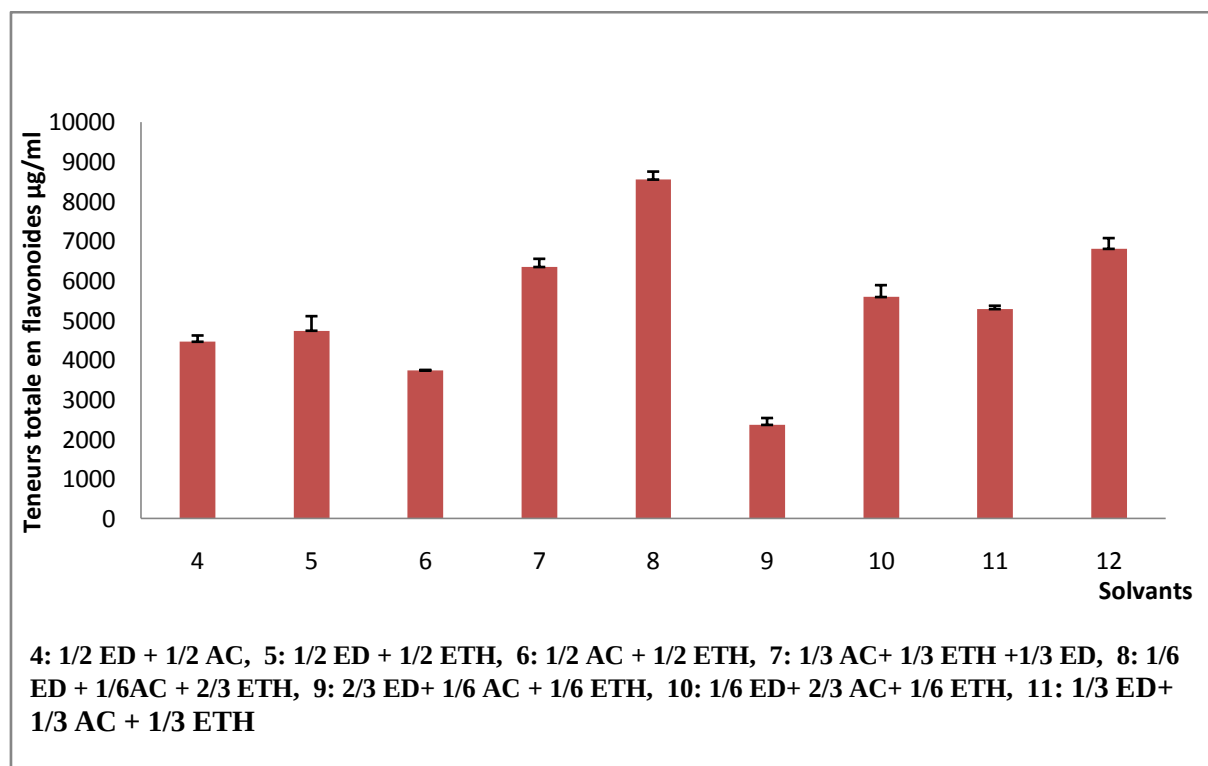


Figure 16 : Teneurs en flavonoides dans les extraits obtenus avec différents mélanges de solvants

Il est à noter que l'extrait correspondant au meilleur rendement en polyphénols donne lieu à un faible rendement en flavonoides, ce qui traduit l'absence de corrélation entre les teneurs en polyphénols et flavonoides dans les extraits. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moussi et al (2015) qui ont constaté une négative corrélation entre les polyphénols totaux, flavonoides et tannins.

II.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été déterminée par deux méthodes : le test au phosphomolybdate et l'activité scavenger du radical DPPH

II. 3. 1. Test au phosphomolybdate

Les extraits obtenus avec les 12 différentes combinaisons ont été soumis au test de l'activité antioxydante totale avec le phosphomolybdate d'ammonium. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes (figure 17), suivant toujours la succession des combinaisons du Tableau (voir section matériel et méthode).

Résultats et discussion

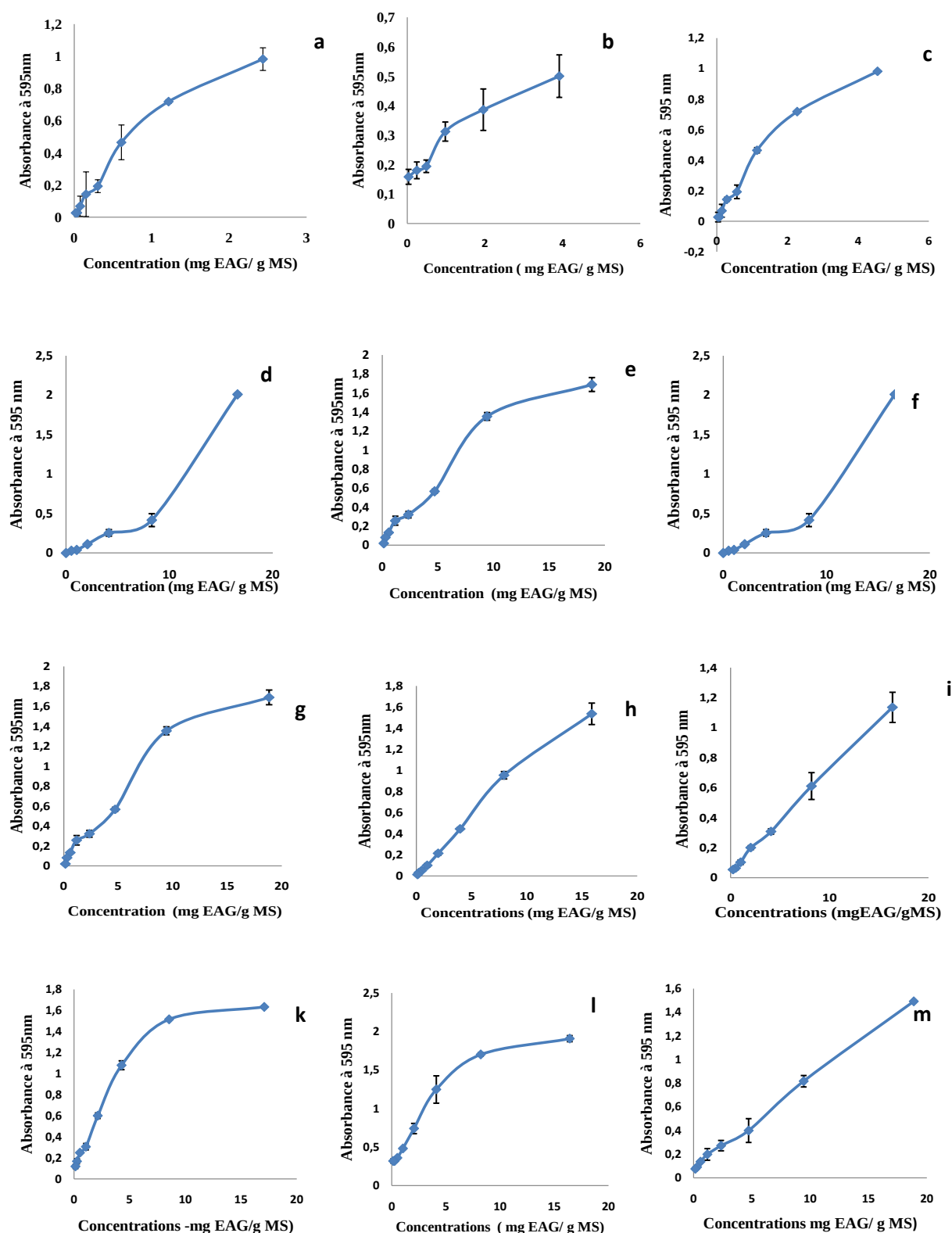


Figure 17 : Mesure de l'activité antioxydante des différents extraits phénoliques

L'activité antioxydante, exprimée en DO, est dose dépendante. Les valeurs les plus élevées sont enregistrées avec l'extrait de la combinaison particulièrement correspondant au mélange (1/2 acétone ,1/2 ethanol).

III.3.2. Activité scavenger du DPPH

L'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonctions des concentrations des extraits éthanolique, aqueux et extrait optimisé sont exprimés dans les courbes de la figure 18.

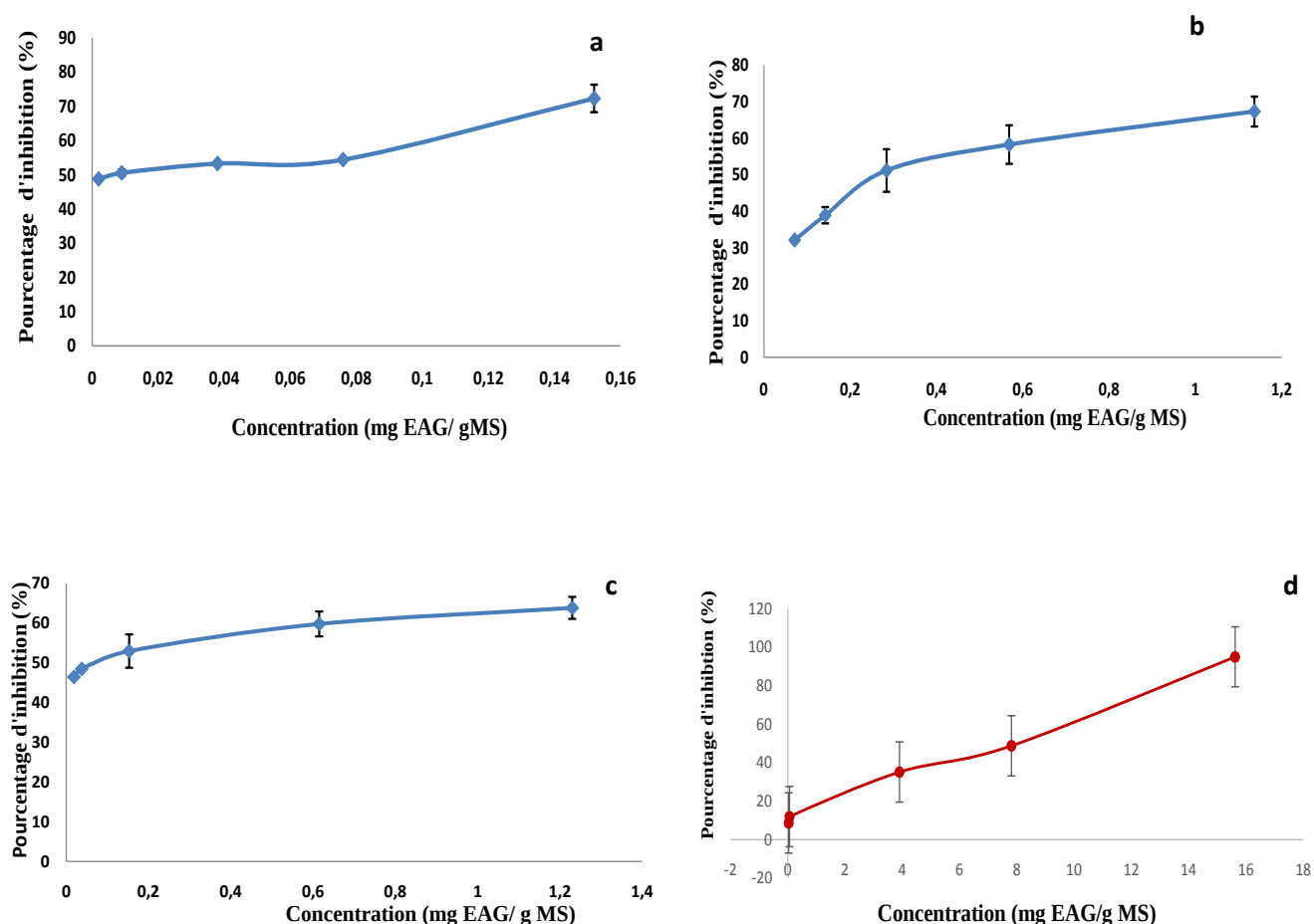


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH dans les extraits éthanolique (a), aqueux (b), extrait optimisé (c) et acide ascorbique (d).

La plus faible valeur en IC₅₀ est obtenue par l'extrait aqueux (IC₅₀ = 15 µg /mL), traduisant la meilleure activité. Toute fois, elle est significativement à la valeur de l'IC₅₀ enregistrée avec l'acide ascorbique (7 µg / mL), utilisé comme témoin. Hosni et al. (2019) ont étudié l'activité antioradicalaire de l'extrait méthanolique des feuilles d'asphodelus et la valeur de IC₅₀ = était de 310 µg / mL.

III. 4. Activité antifongique

Dans l'objectif d'évaluer l'activité antifongique d'*AsphodelusMicrocarpus*, nous avons opté pour l'extrait brut optimisé.

Les souches ciblées sont *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* et *Fusariumsp*. L'activité a été déterminée avec la méthode des puits et l'extrait est ajouté au Milieu Muller Hunton à raison de 1, 2, 5 et 10 %.

Les boîtes de Petri sont incubées à 28 °C. L'absence de croissance de champignons au bout de 10 jours est tenue comme un bon indicateur de l'effet inhibiteur de l'extrait.

III. 4. 1. Activité anti-*Candida albicans*

La lecture est basée sur l'observation et l'appréciation de l'importance et de l'étendue de la pousse de la levure. Une culture témoin, sans extrait, est démarrée le même jour et dans les mêmes conditions. La figure ci-dessous montre que le témoin permet le développement de plusieurs colonies, réparties sur la surface de la gélose. Le milieu contenant l'extrait à 1% et 2% a permis le développement d'amas de colonies. La gélose enrichie avec l'extrait à 10% a permis aussi le développement d'une colonie au centre, d'une taille inférieure. Il est ainsi probable que l'extrait possède un effet fongistatique qui aurait comme principe de limiter la dissémination de ces levures. L'activité antifongique de l'extrait méthanolique de la plante vis-à-vis de *C. albicans* a été mise en évidence par les travaux d'El Ghaly (2017), avec un diamètre de la zone d'inhibition de $13,25 \pm 0.14$ et une CMI de $78\mu\text{g/mL}$.



Figure19 :Activité de l'extrait phénolique d'*A. Microcarpus* vis-à-vis de *Candida albicans*

III. 4. 2. Activité anti- *Fusariumsp* et *Trichophyton rubrum*

Résultats et discussion

Les diamètres des souches fongiques ont été mesurés après 10 jours d'incubation avec les mêmes conditions pour le témoins que pour les cultures contenant l'extrait phénolique. L'effet antifongique est inversement proportionnel au diamètre de la colonie.

Comme le montre la figure 20, la concentration de 1% a permis le développement du *Fusarium* sp.



Figure 20 :Activité de l'extrait phénolique d'*A. Microcarpus* vis-à-vis de *Fusarium*

L'extrait à 2% à son tour a permis le développement du champignon avec un diamètre inférieur (tableau 3) et très faible à concentration de 5%.

Tableau 3:diamètres de croissances des souches fongiques

Souche/% d'extrait	T	1%	2%	5%	10%
<i>T. rubrum</i>	30 mm	27 mm	20 mm	09 mm	06 mm
<i>Fusarium</i>	13 mm	13 mm	07 mm	06 mm	03mm

Quand l'extrait est utilisé à la concentration de 10 % (V/V), il induit une inhibition totale de *Fusarium*. A partir de là, nous pouvons déduire que l'extrait végétal à 10% aurait un effet fongicide sur le champignon *Fusarium* sp.

Résultats et discussion

En analysant la figure ci-dessous, nous remarquons clairement que l'évolution du champignon *Trichophyton rubrum* est inversement proportionnelle à la concentration de l'extrait végétal dans le milieu de culture.

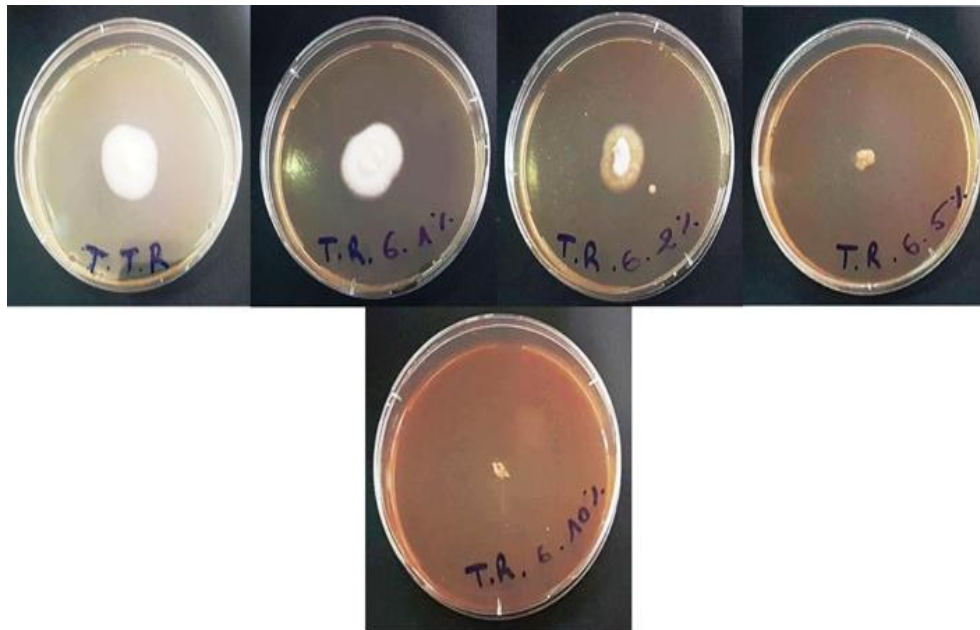


Figure 21 :Activité de l'extrait phénolique d'*A. Microcarpus*vis-à- vis de *Trichophyton rubrum*

Ainsi, en démarrant d'une colonie relativement importante au niveau du témoin et de la boîte à 1% d'extrait, on va jusqu'à absence de développement du champignon à 10% d'extrait. Alors, tout comme pour *Fusarium*, on pourrait supposer que l'extrait végétal à 10% est fongicide.

D'après la littérature, l'Asphadele est une plante très efficace dans le traitement des dermatose et mycose(**Ghileb 1987 ; Baba Aissa, 1991 ; Zellagui, 1998**). Cette propriété, d'après les renseignements recueillis auprès des guérisseurs est incontestable. Une étude récente menée par **El Ghaly (2017)**a révélé la capacité de la plante à inhiber la croissance d'*Aspergillus niger*.

Conclusion

Conclusion

L'exploitation du potentiel biologique des espèces végétales revêt un intérêt important, ainsi les nouvelles démarches consistent à rechercher les principes actifs des plantes.

Le présent travail est porté sur l'étude qualitative et quantitative de la partie sous terraines d' *Asphodelus microcarpus*, choisie sur la base de son usage traditionnel.

La première partie consiste à étudier l'effet des solvants sur l'extraction, et l'optimisation du temps de macération. Les résultats montrent que la meilleure méthode est celle d'extraction avec épuisement (3x1h) combinée avec le meilleur solvant : éthanol pour les polyphénols et eau distillée pour les flavonoides. La meilleure teneur en polyphénols est de 4.5 mg EAG/ g MS.

Dans la deuxième partie, l'activité antioxydante des extraits phénoliques a été testée avec le test au Phosphomolybdate d'ammonium et le test scavenger du radical DPPH. Le a donné optimale activité en utilisant le mélange de solvants (1/2 acétone+ 1/2 éthanol), alors que le deuxième indique que l'extrait aqueux, avec sa plus faible valeur en IC50, exerce la meilleure activité de neutralisation du DPPH.

La dernière partie du travail a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait phénolique optimisé. Une considérable activité a été enregistrée. En effet, à la concentration 10%, l'extrait était capable de limiter la propagation de *candida albicans* et d'empêcher la croissance des champignons *Trichophyton rubrum* et *Fusarium sp.*

Ce travail permet de suggérer que l'éthanol absolu ou combiné à d'autre solvant constitue un excellent extracteur de molécules actives à effet biologique, d'une part, et que l'activité antifongique relativement élevée des extraits de la racine constituerait une bonne piste pour la recherche de molécules thérapeutique, d'autre part.

Enfin, pour ouvrir un champ de perspective nous proposons une suite expérimentale axées sur :

- L'établissement d'un screening photochimique
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices
- Individualisation des tests pour chaque famille de molécules des tests antifongiques
- Mise au point d'un Protocole de test antifongique *in vivo*
- Proposition d'éventuelles préparations galéniques à usage externe (pommades, gels...)

References bibliographies

Références bibliographiques

Balasundram N., Sundram K. and Sammam S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*.99:191-203.

Bruneton J. ; 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.

Bruneton J, Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 3^e éd. Paris : Tec & Doc Lavoisier ; 1999. 1120 p.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed.médicales internationnales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. lavoisier, Paris.

Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 1 janv 2005;81(1):223S-229S.

COWAN N. M., 1999. Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*.Vol. 12(4): 564-582.

Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the human diet. John Wiley & Sons; 2008.387 p.
Cunha, et al;2004.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, Analysis and Their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 21 oct 2010;15(10):7313-52.

Dicko MH, Gruppen H, Traore AS, Voragen AGJ, Berkel WJH van. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnol Mol Biol Rev*. 2006;1(1):20-37.

Dixon R, Paiva N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. Juill 1995;7(7):1085-97.

Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M. (2001). The *in vitro* dermal absorption andmetabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, p39, 153-162.

FOURNIER.P. (1947) Livre des plantes médicinales et veneneuses de France.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, (4): 162-169

Ghileb (1987).

Glombitza, K. W. & Gerstberger, G. (1985). Phytochemistery (Elsevier) p24, 543-551.

Références bibliographiques

GORHAM J., 1977. Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*. Vol. (16):249-253.

Guignard, J.L. (1998). Abrégé de botanique. Masson (Ed). Paris, 212p.

Habauzit V, Horcajada M-N. Phenolic Phytochemicals and bone. *Phytochem Rev*. 1 juill 2008 ;7(2) :313-44.

Habtemariam S. A-glucosidase inhibitory activity of Kaempferol-3-o-rutinoside. *Nat Prod Commun*.févr 2011;6(2):201-3.

Habtemariam S. A-glucosidase inhibitor or enhancer of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells. *J Nat Prod*. 1 aout 1997;60(8):775-8.

Hahn, D. H., Faubion, J.M., and Rooney, L.W. (1983). Sorghom phenolic acids, their hightperformance chromatography separation and their relation to fungal resistance. *Cereal Chem*.60: 255. In: Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. Dykes, L;Roony, W.L. 2007. Texas A&M University. CFW-52-3-0105.

Harrar A.E.N., 2012. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnusalaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie.73 p.

Haslam E. (1994). Natural polyphenols (vegatable tannins): Gallic Acid metabolism *Nat.Prod*. p11, 41-66.

Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society*. 116: 4846-4851.

Laraoui, H. (2007). "Etude Phytchimique L'Extrait Chloroformique de *BupleurumAtlanticum*" Docteur de l'université Louis pasteur (Chimie Organique, UV El Hadj Lakhdar Batna).

Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substancesand hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*. p53, 1990-1995.

Leyle 1954 rapporté par Zellagui 1998.

Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P. Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Cheynier V, Sarni-Manchado P Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : Tec & Doc Lavoisier ; 2005.

Maire 1957 – Beniston 1984, rapporté par Zellagui 1998.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food source and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 5 janv 2004;79(5);727-47.

Milane H. la quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques [internet] [thèse]. Strasbourg : Strasbourg 1 ;2004 [cité 1 juin 2017]. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2004STR13049>.

Références bibliographiques

N. BENABADJI, M. BOUAZZA et A. MAHBOUBI L'impact de l'homme sur la forêt dans la région de Tlemcen (Oranie-Algérie) 2001

PAWLOWSKA AM., DE LEO M., BRACA A. 2006. Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. J. Agric. FoodChem. Vol. 54 (26): 10234-10238.

PERRET C., 2001. Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel. Suisse. 184 p.

Prieto P., Pineda M., et Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex, Specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry. 269: 337-341

Robards K, Prentzel PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruites. Food Chem. Sept 1999;66(4):401-36.

Saraf S., Ashawat S. M. and Saraf s. 2007. Flavonoids: A nutritional protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy reviews*, 1(1).

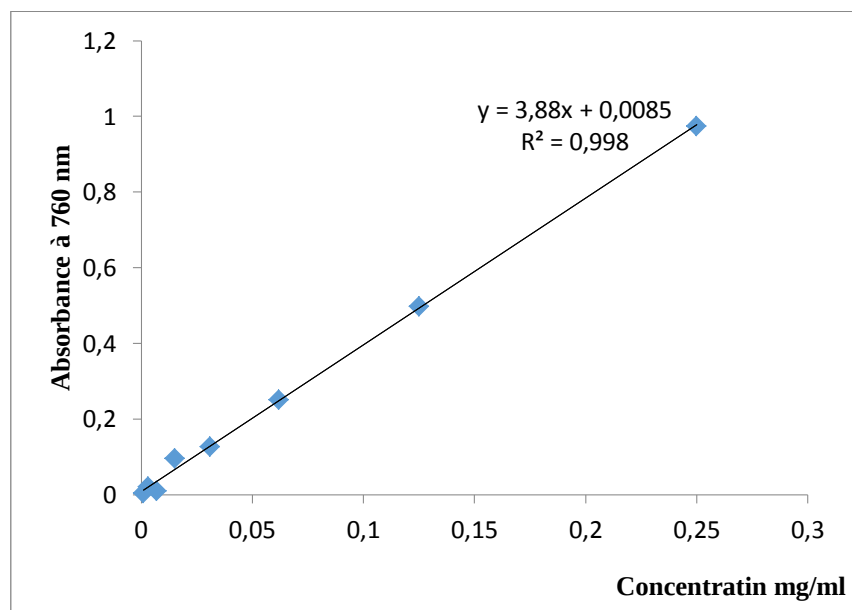
Sarni-Manchado P, Cheynier V, Collectif. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : Tec & Doc Lavoisier ; 2005. 398p.

Smith, D. S.; & Kramer, J. R. (1999). Environment International. p25, 295-306.

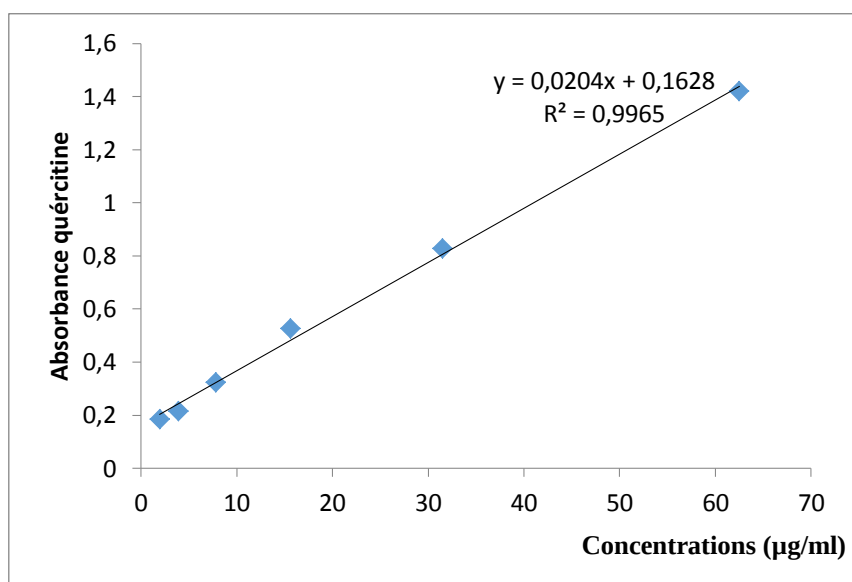
Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease; the potential role of phytochemicals. Cardiovasc Res. 18 août 2000;47(3);419-

Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Chromatogr Sci Ser. 2011;477-87.

Annexes



Annexe I : courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe II : courbe d'étalonnage de Quercetine