

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB -BLIDA-1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



MEMOIRE DE MASTER

**En spécialité : Biotechnologie des Plantes Aromatique et Médicinal et
Produits Naturels**

Intitulé

**Activité antimicrobienne et antioxydant des
composés phénolique des feuilles
de *Polianthes tuberosa* L (Tubéreuse) cultivée.**

Préparé par

YKRELEF Assia

Soutenu publiquement le 30/06/2016 devant le jury composé de :

Mme MOUMENE . S	MCB	USDB 1	Président
Mme HAMICHE A.	MCB	USDB1	Examineur
Mme CHEBATA N.	MAA	USDB1	Promotrice
Mme BARGHOUT N.	Doctorante	USDB 1	Co-promotrice



DEDICACE

Je dédie ce travail :

*A mes chers parents qui ont toujours
cru en moi et me donnant
confiance lorsque la
motivation n'était plus au rendez-
vous. Pour vos encouragements et
vos sacrifices.*

A mes chers frères, mes sœurs,

*A mes chères amies Bernou A et
Bernou A M et Maktofe hînd*

A mes amis d'enfance.

Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, le courage et la volonté d'accomplir ce travail.

*Je tiens à remercier ma promotrice Mme **CHEBATA N.** Professeur à l'Université de Blida pour son attention, sa simplicité, sa sympathie et sa générosité scientifique.*

*Je remercie infiniment Mme **BARGHOUT N.** pour m'avoir consacré le temps nécessaire à la réalisation de ce travail ainsi pour sa gentillesse, Sa disponibilité, ses encouragements et ses précieux conseils.*

*J'adresse mes sincères remerciements à la présidente de jury Mme **MOUMENE S.** qui m'a fait le plaisir de présider ce jury, qu'elle trouve ici mon profond respect.*

*J'adresse aussi mes remerciements et ma reconnaissance à Mme **HAMICHE A.** pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie des plantes aromatique et médicinales à l'USDB pour leur aide

Je remercie toutes personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

A la fin je remercie mes collègues et mes amis pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Résumé

La tubéreuse, *Polianthes tuberosa* L. (Asparagaceae) est une plante médicinale et ornementale, connue dans le monde par ses vertus thérapeutiques et sa culture facile. Cependant, elle est peu connue en Algérie ainsi que ses effets thérapeutiques. Notre objectif est de mettre en valeur la tubéreuse et certains de ses vertus médicinales (les effets antioxydants et antimicrobiens). Les extraits phénoliques obtenus par macération solide-liquide de poudre des feuilles en utilisant le mélange méthanol/eau, suivi par un fractionnement (rinçage) liquide-liquide par des solvants organiques Hexane (Hx) et Dichlorométhane (DCM), où la phase organique de ces solvants est considérée comme les extraits (Ext Hex), (Ext DCM) et l'extrait aqueux (Ext Aq) récupéré par l'Acétate d'éthyle. Le rendement le plus fort est obtenu pour : Extrait DCM (28.64%) et Extrait MeOH (27.04 %) et le rendement le plus faible est obtenu pour l'Extrait Aq (0.814%). La teneur en polyphénol déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu a démontré que les teneurs les plus élevées sont celles des extraits : DCM avec 36.65 mg EAG/g E et Extrait MeOH avec 33 mg EAG/g E. Les concentrations en flavonoïdes quantifiées par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) ont démontré que l'Ext Aq est le plus concentré (20.85 mg EQ/mg). L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl). Le pourcentage d'inhibition le plus important est constaté pour la concentration de 1.97 mg/ml dans les extraits MeOH et DCM avec 87.58 % ,87.06%, respectivement.

L'activité antimicrobienne a été déterminée pour deux extraits : DCM et MeOH, en utilisant différentes concentrations. Le test a concerné cinq souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline (RMSA), *Enterococcus faecalis* et une levure *Candida albicans*, par la méthode de diffusion sur milieu solide. Tous les extraits n'ont aucun effet sur les microorganismes testés sauf sur *C. albicans* qui a montré une sensibilité envers les deux extraits DCM et MeOH par une zone d'inhibition de 21.79 mm et 20.59 mm respectivement à une concentration de 1g/ml.

Mots clés : *Polianthes tuberosa* L., feuilles, extraits phénolique, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobienne,

Summary

Polainthes tuberosa L (Asparagaceae) is a medicinal and ornamental plant, known in the world by its therapeutic effect and its easy culture. However, in Algeria the plant and his therapeutic effect is unknown, so our object is to enhance the tuberoses and its medicinal effects (antioxidant and antimicrobial). Leaves phenolic extracts obtained by solid-liquid maceration with methanol / water. A second maceration was carried out and followed by splitting with liquid-liquid using organic solvents Hexane (Hx), Dichloromethane (DCM), and the final aqueous phase (Ext Aq). The higher yields obtained are: Ext DCM (28.64%) and Ext MeOH (27.04%) and the low yields obtained is the aqueous phase (0.814%) Polyphenols content determined by Folin-Ciocalteu methods, reveals that the higher amount is of : Ext DCM 36.65 mg EAG / g E and Ext MeOH 33 mg EAG / g E and the weak level is of Ext Hx 1.63 mg EAG / g E. The flavonoid tenor was quantified by the method of aluminum trichloride ($AlCl_3$), demonstrate that aqueous phase has the important rate 20.85 mg EQ / mg E while the DCM and MeOH extracts have the weaker rate: 8.98 mg EQ / E mg and 7.68 mg EQ / mg respectively. The antioxidant activity was evaluated by DPPH test (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). Inhibition percent at the rate of 1.97mg / ml was 87.58%, 87.06%, 72.41% and 41.60 % for MeOH, DCM, aqueous phase and Hx extracts respectively, while inhibition percent of vitamin C was 99% at 0.3mg / ml. The antimicrobial activity was determined by the use of different concentration of the two extracts DCM, MeOH. five bacterial strains was used : *Escherichae coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterococcus faecalis* and yeast *Candida albicans* by disk diffusion method. All the extracts show no effect on the microorganisms tested except on *C. albicans* which showed sensitivity to the two extracts by zone inhibition of 21.79mm and 20.59mm for DCM and MeOH respectively at 1 g / ml.

Key words: *Polainthes tuberosa* L., leaves, phenolic extract, antioxydant pouvoir, antimicrobien pouvoir, extrait phenolique

الملخص

هي نبتة طبية وعطرية معروفة بخصائصها الطبية وزراعتها السهلة, غير ان خصائصها غير معروفة في الجزائر . من هذا المنطلق فأنا نسعى الى تسليط الضوء على الخصائص الطبية من خلال دراسة النشاطية المضادة للاكسدة والمضادة للمكروبات للمستخلصات الفينولية للأوراق. هذه المركبات تم الحصول عليها عن طريق النقع في الميثانول والماء للحصول على مستخلص الميثانول (Ext MeOH) بنفس الطريقة، المحلول المتحصل عليه تم شطفه بمركبين الاكسان و الديكلورومثان . اعتبرت كمستخلص الاكسان. (Ext Hx) ومستخلص الديكلورومثان، (Ext DCM). ومستخلص (phase aq). أعطى مستخلص الديكلورومثان مردودية كبيرة 28.64 % متبوعا بمستخلص الميثانول 27.04 % , غير أن مستخلص المائية كانت مردوديتها ضعيفة ب0.814%.

تم تحديد المحتوى الفينولي لكل مستخلص عن طريق Folin-Ciocalteu، حيث أن المستخلصين الديكلورومثان والميثانول كان محتواهما كبيرا ومتقاربا 36.65 mg EAG/g E و 33 mg EAG/g E على الترتيب. على غرار مستخلص الاكسان كان ضعيفا جدا 1.63 mg EAG/g E. غير ان المحتوى الفلافونيدات المقدر عن طريق ثلاثي كلور الالمنيوم (AlCl₃) اظهر ان الطبقة المائية تحتوى على مقدار كبير من الفلافونيدات 20.85 mg EQ/mg E وان المستخلصين الديكلورومثان والميثانول يحتويان على نسبة ضعيفة منه 8.98 mg EQ/mg E و 7.68 mg EQ/mg على الترتيب.

تحديد النشاطية المضادة للاكسدة بطريقة ال DPPH أدى الى معرفة نسبة التثبيط الخاصة بكل مستخلص الديكلورومثان والميثانول. الاكسان و الطبقة المائية حيث قدرة عند التركيز 1.97مغ/مل ب 87.58%. 87.06% و 72.41% و 41.6% علي الترتيب. اما بالنسبة لفيتامين س قاربة 99% عند التركيز 0.3 مغ/مل. البكتيريا و الخميرة المستعملة في تحديد النشاطية المضادة للمكروبات للمستخلصين الديكلورومثان والميثانول هي. *Escherichae coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* المقاومة لمéthiciline (RMSA), *Enterococcus faecalis* والخميرة *Candida albicans*

حيث اثبت الاختبار أن هذين المستخلصين غير فعالين ضد البكتيريا . وفعالة ضد الخميرة التي أظهرت حساسية عالية اتجاهه. بمقدار 21.79مم لمستخلص الديكلورومثان و 20.59مم لمستخلص الميثانول عند التركيز 1مغ/مل.

الكلمات المفتاحية : *Polainthes tuberosa L.*، الاوراق، مستخلص الفينولات، نشاطية مضادة للاكسدة، نشاطية مضادة للميكروب،

Sommaire

Introduction	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. La Tubéreuse : <i>Polianthes tuberosa</i> L.....	3
1. Origine et distribution géographique	3
2. Noms vernaculaire	3
3. Systématique	3
4. Description botanique	4
5. La culture exigence et condition climatique.....	5
6. Composition chimique de <i>P. tuberosa</i> L.	6
7. Usage traditionnel de <i>Polianthes tuberosa</i> L.....	6
8. Activités biologiques.....	6
II. Les composés phénoliques.....	7
1 Les polyphénols.....	7
1.1. Généralités.....	7
1.2. Biosynthèse	8
1.3. Effet thérapeutique.....	8
2. Les flavonoïdes.....	9
2.1. Localisation et rôle des flavonoïdes dans la plante.....	9
2.2. Propriétés thérapeutiques.....	9
III. Activité antioxydante.....	10
1. Stress oxydant ou oxydatif.....	10
2. les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène.....	10
3. Les antioxydants.....	10
3.1. Les antioxydants endogènes.....	11
3.2. Les antioxydants naturels.....	11
3.3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	11
IV. Activité antibactérienne	12
1. Les micro-organismes et les antibiotiques de synthèse.....	12
2. les microorganismes et les antibiotiques naturels.....	13
3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	14

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

I.	Matériel	16
1.	Matériel végétal.....	16
2.	Les agents pathogènes.....	16
II.	Méthodes.....	17
1.	Extraction des composés phénoliques.....	17
2.	Détermination du rendement.....	17
3.	Dosage des phénols totaux.....	18
4.	Dosage des Flavonoïdes.....	19
III	Activités biologiques.....	19
1.	Activité antioxydant.....	19
2.	Activité antibactérienne et antilevure.....	20

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1.	Rendement en polyphénols dans les feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.....	24
2.	Dosage des polyphénols.....	24
3.	Dosage des flavonoïdes.....	25
4.	Activité antioxydant.....	26
5.	Activité antibactérienne et antilevure	28
	Conclusion	32
	Références bibliographiques	35
	Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Le système racinaire de <i>Polianthes tuberosa</i> L.....	4
Figure 2.	Les feuilles de <i>Polianthes tuberosa</i> L.....	4
Figure 3.	L'Inflorescence de <i>Polianthes tuberosa</i> L.....	5
Figure 4.	Structure de base des flavonoïdes.....	9
Figure 5.	Protocole expérimental d'extraction des polyphénols.....	18
Figure 6.	Concentrations des polyphénols contenues dans les différents extraits des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.....	24
Figure 7.	Concentrations en Flavonoïdes contenues dans les différents extraits des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.....	26
Figure 8.	Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L(a) et ceux de la vitamine C (b).....	27
Figure 9.	Zones d'inhibitions (ZI) de la levure <i>C. albicans</i> vis-à-vis de deux extraits. A gauche : Extrait Méthanolique, à droite : Extrait Dichlorométhane.....	29
Figure 10.	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols..	Annexe2
Figure 11	Courbe d'étalonnage de l'acide quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	Annexe2

Polianthes tuberosa L (la tubéreuse) est une plante de la famille des Asparagacées, **RAKTHAWORN *et al* (2009)**. Cette plante bulbeuse est connue dans le monde pour l'utilisation de son huile essentielle en parfumerie et l'exploitation de ses fleurs coupées en ornementation. Elle est également utilisée comme antispasmodique, diurétique et l'asthme **LIM, (2014)**. Ces différentes parties ont fait l'objet de plusieurs études, on peut citer celle de **MOUSSA *et al* (2011)** sur l'activité antioxydante des feuilles, ainsi que l'activité antimicrobienne des feuilles faite par **RAMMAMURHY *et al* (2013)**.

En Algérie, la tubéreuse est utilisée comme plante ornementale et était, autrefois, exploitée pour l'extraction de son huile essentielle. Cependant, elle est actuellement en voie de disparition et n'est cultivée qu'au niveau de certaines pépinières. De plus ses vertus médicinales sont mal connues.

Le stress oxydant, définit comme la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur destruction par les systèmes de défenses antioxydants (**Favier, 2003**), est à l'origine de plusieurs maladies humaines (plus de **200** physiopathologies) allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardiovasculaires, le SIDA et l'arthrite rhumatoïde (**PINCEMAIL *et al*, 2003**).

De même, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité (**BASLI *et al*, 2012**). La situation est plus préoccupante du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à plusieurs antibiotiques ce qui constitue un problème de santé important à l'échelle mondiale (**BEN BRINIS, 2012**).

De ce fait, la recherche de molécules actives dotées de faibles effets secondaires s'avère nécessaire (**HARKATI, 2011**). En effet, ces dernières années, les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les polyphénols, qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (**CHEBIL, 2006**).

C'est dans ce concept que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel est la valorisation de cette plante à bulbes dans le domaine thérapeutique. Pour cela nous avons procédé à l'évaluation de l'effet antioxydant par le test de DPPH, ainsi qu'à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, des extraits polyphénoliques de ses feuilles.

I. La Tubéreuse : *Polianthes tuberosa* L.

1. Origine et distribution géographique

La tubéreuse a été dénommée *Polianthes tuberosa* par Linné en 1753 (DAVID *et al*, 2005), du mot latin « *polyanthas* » qui signifie plusieurs fleurs et *tuberosa* signifie tubéreuse (WIART, 2012). Elle est originaire du Mexique (SANGAVAI, 2008)

La tubéreuse a été cultivée par les Aztèques il y a plus que 600 ans et elle a été propagée en Europe par les Espagnols aux 16^{ème} siècles. En France la tubéreuse a été ramenée de l'Inde au 15^{ème} siècle (SAFEENA *et al*, 2015).

La fleur est cultivée en Inde, Kenya, Mexique, Maroc, France, Italie, Hawaii, Afrique du Sud, Taiwan, Caroline du Nord, États-Unis, Égypte, Chine et dans d'autres pays tropicaux et subtropicaux du monde (SINGH, 2006).

2. Noms vernaculaires

D'après LIM (2014), les noms vernaculaires de la tubéreuse sont :

Mexique : Omixochitl , amiga de noche.

Anglais : tuberose..

Indienne : Rajanigandha , Nishigandha.

Français : Jacinthes des Indes, tubéreuse.

Italienne : Tuberosa

Algérie : مسك الرومي

3. Systématique

Polianthes tuberosa L est classée par Angiosperm Phylogeny group III (APG III) en 2009 comme suit :

- Règne : Plantae
- Classe : Equisetopsida
- Ordre : Asparagales
- Famille : Asparagaceae
- Genre : *Polianthes*
- Espèce : *Polianthes tuberosa*

4. Description botanique

4.1. Système racinaire

La tubéreuse possède des racines bulbeuses (figure 1) ayant une forme ovale-oblongue et un plateau peu épais à la base du bulbe, qui porte en dessous plusieurs fibres (**AUGUSTE - DRAPIEZ, 1831**). Ces fibres sont principalement adventives et superficielles (**SAFEENA et al, 2015**).



Figure 1. Le système racinaire de *Polianthes tuberosa* L. (**SAFEENA et al, 2015**).

4.2. Feuilles

Les feuilles sont linéaires, basales, aiguës (**AUGUSTE DRAPIEZ, 1831**), brillantes, vertes et rougeâtres près de la base. Elles sont regroupées sous forme d'une rosette à la base avec une longueur de 30 à 45 cm et une largeur de 1,3 cm en moyenne (figure 3) (**SAFEENA et al., 2015**).



Figure 2. Les feuilles de *Polianthes tuberosa* L. (**LIM, 2014**)

4.3. L'inflorescence

L'Inflorescence de la tubéreuse (figure 3) est en épi et porte entre 15-25 paires de fleurs (SAFEENA *et al*, 2015). Les fleurs sont portées par un axe inflorescentielle à aspect cylindrique, d'une hauteur de 60- 120 cm (SAFEENA *et al*, 2015) avec des feuilles en forme d'écaillés, les bractéoles (CHARLES-FRANÇOIS, 1806).

Les fleurs sont parfumées et de couleur blanche (AUGUSTE DRAPIEZ, 1831) de 25mm de long (SAFEENA *et al*, 2015). Elles ont la forme d'un entonnoir, découpé à l'extrémité. L'androcée est formé par six étamines soudées à l'orifice de l'entonnoir (CHARLES-FRANÇOIS, 1806). Le stigmate se trouve sous deux formes Trifide ou Tetrafide. La structure du style est pliée ou droite; il se termine par un ovaire triloculaire ou tétraloculaire (MEENAKSHI, 2013) qui contient plusieurs ovules et produit une capsule à trois loges composée d'une série de graines aplaties (CHARLES-FRANÇOIS, 1806).



Figure 3. Inflorescence de *Polianthes tuberosa* L (SAFEENA *et al.*, 2015).

5. La culture : exigence et condition climatique

La tubéreuse est une plantes qui se propage par les bulbes d'une mesure de 1.5-3cm. (SAFEENA *et al*,2015).

Elle est cultive dans les champs ou les pots au moins de mai –juin ou le climat sera doux avec des températures moyenne de 20-23°C. La tubéreuse exige des sites ensoleille et un arrosage abondant pendant la croissance, elle pousse dans une large gamme des sols, y compris salines et alcalines sols et limons sableux bien drainés et aérés riche en matière organique avec un pH de 6-7,5. (LIM,2014)

6. Composition chimique de *P. tuberosa* L.

Les constituants chimiques des feuilles obtenues par la méthode de Chromatographie sont : 9,11Dehydrohecogenin 3-O-Glucose xylose galactoside, Kameferol 3-O xyloside, α -D glucoside et Polianthoside B et C (**RAMMAMURTHY et al, 2010**).

La composition chimique de la variété à fleurs doubles de *P. tuberosa*, d'après **RAKTHAWORN (2009)**, qui a réalisé une extraction de l'huile essentielle par quatre méthodes différentes : enfleurage à froid, enfleurage à chaud, et deux autre méthodes en utilisant l'hexane et l'éther de pétrole comme solvants. Les extraits des fleurs sont analysés par chromatographie phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (GC-MS)

Les composés chimiques majeurs obtenus sont : benzoate de méthyle (44.85%-30.17%), salicylate de méthyle (12.11%-7.18%), 7-décen-5-olide(18.13%-13.33%), benzoate de benzyle(24.25%- 10.28%), 2,4-decadien-1-al(2.91%), (Z)-3-hexenyl2-oxopropanoate(27.38%), 1-tétradécène(4.15%), 1-hexadécène(8.85%), pentacosane(29.44%-19.23%), (E)-methylisoeugenol(6.05%), , heptacosane(12.53%). (**RAKTHAWORN, 2009**).

7. Usage traditionnel de *Polianthes tuberosa* L

L'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle est très variée :

Les feuilles sont utilisées pour traiter l'asthme, le cataplasme, les furoncles et les maux de tête (**KHARE, 2007**).

Les bulbes est utilisé pour traiter quelques maladies citant : les inflammations pyrogènes, les brûlures...etc. Il est un antispasmodique et diurétique. La poudre du tubercule est un remède contre la gonorrhée et le paludisme.

L'huile essentielles de *Polianthes tuberosa* L est utilisée comme hypnotique pour les femmes souffrant de l'insomnie et la dépression avec un faible désir sexuel (**LIM, 2014**).

Actuellement, la tubéreuse est utilisée pour la fabrication des parfums, les crèmes hydratants ainsi que les Bougies parfumées.

8. Activités biologiques

8.1. Activité antioxydant

Les travaux de **MOUSSA(2011)**, sur l'extrait méthanolique et l'extrait chloroformique des feuilles de *P. tuberosa* L. ont montré qu'à une concentration de 12 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait méthanoïque et 8 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait chloroformique, la plante possède une activité antioxydante.

7.2. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles de *P. tuberosa* L. possèdent une activité antifongique contre de nombreux types fongiques tels que : *Aspergillus flavus*, *Microsporium nanum*, *Epidermatophyton floccosum* et *Tricophyton tonsurans*, le diamètre des zones d'inhibition est estimé entre 15 à 34 mm (SINGH, 2011).

L'extrait des bulbes de *P. tuberosa* L. obtenu par différents solvants et à une concentration de 400 µg/disque, a montré un grand effet sur une large gamme de bactéries de gram⁻ (*Vibrio mimicus*, *V. parahemolyticus*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et gram⁺ (*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcina lutea*) pour un diamètre de zone d'inhibition variant entre 9 à 48 mm (RUNI, 2014)

7.4. Activité cytotoxique

L'étude de RUMI *et al.* (2014), sur l'activité cytotoxique des bulbes de *P. tuberosa* L. a montré que l'extrait méthanolique à une concentration de 3.56 µg/ml et que l'extrait de tétrachlorure de carbone à une concentration de 9.31 µg/ml, ont une activité sur les cellules du carcinome humain. Les auteurs suggèrent que cette activité est due à la présence de pentaglycosides de spirostanol dans les extraits étudiés.

II. Les composés phénoliques

1. Les polyphénols

1.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire, ils représentent des dérivés non azotés, possédant une ou plusieurs cycles aromatiques (BRUNETON, 2009).

Les polyphénols se trouvent dans toutes les parties de la plante (racine, tige, feuilles, fleurs et fruits). Ils sont produits sous l'influence génétique et s'impliquent dans les processus physiologiques, telles que la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits et même contre les attaques d'un agresseur (BOIZOT, 2006). Cette famille englobe les flavonoïdes, les tanins, les lignines et l'acide salicylique (RAVEN, 2000). Les polyphénols possèdent plus que 8000 structures isolées, identifiées et classées. Les polyphénols peuvent être des molécules simples, des polymères ou des complexes (TIRICHINE, 2010) (Tableau 1).

Tableau 1. Les principales classes des composés phénoliques (**BOUTINE, 2011**)

nombre d'atomes de carbone	squelette de base	classe
06	C6	phénols simples, benzoquinones
07	C6 - C1	acides phénoliques
08	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique
09	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 - C4	naphtoquinone
13	C6 - C1 - C6	xanthone
14	C6 - C2 - C6	stilbène, anthraquinone
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 - C3) 2	lignanes, neolignanes
30	(C6 - C3 - C6) 2	biflavonoïdes
n	(C6 - C3) n	lignines
	(C6) n	catecholmelanine
	(C6 - C3 - C6) n	(tannins condensés)

1.2. Biosynthèse

D'après **BRUNETON(2009)**, la synthèse des composés phénoliques ce fait en deux voies :

- La voie d'acide shikimique qui conduit à la formation des acides aminés aromatiques, phénylalanines et tyrosine, qui sont les précurseurs d'une série de composés phénoliques comme : les lignines, l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.
- La voie de l'acétate qui conduit à la formation des: chromones, isocoumarines, oricinols...etc.

D'après **SARNI-MANCHADO et al. (2006)**, la synthèse et l'accumulation des composés phénoliques est affectée sous l'action des différents facteurs, telle que ; les facteurs climatique (l'action de la lumière, l'action de la température) et les facteurs agricoles (la présence des microorganismes et l'application des traitements (antisptique et fertilisant)) .

1.3. Effets thérapeutiques

Le pouvoir des composés phénoliques est prouvé par plusieurs études qui montrent que ces composés ont un pouvoir : Antioxydant, anticancéreux, contre les maladies cardiovasculaires, contre les maladies hormonaux-dépendantes, et une puissance gastro-protectrice (**AKROUM, 2011**)

2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent une large gamme de classes qui sont soit sous forme libre ou sous forme de glycosides, plus que 4000 flavonoïdes ont pu être identifiés et isolés (MARFAK, 2003).

Toutes les classes telles que flavones, isoflavandiols, flavanols, flavandiols, auronnes, chalcones, anthocyanins possèdent le même squelette à quinze carbones (figure 4). Il est composé de deux noyaux aromatiques A et B attachés par un hétérocycle oxygène qui représente le C (DACOSTA, 2003)

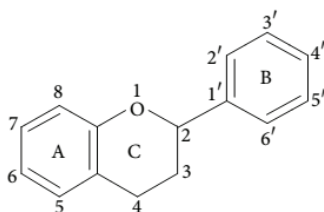


Figure 4. Structure de base des flavonoïdes (KUMAR *et al*, 2013)

2.1. Localisation et rôles des flavonoïdes dans la plante

L'accumulation des flavonoïdes au niveau de la vacuole, de l'épiderme des feuilles et des fleurs et aussi dans la cuticule foliaire est liée à la nature des flavonoïdes, de l'espèce, de la période et de la région (BRUNETON, 2009).

Les plantes synthétisent les flavonoïdes pour attirer les pollinisateurs par les couleurs des fleurs et pour repousser des insectes indésirables. Par ailleurs, ces substances entrent en collaboration avec les hormones végétales à fin de contrôler la croissance et le développement des plantes. Certains composés de ces substances jouent un rôle dans la protection contre des infections causées par les différents agresseurs (MARFAK, 2003). D'après TIRICHINE. (2010) Les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection des plantes contre les rayonnements ultra-violets et dans la symbiose entre les légumineuses et les bactéries par l'activation de l'expression de gène *nod*.

2.2. Propriétés thérapeutiques

D'après AKROUM (2011), plusieurs recherches ont démontré les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes à savoir: leurs effets, anti diarrhéique, antimicrobien, antiviral, une activité contre le cancer, contre la cardio-toxicité, une activité cardio-protectrice, contre les inflammations, dans la protection des neurones et dans la protection oculaire.

III. Activité antioxydante

1. Stress oxydant ou oxydatif

Afin de protéger le corps des microbes, les globules blancs produisent des radicaux libres ERO (espèces réactives de l'oxygène) et les azotes oxydants qui à un taux élevées peuvent engendrer un stress oxydant. Ce dernier provoque une inflammation et une mutagenèse qui cause des maladies telles que : le cancer, les maladies cardio-vasculaires et la maladie d'Alzheimer (SONNONGUEBWAOGA, 2012).

Selon KABOUCHE(2010), le stress oxydant est un déséquilibre de la balance radical libre-antioxydant entre la production des radicaux libres et les antioxydants qui servent de les réduire.

2. les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres sont des espèces chimiques soit un atome ou une molécule très réactive et instable (GUY, 1994).

Les radicaux libres du type primaire sont le résultat de la réduction des oxygènes, l'autre type dit secondaire est dérivée de la réduction des radicaux primaires, qui sont $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 et $ONOOH$. L'ensemble des radicaux libres et leurs dérivés sont généralement appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ils sont fabriqués dans toutes les cellules, particulièrement dans la chaîne respiratoire mitochondriale et dans le cas d'une inflammation causée par les cellules phagocytaires activées. Leur rôle se résume par la défense immunitaire (pathogène, cellule tumorales..etc.), fonctionnement de neurones de la mémoire, la régulation des gènes comme des signaux cellulaires (FAVIER, 2003)

Dès l'apparition d'un stress oxydant, les ERO inhibent la formation de l'ATP, déclenchent la synthèse des autres gammes des radicaux libres (CARDIN, 2008) et endommagent plusieurs biomolécules, tels que l'ADN, les lipides et les protéines pour provoquer plusieurs maladies chroniques (BOUMERFEG *et al*, 2012).

3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules impliquées dans le piégeage des radicaux libres. Ils sont localisés selon leurs caractères physico-chimiques ; les molécules liposolubles sont situées sur la membrane cellulaire et les molécules hydrosolubles sont situées au cytosol et /ou dans le milieu extracellulaire (PASTRE, 2005).

3.1. Les antioxydants endogènes

Le corps humain produit des enzymes comme un moyen de contrôle des ERO en synergie avec les cofacteurs minéraux : le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mg), le sélénium (Se) et le fer (Fe).

Les antioxydants endogènes sont :

- Les superoxydes dismutase SOD : En première étape, la molécule se catalyse en super-oxyde en O_2 et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . En deuxième étape ces produits sont désintoxiqués à l'aide des autres enzymes.
- La glutathion peroxydase : enzyme hydrosoluble à une action sur l' H_2O_2 et sur les radicaux lipidiques.
- La catalase C : c'est une enzyme qui fonctionne en collaboration avec le fer pour éliminer H_2O_2 (MASSART, 2011)

3.2. Les antioxydants d'origine naturelle

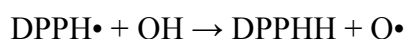
Les antioxydants exogènes sont des vitamines A, C et E, des polyphénols et des cofacteurs fournis par l'alimentation. Leur rôle est de stabiliser les ERO en leur cédant un atome d'hydrogène et d'inhiber la réaction d'oxydation dans la cellule. Elles sont complémentaires par leur action (BOUGANDOURA, 2011).

L'action des polyphénols sur les ERO est liée : à leur structure, au nombre de groupement phénolique et à la polarité. Cette action est représentée par le retardement de l'oxydation et la fabrication des ERO (YAHIAOUI, 2012) ou par la stabilisation de ces radicaux (COLLIN *et al.*, 2011).

3.3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.

Il y a plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante, citant brièvement :

- La méthode d'ORAC, elle a été découverte par des chercheurs Américains en 1993, son principe est de calculer la destruction des propriétés fluorescentes d'une protéine végétale soumise à l'action des radicaux libres introduits dans le milieu (ROLLAND, 2004).
- Le DPPH• (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyle) est un composé chimique stable d'une couleur violette qui sera réduit à la présence d'un antioxydant. La propriété de piégeage du composé DPPH• le rend stable selon la formule suivante



La lecture de l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm (**DONZO *et al*, 2015**),

- Le FRAP (ferrique réduction pouvoir antioxydant) décrit par Benzie et Strain (1976) est basé sur la réduction d'un complexe de fer, il est caractérisé par une couleur bleue en présence d'antioxydants, la lecture est réalisée par spectrophotomètre à 593 nm (**HAJIMAHMOODI, 2009**).
- Le test d'ABTS, permet de mettre l'extrait de plante en contact avec les radicaux libres d'ABTS préformés et l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à 734 nm. Les radicaux libres d'ABTS sont fondamentalement créés de deux manières : à partir du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ et par du chlorure du 2, 2'-azobis (**KONE, 2009**)

IV. Activité antimicrobienne

Les microorganismes pathogènes causent plusieurs maladies graves responsables de plus de 17 millions de décès par an, comme par exemple: Le tétanos, la typhoïde, Trypanosome...etc. Pour lutter contre ces maladies, l'Homme utilise des antibiotiques, qui altèrent le fonctionnement des bactéries en provoquant soit l'inhibition de leur croissance, soit leur destruction, ou par l'utilisation des plantes qui possèdent des propriétés antibactériennes ou antifongiques (**BOUTINE, 2011**).

1. Les micro-organismes et les antibiotiques de synthèse

D'après **YALA *et al* (2001)**, les antibiotiques sont des substances produites soit par des micro-organismes ou synthétisée chimiquement dans le but d'inhiber la croissance, ou détruire les micro-organismes. Cependant leur utilisation excessive est à l'origine de l'apparition de la résistance bactérienne. Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques par plusieurs mécanismes telles que : L'acquisition de gènes codant des enzymes qui détruisent l'agent antibactérien, acquérir des pompes d'efflux qui extrudent l'agent antibactérien de la cellule, la production de parois cellulaires ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens, ou encore acquérir des mutations qui limitent l'accès des agents antimicrobiens et les échanges génétiques entre les bactéries, la transformation, la conjugaison et la transduction (**TENOVER, 2006**).

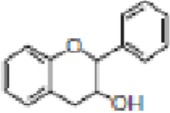
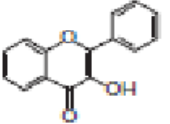
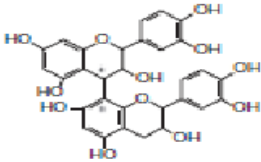
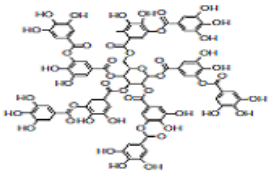
2. Les micro-organismes et les antibiotiques naturels

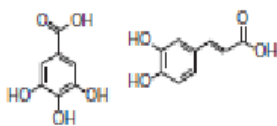
L'action des composés phénoliques sur les bactéries est liée selon **KAROU *et al* (2006)** à leur poids moléculaire. Ce dernier permet aux monomères et aux oligomères de traverser la

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

paroi bactérienne et ainsi détruire les ponts d'hydrogènes, les protéines de la paroi cellulaire et les enzymes bactériennes par le mécanisme de toxicité (tableau 2).

Tableau 2. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (DAGLIA, 2011).

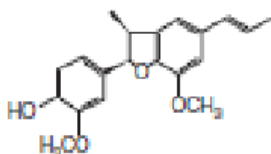
Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p>Flavane-3-ol</p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 <p>Flavonole</p>	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.
	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p>Tannins condensés</p>	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
 <p>Tannins hydrolysables</p>	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Listeria</i> .
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2.
	Champignons	<i>Candida parapsilosis</i> .



Bactéries

S.aureus, *L.monocytogenes*, *E.coli*,
P.aeruginosa.

Acides phénoliques



Bactéries

Différentes souches de
Mycobacterium tuberculosis.

Néolignane

3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

Les méthodes utilisées pour évaluer la capacité antibactérienne d'une substance sont :

- Selon **BURNICHON *et al.* (2003)**, la méthode de dilution peut être réalisée soit en milieu liquide ou en milieu solide, afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne. Son principe consiste à mettre en contact, les suspensions bactériennes avec une gamme de concentration croissante d'antibiotiques. L'observation se fait après une incubation de 24 à 48 heures à 37°. À partir d'une certaine concentration, l'absence de culture en tube indique la concentration minimale inhibitrice. Dans le milieu solide les concentrations d'antibiotique sont mélangées avec la gélose. Après incubation, l'absence de culture en boîte indique la CMI
- La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme). Elle est basée sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition où la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante (**BROADASKY *et al.*, 1976**).

Notre expérimentation a été effectuée pendant 3 mois au sein du laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales au niveau du département de Biotechnologie à l'université de SAAD DAHLEB. BLIDA 1.

I. Matériels

1. Matériel végétal

Les feuilles de *Polianthes tuberosa* L. ont été ramenées de la région de Sétif, à partir d'une culture en pots. La station est caractérisée par un climat semi- aride.

La récolte a été effectuée au stade de la fructification durant le mois de septembre, par une matinée ensoleillée où la température était de 33 ± 5 C°.

Les feuilles ont été séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 jours afin de conserver leurs propriétés chimiques. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un moulin à café. La poudre est par la suite conservée dans des sacs en papier à l'abri de la lumière et dans un endroit sec.

2. Les agents pathogènes

Les souches utilisées (Tableau 3), dans l'activité antimicrobienne, sont fournies par le laboratoire de Bactériologie et de parasitologie de l'hôpital Frantz Fanon de Blida, qui sont des souches achetées.

Tableau 3. Les souches microbiennes testées et leurs références

Souche	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthiciline (RMSA).	/
<i>Candida albicans</i>	90028

II. Méthodes

1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de la tubéreuse est réalisée suivant la méthode solide-liquide décrite par **MEZITI *et al.* (2012)**, avec quelques modifications (Figure 5).

- **Protocol expérimental**

20 g de poudre de feuilles sont macérés dans 200 ml de méthanol/eau (70:10 v: v), pendant 24h sous agitation mécanique et à l'abri de la lumière. L'extrait obtenu est filtré par du papier Wattman. Le résidu végétal récupéré subit une deuxième macération faite comme précédemment.

Les deux filtrats mélangés ont subi un fractionnement liquide-liquide par l'hexane (agent de dilapidation et d'élimination de la chlorophylle), qui nous donne deux phases, une organique et l'autre aqueuse. Les deux phases sont évaporées à sec à 40°C à l'aide d'un rotavapor. La phase organique donne l'extrait d'Hexane (Ext Hex) et la phase aqueuse donne l'extrait méthanolique (Ext MeOH).

Une deuxième macération effectuée comme précédemment est effectuée. Dans ce cas la phase aqueuse récupérée (Ext MeOH) subit plusieurs rinçages par **plusieurs** solvants ce qui nous permettra de séparer les classes phénoliques par :

- fractionnement par dichlorométhane : le dichlorométhane mélangé à la phase aqueuse (v: v) permet d'avoir deux phases, une organique dont l'évaporation à sec donne l'extrait du dichlorométhane (Ext DCM).
- fractionnement par l'acétate d'éthyle : A la phase aqueuse précédente, nous avons ajouté de l'acétate d'éthyle (v: v). Pour cette étape aucune séparation de phases n'a été constatée. Le mélange est évaporé à sec donnant ainsi l'extrait aqueux (Ext Aq).

Les différents extraits sont conservés à 4°C. L'extraction a été répétée trois (03) fois.

2. Détermination du rendement

Le rendement des extraits est calculé par le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la poudre végétale de départ. Il est exprimé pour 100 unités de masse de poudre végétale.

$$R = \frac{\text{poids du résidu sec}}{\text{poids de poudre végétale de départ}} \times 100$$

3. Dosage des polyphénols totaux

La méthode de dosage adoptée est celle de **LI *et al.* (2007)**, basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu.

Le standard utilisé pour la réalisation de la courbe d'étalonnage est l'acide gallique. A partir d'une solution mère de 160µg/ml de ce dernier, une gamme de solutions filles est

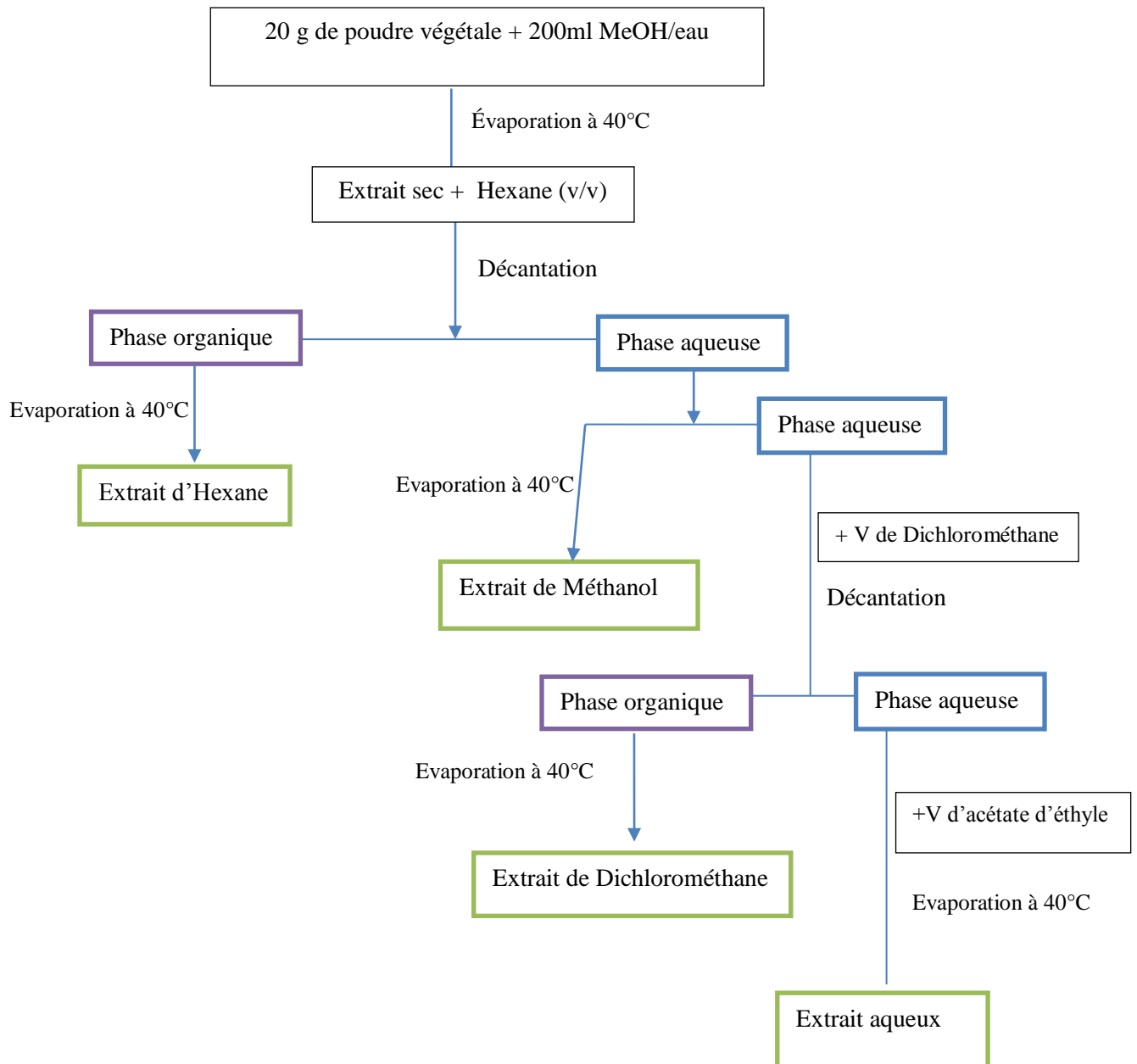


Figure 5. Protocole d'extraction des composés polyphénoliques (**MEZITI *et al.*, 2012**) modifié

effectuée (10µg/ml, 40µg/ml, 80µg/ml et 120µg/ml). En parallèle, des solutions à une concentration de 10 mg/ml (dans l'eau distillée) sont préparées pour chaque extrait.

Un volume de 0.2ml de chaque concentration d'acide gallique et de chaque extrait est mélangé à 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1:10 dans l'eau distillée). Une incubation pendant 4 minutes est effectuée, puis 0.8 ml de carbonate de sodium (75 g/l) est ajouté. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les absorbances sont lues à 765nm.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits ont été déterminées graphiquement par la courbe d'étalonnage et exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E).

4. Dosage des Flavonoïdes

Pour le dosage des Flavonoïdes nous avons utilisé la méthode du trichlorure d'Aluminium ($AlCl_3$), décrite par **DJARMOUNI *et al.* (2012)**.

Nous avons préparé des solutions de 20 mg/ml, dans le Méthanol pur, pour chaque extrait. Le standard utilisé pour la réalisation de la courbe d'étalonnage est la quercétine. A partir d'une solution mère de 50µg/ml, de cette dernière, nous avons effectué une gamme de solutions filles à différentes concentrations, à savoir : 1 µg/ml, 7 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml et 40 µg/ml.

Dans des tubes à essai, 1 ml de chaque dilution et de chaque extrait est mélangé avec 1 ml d' $AlCl_3$ (à 2% préparé dans le méthanol). Le mélange est agité et incubé pendant 15 minutes. L'absorbance est lue à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée graphiquement sur la courbe d'étalonnage et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g E).

III. Activités biologiques

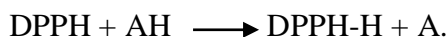
1. Activité antioxydante

L'effet anti-radicalaire des extraits polyphénoliques est évalué par le test du piégeage du radical libre 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). La méthode adoptée est celle décrite par **BOUMERFEG *et al.* (2012)** qui permet de mesurer le pouvoir réducteur des substances bioactives contenues dans les extraits par le calcul du pourcentage d'inhibition (I%) et la détermination de la CI_{50} qui correspond à la concentration inhibitrice de 50% de

L'activité du DPPH. Ce paramètre est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel.

- **Principe**

En présence d'un antioxydant, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, de couleur violette se réduit en 2,2- diphényl-1-picrylhydrazine, de couleur jaune, lorsque l'électron célibataire est séparé (MOLYNEUXS, 2004).



- **Mode opératoire**

Une gamme des dilutions dans le méthanol est préparée, à partir d'une solution mère de 100 mg/ml pour chaque extrait, à savoir : 6.25mg/ml, 12.5mg/ml, 25mg/ml et 50mg/ml.

La Vitamine C est utilisée comme témoin positif. Des dilutions l'ordre de 5 mg/ml, 10 mg/ml et 20mg/ml sont préparées à partir d'une solution mère de 30 mg/ml.

50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits et de la Vitamine C sont mélangés avec 2,5 ml de la solution de DPPH (0.004 %).

Après incubation pendant 30 minutes, les absorbances sont lues à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH est calculé comme suit :

$$\text{I\%} = [(\text{AC} - \text{AE}) / \text{AC}] \times 100$$

Avec :

AC : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

AE: Absorbance en présence de l'inhibiteur (extrait).

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité du DPPH (CI₅₀) est calculée pour chaque extrait à partir de l'équation $y = ax + b$, qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur et elle est exprimée en mg/ml.

2. L'activité antibactérienne et anti levure

- **Principe**

En microbiologie la méthode de diffusion repose sur la diffusion d'un extrait antimicrobien dans un milieu solide qui se traduit par une compétition entre la diffusion de l'extrait et de la croissance des microorganismes. L'effet de l'extrait sur les microorganismes est estimé par la mesure de la zone d'inhibition et il est classés : comme sensible, intermédiaire ou résistant (BROADASKY *et al.* 1976).

PONCE *et al.* (2003), classent les microorganismes en germes sensibles, intermédiaires ou résistants, selon les normes suivantes :

- Non sensible ou résistante : $ZI < 8\text{mm}$.
- Sensible : $9 < ZI < 14\text{ mm}$
- Très sensible : $15 < ZI < 19\text{ mm}$
- Extrêmement sensible: diamètre $> 20\text{ mm}$

- **Mode opératoire**

- **Préparation de l'inoculum**

Des colonies jeunes bien isolées âgées de 24h sont prélevées et homogénéisées dans 2.5 ml d'eau physiologique stérile. Ce qui correspond à 10^6 UFC/ml.

- **Préparation de milieu de culture**

Les géloses de Muller-Hinton et Sabouraud choffé sont coulées dans des boites de Pétri de 90 mm de largeur. Les boites sont laissées à température ambiante jusqu'à solidification.

- **Préparation de dilution**

La méthode utilisée dans notre expérimentation est celle mentionnée par **GUEDADBA *et al.* (2015)**.

Deux solutions mères de 1g/ml pour l'Ext MeOH et l'Ext DCM sont préparées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Par la suite une série de solutions filles à diverses concentrations: 0.5 g/ml, 0.25 g/ml, 0.16 g/ml, 0.125 g/ml et 0.06 g/ml sont effectuées.

Par manque de matériel végétal et de quantités suffisantes pour les extraits d'Hexane et l'extrait aqueux, nous n'avons pas pu évaluer leur activité antimicrobienne.

- **Préparation des disques**

Les disques de papier Wattman n°1 de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés à 120°C pendant 15 mn dans l'autoclave, sont imbibés par 10 μl des différentes solutions polyphénoliques.

Des disques imbibés de Dimethyl sulfoxyde (DMSO) sont utilisés comme contrôle négatif. Selon **HARRAR (2012)** et **SACHIDANANDA *et al.* (2014)**, le DMSO ne présente aucun effet sur la croissance des souches microbiennes.

- **Ensemencement et dépôt des disques**

Les boites de Pétri stérilisées à 45°C sontensemencées par 100 μl de suspensions microbiennes, à l'aide d'un écouvillon pour une distribution homogène. L'excès est soigneusement aspiré par une pipette Pasteur.

MATERIEL ET METHODES

A l'aide d'une pince stérile, les disques imbibés sont soigneusement déposés sur le milieuensemencé, à 15 mm du bord de la boîte et sont laissés 15 mn pour que l'extrait diffuse dans la gélose.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour la levure. L'activité antibactérienne (Figure 6) est déterminée à l'aide d'une règle graduée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (ZI), exprimé en mm

1. Rendement en polyphénols dans les feuilles de *P. tuberosa* L.

Les résultats des rendements en polyphénols sont représentés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Rendement de différents extraits des feuilles de *P. tuberosa* L

Extraits	Rendements %
Extrait de Méthanol (Ext MeOH)	27.04±0,05
Extrait d'Hexane (Ext Hex)	2.175±0.01
Extrait de Dichlorométhane (Ext DCM)	28.64±0,20
Extrait aqueux (Ext Aq)	0.814±0.03

Nous remarquons, que les extraits qui montrent les plus grands rendements sont l'Ext DCM avec **28.62%** et Ext MeoH avec **27.04%**. Les extraits d' Hexane et aqueux marquent les rendements les plus faibles (2.175% et 0.814% respectivement).

D'après **BOUMERFEG *et al.*, (2012)**, l'Ext DCM contient d'une façon générale les flavonoïdes aglycones. **STALIKAS (2010)** et **BENBRIS (2012)**, notent que l'extrait MeOH/eau renferme les flavonoïdes glycosylés, les tannins et les acides phénoliques les plus polaires. De même, **AKROUM (2006)**, cite que l'extrait aqueux contient les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides et les tannins dimériques.

2. Dosage des polyphénols

Les concentrations en polyphénols obtenus pour les extraits des feuilles de *P. tuberosa* sont représentées sur la figure 7.

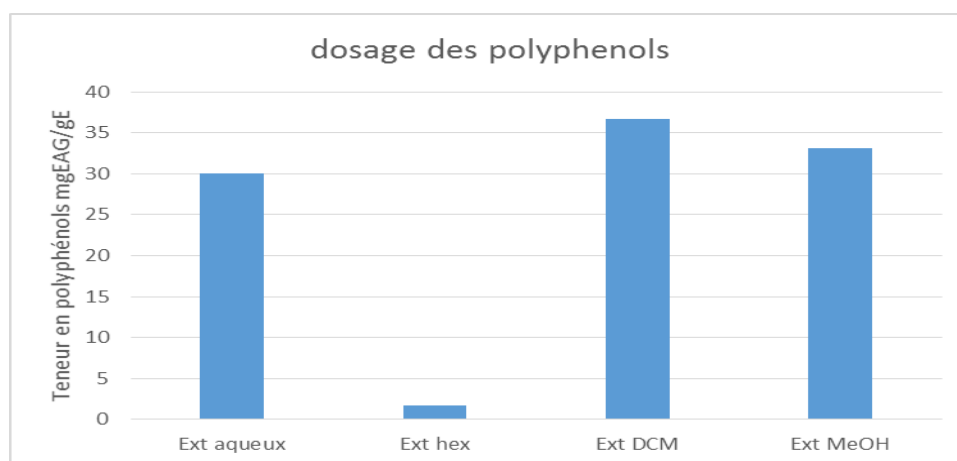


Figure 7. Concentrations des polyphénols contenues dans les différents extraits des feuilles de *P. tuberosa* L

À partir de la figure 7, nous observons que l'extrait de DCM contient la concentration la plus élevée en polyphénols. Elle est de **36,65 mg EAG/g E**, suivi par l'extrait Me OH dont la concentration est de **33 mg EAG /g E**. L'extrait aqueux renferme une teneur de **30,05 mg EAG/g E**. Par contre, l'extrait d'Hexane marque la plus faible concentration en polyphénols avec **1,63 mg EAG/g E**.

Nous remarquons que les concentrations en polyphénols obtenus dans chaque extrait sont liées à leurs rendements. En effet, les extraits DCM et MeOH donnent les rendements et les concentrations les plus importants.). Contrairement à l'extrait d'hexane et à la phase aqueuse qui ont montré une variation entre la concentration et le rendement (2.175% et 0.814% respectivement).

Cette variation en teneur en polyphénols est due à plusieurs facteurs : la polarité du solvant utilisé dans l'extraction (polaire, apolaire et peu polaire) (GHEDADBA *et al.*, 2015), l'organe utilisé dans l'extraction (HOUTA *et al.*, 2012), ainsi que le choix du polyphénol d'étalonnage (BOIZOT *et al.*, 2006).

Cependant, aucun travail bibliographique n'a été trouvé concernant les teneurs en polyphénols dans les feuilles de *P. tuberosa* L.

RUMI *et al.* (2014), mentionnent que les extraits de MeOH et d' Hexane des bulbes de *P. tuberosa* renferment des teneurs en polyphénols nettement supérieures à celles retrouvées dans les feuilles. Elles sont de l'ordre de 113.49 mg EAG/mg E, et 86.23 mg EAG/mg E, respectivement.

Selon MAITI *et al.* (2014), les fleurs de la tubéreuse sont moins concentrées et contiennent une faible quantité de polyphénols. Elle est de 0.18mg EAG/mg E dans l'extrait de MeOH, de 0.11mg EAG/mg E dans l'extrait DCM, de 0.094mg EAG/mg E dans l'extrait aqueux et de 0.004mg EAG/mg E dans l'extrait d'Hexane.

D'après NGUINAMBAYE *et al* (2015), la répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante est reliée à la nature de l'organe, comme le bulbe qui est un organe de réserve des substances organiques synthétisées depuis les feuilles.

3. Dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes des extraits des feuilles de *P. tuberosa* L sont représentés dans la figure 8.

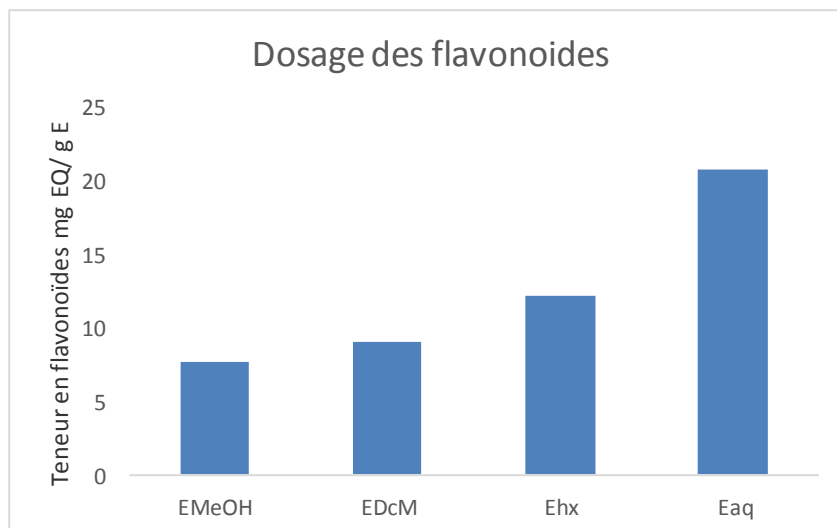


Figure 8. Concentrations en Flavonoïdes contenues dans les différents extraits des feuilles de *P. tuberosa* L.

La figure 8 montre que l'Ext Aq contient la concentration la plus élevée en flavonoïdes avec **20.85 mg EQ/g E**, par rapport aux autres extraits, suivi par l'Ext Hex avec une concentration de **12.18 mg EQ/g E**, puis l'Ext DCM avec une concentration de **8.98 mg EQ/g E** et en fin, l'Ext MeOH qui a la plus faible concentration (**7.68 mg EQ/mg E**).

Contrairement aux résultats obtenus pour le dosage des polyphénols. Les extraits DCM et MeoH sont les plus pauvres en flavonoïdes. Par contre les extrait aqueux et d'Hexane sont les plus riches en flavonoïdes.

Ces résultats pourraient être expliqués par le choix des solvants utilisés dans l'extraction ainsi que le choix du standard utilisé pour la courbe d'étalonnage (**GHEDADBA et al., 2015**)

4. Activité antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de *P. tuberosa* et de la Vitamine C (antioxydant de référence) sont figurés dans la figure 9, et les valeurs de l'CI₅₀ sont représentées dans le tableau 5

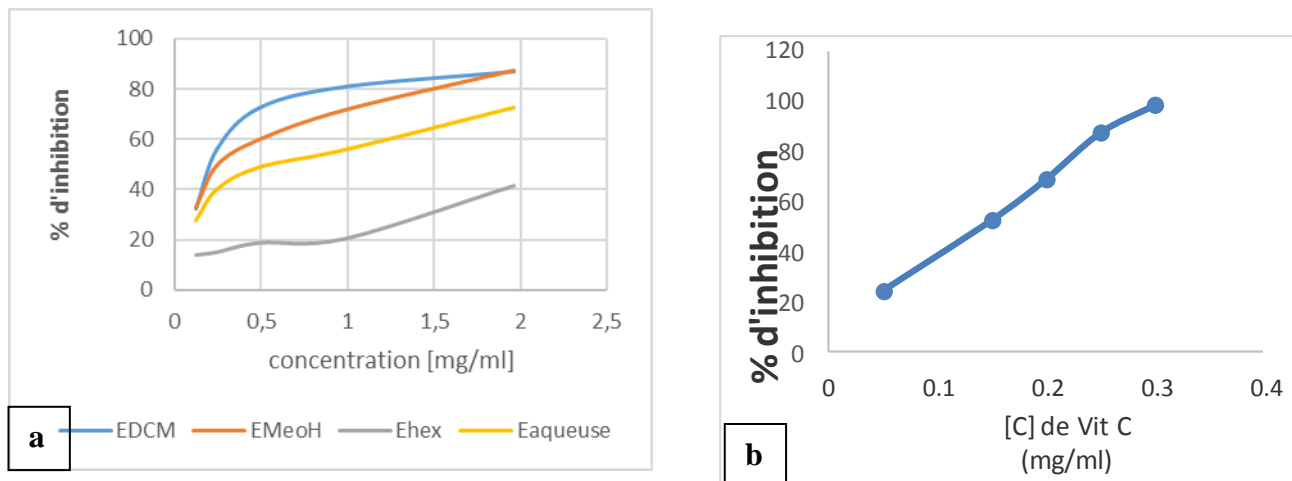


Figure 9. Pourcentages d’inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de *P. tuberosa* L(**a**) et ceux de la vitamine C (**b**)

Les résultats des pourcentages d’inhibition montrés dans la figure 9, indiquent que les extraits MeOH et DCM présentent les pourcentages plus élevés, **87,58 %** et **87,06%** respectivement, à une concentration de 1.96 mg/ml, suivi par l’Ext Aq avec **72.41 %** et l’Ext Hex qui donne la plus faible valeur **41.60 %** pour la même concentration. Toutefois le pouvoir réducteur des extraits reste inférieur à celui du produit de référence dont le pourcentage d’inhibition est de **99.03%** à une plus faible concentration 0.3mg/ml.

Nous pouvons dire que les extraits MeOH et DCM possèdent une activité antioxydante remarquable.

Tableau 5 : La CI₅₀ des différents extraits des feuilles de *P. tuberosa* L. et de la Vit C

Extraits	MeOH	Hexane	DCM	Aqueuse	Vitamine C
CI ₅₀	0.357	0.806	0.099	2.67	0.135

Le Tableau 5, nous permet de constater que l'Extrait DCM possède la plus faible concentration inhibitrice, **0.099 mg/ml**, suivi par l'Extrait MeOH dont la concentration est de

0.357mg/ml. L'Ext Aq marque une valeur plus importante avec **0.806mg/ml**. La concentration la plus élevée est notée pour l'Extrait Hex, **2.670mg/ml**. La vitamine C montre une valeur de **0.135mg/ml**

Il semblerait, d'après ces résultats, que l'Extrait DCM présente une activité antioxydant plus forte par rapport aux autres extraits et à la vitamine C.

MOUSSA *et al.* (2011), mentionnent que l'activité antioxydante de l'extrait méthanoïque brut donne une CI_{50} de 0.012 mg/ml. Donc l'effet est plus important que celui de l'Extrait MeOH que nous avons trouvé (0.357 mg/ml).

Cet effet anti-radicalaire remarquable serait probablement lié au rendement important et la concentration élevée des polyphénols contenus dans l'Extrait DCM.

En effet, **TURKMEN *et al.* (2007)**, indiquent que l'activité antioxydante est liée à la quantité des polyphénols contenue dans les extraits phénolique de thé noir.

Les travaux de **RUMI *et al.* (2014)**, sur l'activité antioxydant de l'extrait méthanoïque des bulbes montrent une CI_{50} de 0.071mg/ml et ceux de **MAITI *et al.* (2014)**, indiquent que la CI_{50} des extraits méthanoïques des fleurs est de 0.06 mg/ml.

Aussi, la CI_{50} de l'extrait d'Hexane des feuilles (2.67 mg/ml) est plus élevée que celle retrouvée dans les fleurs (3.41 mg/ml) (**MAITI *et al.* 2014**).

LAGHOUTER *et al.* (2015), notent que cette différence dans les résultats est liée à la composition chimique de la plante, les méthodes d'extraction et à la méthode de détermination (protocole expérimental) de l'activité antioxydante.

5. Activité antibactérienne et anti levure

Les résultats des tests antimicrobiens sont représentés dans le Tableau 5.

Tableau 6. Diamètres des zones d'inhibition des extraits DCM et MeOH

[g/ml]	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (ZI, mm)											
	Ext DCM						Ext MeOH					
	1	0.5	0.25	0.16	0.125	0.062	1	0.5	0.25	0.16	0.125	0.062
<i>C. albicans</i>	21.79	19.35	17.59	15.48	12.87	10.62	20.59	18.5	13.22	11.89	10.23	8.69
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches bactériennes sont résistantes aux deux extraits, se traduisant par l'absence de la zone d'inhibition. Donc les deux extraits ne possèdent aucun effet antibactérien sur les bactéries Gram⁺ et Gram⁻.

Seule la levure *C. albicans*, a manifesté une réponse extrêmement sensible sous l'effet des deux extraits à la concentration de 1 g/ml (Figure 10), avec des ZI de 20,59 mm et 21,79 mm pour l'Extrait MeOH et l'Extrait DCM, respectivement.

L'effet inhibiteur est également remarquable pour les autres concentrations. En effet, *C. albicans* s'avère extrêmement sensible, à très sensible.

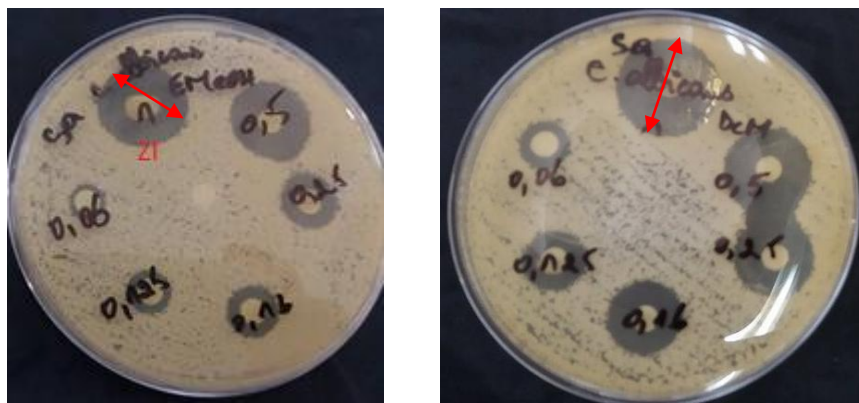


Figure 10. Zones d'inhibitions (ZI) de la levure *C. albicans* vis-à-vis de deux extraits. A gauche : Ext MeOH, à droite : Ext DCM

Les résultats obtenus semblent être influés par la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (**FAZELI et al, 2007**).

La résistance des bactéries Gram(-) et Gram(+) est en relation avec la nature de leurs membranes externes et aux changements environnementaux externes tels que : la température et le pH (**ATHAMENA, 2010**).

La composition chimique de l'extrait joue un rôle dans l'effet. Selon **ESSAWI et al. (2000)**, l'action des polyphénols, est due à la synergie des différents composés, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs (**BENBRINIS, 2012**)

RAMMAMURTHY et al. (2013), dans ses recherches sur les feuilles de *P. tuberosa* L. ont trouvé que les extraits de l'éther de pétrole et de l'éthanol possèdent une activité antimicrobienne à des concentrations de 100 et 500 mg/ml. L'effet de la méthode d'extractions et celle du solvant choisi (**FARID et al, 2009**) ainsi que la concentration des solutions imbibées dans les disques, influe sur les résultats de l'activité antimicrobienne. (**KHENFER et al., 2014**).

Les travaux de **KIRUTHIKA et al. (2011)**, sur l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque des fleurs, a révélé que ce dernier ne possède aucune activité, sauf pour la bactérie *E. Coli* qui a manifesté une sensibilité même à une très faible concentration de l'extrait 40µg/ml.

Les études de **RUMI et al. (2014)**, sur l'activité antibactérienne des extraits des bulbes de *P. tuberosa*, ont montré que les extraits d'Hexane et de Méthanol, ont une activité sur les bactéries Gram⁻ et Gram⁺ à une concentration de 400µg/disque.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail est de valoriser la tubéreuse *P. tuberosa* et mettre en évidence les propriétés thérapeutiques de ses feuilles, par l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de ses polyphénols.

L'extraction des polyphénols, à partir des feuilles de la tubéreuse, par les méthodes solide-liquide et liquide-liquide, montrent que les rendements obtenus par les différents extraits sont importants. L'extrait de Dichlorométhane donne 29%, l'extrait Méthanolique donne 27%, l'extrait d'Hexane 2%, et l'extrait aqueux 1%.

Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu, montre que les extraits DCM et MeOH sont riches en polyphénols avec des taux de : 36.65 mg EAG/g E et 33 mg. L'extrait aqueux renferme 30 mg EAG/g E et celui de l'Hexane, 1.63 mg EAG/g E.

Les teneurs en flavonoïdes déterminées par la méthode de $AlCl_3$ ont montré que l'extrait aqueux est riche en flavonoïdes par rapport aux autres extraits, avec une valeur de 20.85 mg EQ/g E, suivi par l'Hexane 12.18 mg EQ/g E, l'extrait de Dichlorométhane 8.98 mg EQ/g E et l'extrait Méthanolique 7.68 mg EQ/g E.

L'activité antioxydante des extraits évaluée par le test de DPPH démontre que le pouvoir réducteur des extraits Méthanolique et Dichlorométhane est plus important avec des pourcentages d'inhibition de 87.58% et 87.06%, respectivement, en comparaison avec le produit de référence 99.03%. Ces deux extraits donnent les valeurs les plus faibles de la CI_{50} : 0.099mg/ml et 0.357 mg/ml respectivement) par rapport aux autres extraits : l'hexane 2.67mg/ml et l'extrait aqueux 0.806 mg/ml.

L'étude de l'activité antimicrobienne des deux extraits Méthanolique et Dichlorométhane a montré que ces deux extraits ne possèdent aucun effet inhibiteur ($ZI = 0mm$) sur les bactéries testées, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline (RMSA) et *Enterococcus faecalis*. Cependant, un effet remarquable vis-à-vis de la levure *Candida albicans* qui s'est révélée extrêmement sensible à une dose de 1g/ml avec des $ZI = 20.59mm$ et $21.79mm$.

Ce travail est une contribution à l'étude de *P.tuberosa* et ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette plante :

- Réaliser une analyse quantitative et qualitative de chaque extrait par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Réaliser l'extraction par d'autres méthodes analytiques.

CONCLUSION

- Effectuer le test antimicrobien sur d'autres extraits et sur d'autres souches.
- Évaluer d'autres activités biologiques des extraits des feuilles.