

UNIVERSITE DE Saad DAHLEB BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologie des Plantes Aromatiques, Médicinales et Produits Naturels

**LA TUBÉREUSE (*POLIANTHES TUBEROSA* L.): MÉTHODES DE
PROPAGATION DE LA PLANTE ET CARACTÉRISATION PHYTOCHIMIQUE
ET BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE PLANT**

Par

BARGHOUT Nihed

Devant le jury composé de :

AISSAT A.	M.C.A., U. de Blida	Président
EL HADI D.	Pr., U. de Blida	Directeur de thèse
MESSGO-MOUMENE S.	M.C.A., U. de Blida	Co-directrice de thèse
ROUIBI A.	M.C.A., U. de Blida	Examineur
DJELALI N.	Pr., U. de Boumerdes	Examineur

Blida, Mai 2019

La tubéreuse (*Polianthes tuberosa* L.) : Méthodes de propagation de la plante et caractérisation phytochimique et biologique des extraits de plant

RESUME

Ce présent travail vise la recherche d'une meilleure méthode de propagation biologique et d'amélioration de la tubéreuse. Un essai de la culture témoin des bulbes a été conduit en pots et selon deux conditions : sous serre en plastique et en plein champ, en considérant différentes taille des bulbes. Un deuxième essai de culture biologique des bulbes (deux groupes : gros bulbes et petits bulbes) a été également installé en pots sous serre, mais sous l'effet des biostimulants (marc de café, grignon d'olive, acide humique et hydrolat des plumes). Les feuilles, les bulbes et les fleurs des plants issus des deux essais de culture, ont été récoltés puis séchés, pour faire l'objet d'extraction des polyphénols. Le dosage et l'identification des polyphénols, flavonoïdes et des tanins condensés des extraits hydrométhanoliques des parties des plants sont effectués, par spectroscopie et par l'HPLC-DAD. Leur activité antioxydante a été évaluée par le test de DPPH, de β -carotène et par le pouvoir chélateur. Les résultats de premier essai de la culture ont montré que la culture sous serre, en utilisant des bulbes de diamètre supérieur à 2 cm est le meilleur pour la croissance et la production florale de la tubéreuse. Nous avons trouvé également que l'hydrolat des plumes et le marc de café s'avèrent les meilleurs phytostimulants floraux de la plante. L'analyse des extraits hydrométhanoliques des parties étudiés a confirmé une meilleure teneur en polyphénols au niveau des fleurs (teneur maximale trouvée au niveau des fleurs traitées par l'hydrolat des plumes de 94.62 mg EAG/g E). Les mêmes extraits ont révélé une forte activité antioxydante. Dans ce sens, les bulbes ayant un diamètre supérieur à 2 cm, l'hydrolat des plumes et le marc de café sont recommandés comme meilleur diamètre et biostimulants pour la culture de la tubéreuse. Les extraits floraux demeurent très riches en principes actifs et utiles pour l'industrie autant qu'un antioxydant dans le domaine pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire.

Mots clés : *Polianthes tuberosa* L., culture biologique, biostimulants, analyse chimique, activité antioxydante.

مسك الروم (*Polianthes tuberosa* L.): طرق انتشار النبات والخصائص الكيميائية والبيولوجية للمستخلصات النباتية

الملخص

يهدف هذا العمل إلى إيجاد أفضل طريقة للتكاثر البيولوجي ولتحسين إنتاج نبات مسك الروم. وبهذا الصدد أجريت تجربة الزراعة العضوية للبصلات في الأواني وتحت ظرفين مناخين : تحت بيت الدفيئة البلاستيكية وتحت الظروف الجوية الطبيعية، مع الأخذ بعين الاعتبار مختلف اقطار البصلات المستعملة. تم تركيب تجربة ثانية للزراعة العضوية للبصلات (قسمان: البصلات الكبيرة والبصلات الصغيرة) في أواني تحت بيت الدفيئة، تحت تأثير المحفزات الحيوية (مخلفات تحضير القهوة، ثفل الزيتون، حمض الدبالية ومستخلص الريش). تم جمع أوراق، بصلات، وازهار النباتات الناتجة عن تجربتي الزراعة و تجفيفهم بهدف استخلاص البوليفينول. تمت الدراسة الكيميائية للبوليفينول، الفلافونويد، والتانات المكثفة للمستخلصات الهيدروميثانولية لمقتطفات أجزاء النباتات عن طريق التحليل الطيفي وال HPLC-DAD، كما تم تقييم النشاط المضادة للأكسدة للمستخلصات المحضرة بواسطة اختبار DPPH، β -carotene و pouvoir chélateur. أظهرت نتائج تجربة الزراعة الأولى أن الزرع تحت بيت الدفيئة باستخدام بصلات يزيد قطرها عن 2 سم هي الأفضل لنمو وزيادة إنتاج ازهار مسك الروم. كما أسفرت نتائج تجربة الزراعة الثانية أن مستخلص الريش ومخلفات تحضير القهوة هما أفضل محفزات حيوية عضوية لنمو وإزهار مسك الروم. التحاليل والدراسة الكيميائية للمستخلصات الهيدروميثانولية للأجزاء المدروسة من النبات، بينت ان نسبة وتركيز البوليفينول عالية على مستوى مستخلصات الازهار ككل (أكبر تركيز سجل على مستوى الازهار المعالجة بمستخلص الريش 94.62 mg EAG/g E). وان نفس المستخلصات اعطت نشاط مضاد للأكسدة قوي. ومن هذا المنطلق، يوصى باستخدام بصلات مسك الروم يزيد قطرها عن 2 سم، الى جانب استغلال مستخلص الريش ومخلفات تحضير القهوة كأفضل محفزات حيوية للزراعة العضوية لنبات مسك الروم. كما ان المستخلصات الزهرية تبدو اقوى مضادات للأكسدة، والتي يمكن استثمارها كمواد طبيعية حافظة في مختلف الصناعات الصيدلانية، التجميلية والغذائية.

الكلمات المفتاحية: *Polianthes tuberosa* L. ، الزراعة البيولوجية، المحفزات الحيوية، التحاليل الكيميائية، نشاط مضاد للأكسدة.

Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.): plant propagation methods and phytochemical and biological characterization of plant extracts

Abstract

This work aims to search the best method for improving tuberose propagation. An organic tuberose bulbs culture was installed in pots under two conditions: plastic greenhouse and open field, using different bulb size. A second experiment of bulb culture (two groups: big bulb and small bulb) was conducted in pots under greenhouse, using biostimulants (coffee grounds, olive pomace, humic acid and feathers hydrolat). Leaves, bulbs and flowers were harvested and then dried for extracting polyphenols. Content and identification of polyphenols, flavonoids and condensed tannins, from hydro-methanolic plant parts extracts was carried out by spectroscopy and by HPLC-DAD. Moreover, the antioxidant activity was evaluated through DPPH, β -carotene and chelating power tests. Results for the first culture trial reveal that, greenhouse culture using larger bulbs (2 cm in diameter) are the best for tuberose growth and flowering. For the second culture we found that application of feather hydrolat and coffee grounds prove to be the best phytostimulants for tuberose growth and flowering. Hydro-methanolic plant part extracts analysis confirms that, flowers extracts have the highest polyphenols content (best polyphenols content found in flowers treated by feather hydrolat 94.62 mg EAG/g E), and the same extracts revealed a strong antioxidant activity. In this sense, the use of large bulbs (diameter superior than 2 cm), feather hydrolat and coffee grounds as biostimulants are recommended for the organic culture of tuberose. Floral extracts remain very useful for the industry as much as an antioxidant in the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

Key words: *Polianthes tuberosa* L., biological culture, biostimulants, chemical analysis, antioxidant activity.

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit de travail de longue haleine que j'ai bien pu achever, grâce à Dieu, et grâce à la précieuse collaboration de mes professeurs, c'est pourquoi je tiens à les remercier nommément :

Mon directeur de thèse Mr EL HADI Djamel, professeur à l'université de Saad DAHLEB Blida1,

Mon ex-promotrice Mme HOUMANI Zahia, professeur à l'université de Saad DAHLEB Blida1,

Ma co-promotrice Mme MESSGO-MOUMENE Saida, maitre de conférences A, à l'université de Saad DAHLEB Blida1,

Mr KHENNOUF Seddik, professeur à l'université d'Abbas FERHAT Sétif1, responsable de laboratoire phytothérapie appliquée aux maladies chroniques.

Mme BENFEKIH-ALLAL Laila, professeur à l'université de Saad DAHLEB Blida 1 et responsable de laboratoire des plantes aromatiques et médicinales

Mr GHARBI Abdelaziz, professeur à l'université de Saad DAHLEB Blida 1,

Mr BENTOUMI Houcine, professeur à l'université de Saad DAHLEB Blida 1,

Mme CHEBATA Nada, maitre assistante à l'université de Saad DAHLEB Blida 1,

Qui ont accepté volontiers de me prodiguer leur savoir, leur disponibilité et leurs encouragements. Sans omettre de souligner mon entière gratitude au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine, ainsi que Bureau Nationale d'Etudes pour le Développement Rurales EPIC pour l'aide appréciable dont j'ai largement bénéficié.

Je remercie également les membres du jury, à savoir :

Monsieur le président Mr. AISSAT Abd el Kader, Maitre de conférences A, à l'université de Saad DAHLEB Blida1,

Monsieur l'examineur Mr. DJELALI Nacer Eddine, Professeur à l'université de Boumerdes,

Monsieur l'examineur Mr ROUIBI Abd el Hak, Maitre de conférences A, à l'université de Saad DAHLEB Blida 1,

Qui ont consenti à être membres du jury afin de valoriser certainement l'aboutissement d'un travail que j'ai dû concrétiser après quelques années de labeur.

Au final, je dédie cette thèse à tous mes professeurs et collègues de laboratoire des plantes aromatiques et médicinales, université de Saad DAHLEB Blida 1, et de laboratoire de phytothérapie appliquée aux maladies chroniques, université d'Abbas FERHAT Sétif 1. A vous tous toute ma reconnaissance et mes salutations les plus distinguées.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
الملخص	3
Abstract	4
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABELAUX	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	18
I. GENERALITES SUR LA PLANTE ETUDIEE : <i>POLIANTHES TUBEROSA</i>	19
L.	
1.1. Origine et répartition géographique	19
1.2. Etymologie de <i>Polianthes tuberosa</i>	19
1.3. Description de la plante	19
1.4. Classification	20
1.5. Variétés	21
1.6. Composition chimique	21
1.7. Activités biologiques	26
1.8. Usage traditionnel	29
1.9. Culture de <i>Polianthes tuberosa</i> L.	30
II. BIOSTIMULANTS	34
2.1. Acide humique	35
2.2. Hydrolat des plumes de poulet	35
2.3. Marc de café	37
2.4. Grignons d'olive	37
III. COMPOSES PHYTOCHIMIQUES, METHODES D'EXTRACTION ET APPLICATIONS	38
3.1. Huiles essentielles	38
3.2. COMPOSES PHENOLIQUES	44
3.3. ALCALOÏDES	48
IV. STRESS OXYDANT	53
4.1. Radicaux libres	53

4.2. Systèmes antioxydants	55
4.3. Tests de l'activité antioxydante	55
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	62
I. Matériel végétal	63
II. Méthodes	64
2.1 Mise en culture de <i>P. tuberosa</i> L	64
2.2 Caractérisation phytochimique des parties des plants cultivés	68
2.3. Activité antioxydante	77
III. Analyse statistique	79
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION	81
I. RESULTATS	82
1. Mise en culture de <i>Polianthes tuberosa</i> L.	82
1.1 Culture témoin de <i>P. tuberosa</i> L.	82
II. DISCUSSION	87
1.2 Conduite de la culture de <i>Polianthes tuberosa</i> L. sous l'effet des biostimulants	88
II.DISCUSSION	101
2. Caractérisation phytochimique des parties des plants cultivés	104
2.1. Criblage phytochimique	104
2.2. Etude phytochimique des différentes parties de <i>P. tuberosa</i> L. cultivée témoin	104
2.3. Polyphenols des plants cultivés sans et sous traitements	108
II. DISCUSSION	122
3. Activité antioxydante	123
3.1. Test de DPPH	123
3.2. Test de β -carotène	131
3.3. Pouvoir chélateur	136
II.DISCUSSION	141
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIFS	144
APPENDICES	147
REFERENCES	152

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 :	Morphologie de la plante de <i>P. tuberosa</i> L.	20
Figure 1.2 :	Alambic de distillation par entraînement à la vapeur d'eau.	39
Figure 1.3:	Méthode d'enfleurage.	41
Figure 1.4 :	Procédé d'extraction au CO ₂ supercritique	42
Figure 1.5 :	Les principaux types des alcaloïdes d'Amaryllidacées selon leur squelette	51
Figure 2.1 :	Morphologie des bulbes de <i>P. tuberosa</i> L. selon les diamètres	65
Figure 2.2 :	Etapes d'extraction des alcaloïdes de bulbes de <i>P. tuberosa</i>	71
Figure 2.3:	Différents étapes d'extraction des polyphénols de <i>P. tuberosa</i> L.	73
Figure 2.4 :	Etapes d'extraction de l'absolu de <i>P. tuberosa</i> L.	74
Figure 2.5 :	Etapes d'extraction des polyphénols des bulbes, des feuilles et des fleurs de <i>Polianthes tuberosa</i> L.	75
Figure 3.1:	Période de germination des bulbes de <i>Polianthes tuberosa</i> L. en fonction des conditions de la culture et les tailles des bulbes	82
Figure 3.2 :	Emergence des feuilles chez <i>P. tuberosa</i> L. en fonction des tailles des bulbes et la condition de la culture.	83
Figure 3.3 :	Emergence de la hampe de <i>Polianthes tuberosa</i> L. en fonction des diamètres des bulbes et en fonction de condition de culture	84
Figure 3.4 :	Nombre de feuilles chez <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivée selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture	84
Figure 3.5:	Hauteur des plants de <i>Polianthes tuberosa</i> L. selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture	85
Figure 3.6 :	Emergence des fleurs selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture	86
Figure 3.7 :	Nombre de fleurs et longueur de la hampe chez <i>Polianthes tuberosa</i> L. selon les diamètres des bulbes et les	87

	conditions de culture	
Figure 3.8:	Période de germination des bulbes de <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants et selon la taille des bulbes	90
Figure 3.9 :	Emergence des feuilles chez <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes	91
Figure 3.10:	Emergence de la hampe chez <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes	93
Figure 3.11:	Nombre de feuilles chez <i>P. tuberosa</i> L. traitée par les biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes	94
Figure 3.12:	Hauteur des plants chez <i>P. tuberosa</i> L. cultivée dans des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes	95
Figure 3.13:	Nombre de bulbilles chez <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants et selon les tailles des bulbes.	97
Figure 3.14:	Emergence des fleurs chez les plants cultivées de <i>P. tuberosa</i> L. sous l'effet des biostimulants et selon deux tailles des bulbes.	98
Figure 3.15:	Nombre de fleurs et longueur de la hampe chez les plants cultivés de <i>P. tuberosa</i> L. sous l'effet des biostimulants, selon la taille des bulbes.	101
Figure 3.16:	Teneur en eau (H%) et en matière sèche (MS%) des bulbilles et des bulbes de <i>P. tuberosa</i> .	105
Figure 3.17:	Chromatogramme HPLC-DAD d'extrait hydrométhanolique des feuilles (FEME), des fleurs (FME) et les bulbes (BME)	117
Figure 3.18:	Chromatogramme HPLC-DAD de fraction de dichlorométhane de l'extrait hydrométhanolique des feuilles	118
Figure 3.19:	Chromatogramme HPLC-DAD de la phase aqueuse d'extrait des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.	118
Figure 3.20:	chromatogramme HPLC-DAD de la fraction d'hexane des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.	118
Figure 3.21:	Chromatogrammes d'HPLC-DAD des extraits des feuilles des plants de <i>Polianthes tuberosa</i> L. traités par les biostimulants.	120

Figure 3.22:	Chromatogrammes d'HPLC-DAD des extraits des bulbes des plants de <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivés sous l'effet des biostimulants	121
Figure 3.23:	test de DPPH des alcaloïdes de bulbes, bulbilles de <i>P. tuberosa</i> et de l'acide ascorbique.	125
Figure 3.24:	Les IC ₅₀ des alcaloïdes de bulbes, bulbilles de <i>P. tuberosa</i> L. et de l'acide ascorbique.	125
Figure 3.25:	Inhibition de DPPH par les polyphénols extraits des feuilles, des fleurs et des bulbes de <i>P. tuberosa</i> L. et le BHT	126
Figure 3.26:	Les IC ₅₀ des extraits bruts des feuilles, des bulbes et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> et le BHT.	126
Figure 3.27:	Pourcentage d'inhibition du DPPH par les fractions d'extraits brut des feuilles de <i>P. tuberosa</i> et l'acide ascorbique.	127
Figure 3.28:	Les IC ₅₀ de DPPH par les fractions de l'extrait des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L. et l'acide ascorbique	127
Figure .29:	Test de DPPH des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'acide ascorbique	129
Figure 3.30:	Les IC ₅₀ du test de DPPH des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'acide ascorbique	130
Figure 3.31:	Cinétique des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par l'extrait de fleurs, des feuilles et des bulbes de <i>P. tuberosa</i> L. BHT: témoin positif, eau, méthanol : contrôles négatifs	131
Figure 3.32:	Inhibition du blanchissement de β -carotène après 48 heures par les extraits de fleurs, des feuilles et des bulbes de <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivée témoin, BHT, l'eau et le méthanol	132
Figure 3.33:	Cinétiques des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par l'extrait de fraction des feuilles de <i>P.</i>	133

	<i>tuberosa</i> L. cultivée témoin	
Figure 3.34:	Pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène après 48h par l'extrait de fraction des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.	133
Figure 3.35:	Cinétiques des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par les extraits des feuilles (a) et des bulbes (b) de <i>P. tuberosa</i> L. traité par les biostimulants, BHT: contrôle positif, eau, méthanol : contrôles négatifs	135
Figure 3.36:	Pourcentage d'inhibition de blanchissement de β -carotène après 48 heures par l'extrait des feuilles (a) et des bulbes (b) de <i>Polianthes tuberosa</i> L., cultivée sous l'effet des biostimulants, BHT, l'eau et le méthanol.	136
Figure 3.37:	Chélation de fer en fonction des différentes concentrations des extraits des différentes parties de <i>Polianthes tuberosa</i> L., EDTA.	137
Figure 3.38:	Les EC ₅₀ de chélation de fer par l'EDTA, les extraits des différentes parties des plants de <i>Polianthes tuberosa</i> L.	137
Figure 3.39:	Pouvoir chélateur de fer des extraits des fractions des feuilles de <i>Polianthes tuberosa</i> L. et l'EDTA	138
Figure 3.40:	Les EC ₅₀ de chélation de fer par l'EDTA et les extraits des fractions des feuilles de <i>Polianthes tuberosa</i> L.	139
Figure 3.41:	Pouvoir chélateur de fer des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'EDTA : chélateur de référence.	140
Figure 3.42:	Les EC ₅₀ de chélation de fer par l'EDTA, l'extrait des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de <i>Polianthes tuberosa</i> L. traités par les biostimulants	141
Tableau 1.1:	Composition chimique de l'absolu des fleurs de la tubéreuse selon la méthode de distillation	22
Tableau 1.2:	sources exogènes et endogènes des radicaux libres	54
Tableau 1.3:	Maladies associées au stress oxydatif	54

Tableau 2.1:	Caractères physico-chimiques du sol et des biostimulants.	67
Tableau 2.2:	Gradient d'élution de la phase mobile pour la séparation des polyphénols	77
Tableau 3.1 :	Criblage phytochimique des bulbes, des feuilles et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> L.	104
Tableau 3.2 :	Rendement et aspect des extraits d'alcaloïdes des bulbes et des bulbilles de <i>P. tuberosa</i> .	105
Tableau 3.3 :	Rendement de la concrète et de l'absolu des fleurs de <i>P. tuberosa</i> .	106
Tableau 3.4 :	Constituants identifiés de l'absolu de <i>Polianthes tuberosa</i> L. par CG-SM.	108
Tableau 3.5:	Rendement des extraits bruts au niveau des bulbes, feuilles et fleurs de <i>Polianthes tuberosa</i> L. cultivée témoin	109
Tableau 3.6:	Rendement en extraits des fractions des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L.	109
Tableau 3.7 :	Rendement en pourcentage des extraits bruts des feuilles, des bulbes et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet des biostimulants.	110
Tableau 3.8 :	Teneur en polyphénols des extraits des bulbes, des feuilles et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> L. cultivés témoin en équivalent acide gallique	111
Tableau 3.9:	Teneur en polyphénols des extraits des fractions des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L. cultivés témoin	111
Tableau 3.10:	Teneur en polyphénols des extraits des organes de <i>P. tuberosa</i> L. cultivés sous l'effet des biostimulants en équivalent acide gallique	112
Tableau 3.11:	Teneur en flavonoides des extraits bruts des bulbes, des feuilles et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> L. en équivalent quercétine.	113
Tableau 3.12:	Teneur en flavonoides des fractions de l'extrait brut des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L. en équivalent quercétine.	113
Tableau 3.13:	Teneur en flavonoides des extraits bruts des bulbes, des feuilles et des fleurs de <i>P. tuberosa</i> L. cultivée sous l'effet	114

des biostimulants en équivalent quercétine.

Tableau 3.14:	Teneur en tanins condensés des extraits des fleurs, des feuilles et des bulbes de <i>P. tuberosa</i> L. en équivalent catéchine	115
Tableau 3.15:	Teneur en tanins condensés des extraits des fractions des feuilles de <i>P. tuberosa</i> L. en équivalent catéchine	115
Tableau 3.16 :	Teneur en tanins condensés des extraits des parties des plants cultivés de <i>P. tuberosa</i> L. sous l'effet des biostimulants	116

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De nos jours, les plantes aromatiques et médicinales sont de plus en plus mises en valeur via son exploitation lors des traitements des maladies multifactorielles, substituant les produits chimique cancérogène, ou bien comme source de substances parfumées largement exploitées en domaine médicinales aussi bien cosmétique, c'est le cas de la tubéreuse (*Polianthes tuberosa* L.).

La tubéreuse (*Polianthes tuberosa*) est une plante médicinale et ornementale, originaire de Mexique. Elle est cultivée à l'échelle mondiale dans les régions tropicales et subtropicales pour ses fleurs coupées parfumées et les industries du parfum [1]. L'huile des fleurs de la tubéreuse est de haute qualité qui reste aujourd'hui la matière première la plus chère. La plante est douée d'une diverse activité biologique à savoir l'activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticancéreuse entre autre [2,3,4].

La tubéreuse a fait l'objet de plusieurs études dans le monde, que se soit selon ses métabolites secondaires précisément son huile essentielle [5,8-12], ses polyphénols [11], saponines, mais très peu des travaux ont été entrepris sur ses alcaloïdes [4]. Soit selon sa propagation en utilisant des engrais chimiques ou des biostimulants [14-16].

En Algérie, la tubéreuse est restreinte et mal exploitée, elle n'est cultivée aujourd'hui que chez certaines pépinières, comme plante ornementale. Ceci est justifié par manque des distilleries pour l'extraction de son absolu et sa commercialisation. Mais, vue sa haute valeur économique en cosmétologie et en phytothérapie, l'adopte des autres manières pour sa propagation, conservation, aussi son exploitation s'avère indispensable. Il est important de signaler qu'aucun travail sur la tubéreuse en Algérie n'a été rapporté, du faite que la plante est mal connu chez les scientifiques.

Dans ce contexte, nous proposons l'étude de la propagation, la caractérisation phytochimique et biologique des extraits de *P. tuberosa* L. Les objectifs se résument dans les hypothèses suivantes :

(i) La première suggère la détermination des meilleures conditions de la culture, pour une meilleure croissance et production florale chez la plante en fonction de la taille des bulbes et selon la conduite de la culture sous abris ou en plein champ.

(ii) La deuxième est basée sur une culture de la plante, sous l'effet des biostimulants.

(iii) La troisième concerne l'étude phytochimique des extraits des parties des plants cultivés des deux essais de la culture de la plante et leur activité antioxydante.

Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LA PLANTE ETUDIEE : *POLIANTHES TUBEROSA* L. (LA TUBÉREUSE)

1.1. Origine et répartition géographique

Polianthes tuberosa est originaire du Mexique. Elle a été cultivée comme plante ornementale et médicinale par les Aztèques, cela fait 400 ans, où elle fût propagée vers d'autres sites dans le monde au 16^e siècle.

Elle est cultivée dans les régions tropicales et subtropicales, et elle est aussi cultivée à grande échelle en Chine, Egypte, France, Italie, en Afrique du sud, nouvelle Zélande, Espagne, Sri Lanka, Caroline du nord, en Inde, aux Etats-Unis et au Japon pour ses fleurs coupées parfumées et les industries de parfum [1-4].

1.2. Etymologie de *Polianthes tuberosa*

Polianthes vient de la juxtaposition de deux mots d'origine grecque, « *polios* » qui signifie blanc et « *anthos* » qui signifie fleurs [1], donc c'est une espèce à fleurs blancs. *tuberosa* signifie gonflé ou tubéreux en référence à son système de racine [2,5].

1.3. Description de la plante

P. tuberosa est une plante vivace, dressée 45-70 cm de long, à rhizome tubéreux et des racines adventives peu profondes et une tige courte. Les feuilles sont vertes, étroites, linéaires 20-30 cm de long et montées en rosette (Figure 1.1 a) [1, 2, 4].

Après l'induction florale (d'un ou plusieurs apex suivant la grosseur du bulbe) l'allongement des entrenœuds construit une hampe florale (Figure 1.1 b) avec des feuilles alternes, portant au sommet une inflorescence de grappes spiciformes à 4-6 fleurs [6]. La fleur (Figure 1.1c) est presque sessile, solitaire à l'aisselle d'une petite bractée écailleuse ou réunies par 2 sur un court pédoncule ayant une petite bractéole à la base [2,6]. Le périanthe est blanc cireux forme 6 lobes de 10-15 mm de long, les étamines sont six, émergeant de la partie supérieur du tube de périanthe portent des anthères linéaires. L'ovaire à 3 loges et le fruit est capsule [1,2,4]. *P. tuberosa* fleurit habituellement pendant l'été et l'automne tôt (Juillet-Septembre) après avoir planté en printemps [3].



Figure 1.1 : Morphologie de la plante de *P. tuberosa*. [4].

A. feuilles, B. hampe florale, C. fleurs

1.4. Classification (APG III, 2009)

Embranchement : Tracheophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Aspargales

Famille : Amaryllidaceae/ Aspargaceae/ Aagavaceae

Genre : *Polianthes*

Espèce *Polianthes tuberosa* L.

1.5. Variétés

Sur la base du nombre de rangs des pétales, on distingue trois types de *P. tuberosa* : tubéreuse à fleur simple, semi-double et double.

1.5.1. Tubéreuse à fleur simple

C'est une variété ayant des fleurs avec une rangée de segments de corolle. Les fleurs sont largement utilisées comme coupées et pour l'extraction d'huile essentielle. Elle est plus parfumée que la variété double, dont la concrète est de 0.08 à 0.11%.

1.5.2. Tubéreuse à fleur semi-double

Les fleurons ont 2-3 rangées de segments de corolle. Les hampes sont droites, les fleurs sont blanches. Cette variété est généralement cultivée pour ses fleurs.

1.5.3. Tubéreuse à fleur double

Les fleurons de cette variété sont de couleur blanche, plus ou moins teintés du rouge rosé. Ils ont plus de trois rangées de pétales. Les hampes florales sont utilisées pour l'extraction d'huile essentielle. La récupération de la concrète a été trouvée pour être 0.062% [1].

La sélection de la variété dépend du but recherché lors de la croissance : fleurs coupées, extraction d'huile essentielle...etc [1,3].

1.6. Composition chimique

La recherche bibliographique révèle une richesse en métabolite secondaire chez *P. tuberosa* dont la plante entière s'avère contenir le glucofructosane, la transfructosidase et le saccharose.

1.6.1. Composition chimique des fleurs

Les fleurs de *Polianthes tuberosa* ont une valeur économique très importante dans le monde entier, mais les études phytochimiques de ses extraits sont restreintes. D'après les littératures, l'absolu de *P. tuberosa* contient six γ -lactones insaturés : (Z)-5-octen-4-olide, (Z)-5-decen-4-olide, (Z)-6-nonen-4-olide, (Z)-6-dodecen-4-olide, (Z,Z)-6-9-dodecadien-4-olide et tuberolide [4], les différents composés de l'absolu et selon les travaux réalisés sont récapitulés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Composition chimique de l'absolu des fleurs de la tubéreuse selon la méthode de distillation

constituants	Méthodes de distillation	références
benzyle acétate	solvant	[4],[7],[8],[9]
benzyle benzoate	Solvant/ enfleurage à froid/à chaud/headspace/CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)/ CO ₂ -SC (80°C, 300 bar)	[4],[7],[8],[9],[10],[11], [12]
éthyle myristate	Solvant	[4],[7],[8],[9]
eugénol	Solvant/headspace/ CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)/ CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)/ CO ₂ -SC (80°C, 300 bar)	[4],[7],[8],[9],[11],[12]
géraniol	Solvant/headspace	[4],[7],[8],[9],[11]
indole	Solvant/enfleurage à froid/headspace	[4],[7],[8],[9],[10]
methyle anthranilate	Solvant	[4],[7],[8],[9]
methyle isoeugénol	Solvant	[4],[7],[8],[9]
methyle palmitate	Solvant	[4],[7],[8],[9]
méthyle anthranilate	Solvant/enfleurage à froid	[4],[7],[8],[9]
méthyle eugénol	Solvant/enfleurage à froid/ CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)/ CO ₂ -SC (80°C, 300 bar)/ soxhlet (hx)/(ep)	[4],[7],[8],[9],[12]
méthyle isoeugénol	Solvant/enfleurage à froid/à chaud/headspace	[4],[7],[8],[9],[11]
phényle éthanol		[4],[7],[8],[9]
pentacosane	Solvant/ CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)/soxhlet (hx)/(ep)	[4],[7],[8],[9],[10],[12]
7-decen-5-olide	Solvant/enfleurage à froid	[4],[7],[8],[9],[10]
3-hexenyl 2-oxopropanoate	Solvant/enfleurage à chaud	[4],[7],[8],[9],[10]
2,4,-di-tert-butylphénol	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
1-hexadecene	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
alpha-farnesol	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
benzyle salicylate	Solvant/headspace	[4],[7],[8],[9],[10],[11]
ecosanol	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
tricosane	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
heptacosane	Solvant	[4],[7],[8],[9],[10]
1-tetradecene	Solvant/enfleurage à chaud	[4],[7],[8],[9],[10]
1-hexadecene	Solvant/enfleurage à chaud	[4],[7],[8],[9],[10]
méthyle benzoate	Enfleurage à froid	[10]
citral	Enfleurage à froid	[10]
beta-farnesene	Enfleurage à froid	[10]
méthyle salicylate	Enfleurage à froid/à chaud/headspace	[10],[11]
2,4-decadien-1-al	Enfleurage à chaud	[10]
nerolidol	Enfleurage à chaud	[10]
heptadecanone	Enfleurage à chaud	[10]

méthyle 2-aminobenzoate	headspace	[11]
3-4-dimethoxy benzaldehyde	headspace	[11]
phénylethyl benzoate	headspace	[11]
diisobutyl phtalate	headspace	[11]
1.8-cineole	headspace	[11]
géranyl acétate	headspace	[11]
alpha-farnesene	Headspace/CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)	[11],[12]
(E)-farnesol	headspace	[11]
undecane	headspace	[11]
nonanal	headspace	[11]
dodecane	headspace	[11]
decanal	headspace	[11]
2-ethylhexyl acrylate	headspace	[11]
tetradecane	headspace	[11]
styrene	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
1-phényl-1-pentanone	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
benzaldéhyde	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
1,3-dichloro- benzène	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
1-chloro-octadécane	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
2,4-bis(1,1 diméthyl)phénol	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)/soxhlet (hx)	[12]
8-héptadécane	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)	[12]
hentriacontane	CO ₂ -SC (60°C, 200 bar)/CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)/CO ₂ -SC (80°C, 300 bar)/soxhlet (hx)/(ep)	[12]
acetétophénone	CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)	[12]
méthyle ester acide benzoïque	CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)	[12]
β-bisabolene	CO ₂ -SC (40°C, 100 bar)	[12]
4-(2-prophényl)phénol	CO ₂ -SC (80°C, 300 bar)	[12]
carveol	Soxhlet (hx)	[12]
mesitylene	Soxhlet (hx)/(ep)	[12]
p-xylene	Soxhlet (hx)/(ep)	[12]
1-ethyl3-methyl benzène	Soxhlet (hx)	[12]
limonene	Soxhlet (hx)/(ep)	[12]
1,4diethyl benzène	Soxhlet (hx)/(ep)	[12]
(Z)-3-méthyl cyclopentanol	Soxhlet (ep)	[12]
1,2,4triméthyl benzène	Soxhlet (ep)	[12]
salicyl hydrazide	Soxhlet (ep)	[12]
1,6-diméthyl naphthalene	Soxhlet (ep)	[12]
benzophenone	Soxhlet (ep)	[12]

CO₂-SC: CO₂ super critique,
 hx: soxhlet par l'hexane,
 ep: soxhlet par l'éther de pétrole.

Il s'avère que les constituants de l'absolu sont variables. Les raisons pour cette différence peuvent être comprises si nous prenons en compte tous les facteurs qui

influencent la composition chimique des huiles, à savoir, les conditions climatiques, le stade végétatif de la plante, le temps de production d'huile, l'existence des différences chémotypique et la technique de distillation [13]. Le croisement et le rétrocroisement entre *P. tuberosa* « simple et double » et *P. howardii* ont donné naissance à neuf hybrides à fleur rose, violet rougeâtre, violette, orange et jaune. L'analyse phytochimique de pétales des parents et de leurs neuf hybrides montre que les pétales de *P. tuberosa* « simple et double » ne contiennent ni de caroténoïdes ni d'anthocyanines, alors qu'un seul hybride ne contient que les caroténoïdes, quatre ne contiennent que les anthocyanines (100% cyanidine), et les restes en plus de *P. howardii* contiennent à la fois les caroténoïdes et les anthocyanines (cyanidine et delphinidine) [14,15].

L'utilisation de 100 ppm de la spermidine ou l'ATP par arrosage ou trempage des bulbes avant culture a augmenté la teneur en indole (spermidine : 3.45 mg/g MF, ATP : 3.95 mg/g MF). Le traitement par spermidine est plus efficace que l'ATP pour le phénol (19.2 mg/g MF, 15.4 mg/g MF), carbohydate, alors que, l'ATP (50, 75, 100 ppm) augmente significativement le pourcentage en huile essentielle (0.31%, 0.36%, 0.37%) [16].

1.6.2. Composition chimique des feuilles

Les feuilles contiennent un tuberolactone et trois flavonoïdes (kaempférol, kaempférol-3-O-xyloside et kaempférol-3-4'-O-dixyloside) [4]. Rammamurthy et al. [17] mènent à isoler 9,10 dehydrohecogénine-3-O-glucose xylose galactoside, kaempférol-3-O-xyloside, α -D-glucoside et polianthosides B et C à partir des feuilles de *P. tuberosa*.

L'extraction par le méthanol de la partie aérienne de *P. tuberosa* de Japon suivi d'un fractionnement par le n-butanol et l'eau, et une analyse chromatographique, spectroscopique et hydrolyse acide de la fraction de n-butanol montrent que celle-ci contient un nouveau cholestane glycoside bidesmosidique, trois nouveaux spirostanol [18]. L'utilisation de 100 ppm de la spermidine ou l'ATP par arrosage ou trempage des bulbes avant culture a augmenté la teneur en caroténoïdes dans les feuilles (0.68 mg/g MF) [16].

1.6.3. Composition chimique des bulbes

Les bulbes de *P. tuberosa* s'avèrent contenir la lycorine, un alcaloïde qui cause des vomissements. Plusieurs sapogénines stéroïdiens comme l'hecogénine, 9-déhydroxyhecogénine et tigogénine aussi bien que glucidiques, 29-hydroxystigmast-5-en-3 β -yl β -D-glucoside, (22S)-2 β , 3 β , 22-trihydroxycholest-5-en-16 β -yl β -D-glucoside, diribofuranosylethylenglycol et spirostanol pentaglycosides ont été identifiés de la partie souterraine de *P. tuberosa* [19, 4].

Une série d'extraction des bulbes secs de *P. tuberosa* de Pakistan par l'éthanol, éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et le butanol successivement, suivi d'une purification par chromatographie sur gel silice et l'HPLC, et une identification par la spectroscopie de masse permettent d'identifier un composant majeur 2 β , 3 β , 16 β , 22 β tetrahydroxycholesta-5-ene 16-O- β -D-apiofuranoside [20].

Les mêmes étapes ont été suivies par Khan et *al.* [21] pour les bulbes de *P. tuberosa* de Pakistan, juste une différence durant la purification. Firdous et *al.* [20] ont sélectionné des fractions (après la première chromatographie sur gel silice), pour l'HPLC et la phase mobile est méthanol/eau (20:80), alors que, Khan et *al.* [21] ont fait l'HPLC pour toutes les fractions obtenues et la phase mobile est méthanol/eau (25:75), en plus d'une autre chromatographie sur gel silice a été faite (chloroforme comme éluant). Cette différence a permis d'identifier quatre composants: 3-29-dihydroxystigmast-5-ene-3-O- β -D-galactopyranoside, éthyl β -D-galactopyranoside, éthyl α -D-galactopyranoside et un alcool à longue chaîne 1-tricosanol, où l'activité cytotoxique, antibactérienne et antifongique de ces constituants est non significative [21]. L'extraction par méthanol de la partie souterraine suivie d'une chromatographie (gel de filtration puis une chromatographie en série), permet de séparer quatre nouveaux spirostanol saponines, avec cinq monosaccharides selon l'identification par les méthodes spectroscopiques et chimiques [22]. Jin et *al.* [19] ont effectué une extraction par l'éthanol des bulbes frais de *P. tuberosa* poussant en Chine, suivi par un fractionnement par le n-butanol et l'eau. Suivant l'analyse spectroscopique et l'hydrolyse acide et enzymatique de la fraction de n-butanol, six nouveaux stéroïdes glycosides-deux spirostanols, polianthoside B et C, quatre furostanols, polianthosides D-G ensemble avec sept spirostanols saponines connus, et un furostanol saponines connu ont été identifiés.

1.7. Activités biologiques

Les fleurs et les bulbes de *P. tuberosa* L. sont diurétiques et émétiques, utilisés localement pour les éruptions cutanées. Leurs extraits sont doués d'activités anti-inflammatoire et antispasmodique. La poudre des bulbes secs est utilisée pour la gonorrhée. L'arôme floral de tubéreuse a un excellent effet sur le cerveau et le cœur. Il peut aider à améliorer l'inspiration émotionnelle, psychologique et artistique, en stimulant le côté droit du cerveau [11]. Ajouté à ces propriétés plusieurs activités biologiques de *P. tuberosa* L. ont été citées en littérature :

1.7.1. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de fleurs montre qu'ils ont un effet réducteur ou scavenger contre les radicaux libres, les métaux de transition notamment le Fe, protégeant ainsi l'endommagement cellulaire, surtout au niveau de l'ADN. Maiti et *al.* [11] ont trouvé que l'extrait méthanolique, éthanolique et de dichlorométhane et l'aqueux des fleurs de *P. tuberosa* sont les meilleurs réducteurs de DPPH et d'ABTS⁺, en plus d'extraits d'acétate d'éthyle et d'hexane à faible effet scavenger contre le DPPH et l'ABTS⁺. En test de FRAP, l'extrait aqueux a donné un effet réducteur très significatif 0.315 ± 0.030 mM équivalent Fe²⁺/mg masse fraîche, suivi par l'extrait méthanolique, éthanolique et de dichlorométhane. Un effet faible réducteur a été trouvé par l'extrait d'acétate d'éthyle et d'hexane. La réaction de Fenton donne naissance au radical hydroxyle (OH•) qui endommage l'ADN, 500 mg/mL de chaque extrait de *P. tuberosa* a permis de lutter contre ce dernier. Les extraits méthanolique, éthanolique et de dichlorométhane ont protégé l'ADN contre une faible protection par l'extrait d'acétate d'éthyle et d'hexane. D'après ces données, les auteurs signalent que l'activité antioxydante est liée aux composants polaires (polyphénols et flavonoïdes), présents dans les extraits méthanolique, éthanolique, dichlorométhane et aqueux et absents dans l'extrait d'acétate d'éthyle et d'hexane (qui sert à extraire les composés apolaires).

1.7.2. Activité antimicrobienne

Selon Nidiry et Babu [9], la concrète de *P. tuberosa* L. ne possède aucune activité antifongique contre *Colletotrichum gloeosporioides*, tandis que, l'absolu a donné une inhibition de croissance modérée (à 500 mg/mL, 14 % d'inhibition, à 1000

mg/mL, 20.7 % d'inhibition, inférieur à 50 % d'inhibition). L'évaluation de l'activité antifongique de quelques constituants de l'absolu montre que le géraniol, méthyle anthranilate et l'indole sont doués d'une activité antifongique significative (EC_{50} : 100, 149 et 187 mg/mL) par rapport aux autres constituants benzyl acétate, phényl éthanol et benzyl benzoate (EC_{50} : 999, 1000 et 19480 mg/mL). Cette activité peut être liée aux structures chimiques des constituants et précisément ses groupements fonctionnels (la demi-aniline de méthyl anthranilate). L'extrait éthanolique et l'extrait d'éther de pétrole des feuilles de *P. tuberosa* L. ont un effet inhibiteur contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans* [23].

L'activité antibactérienne d'huile essentielle de *P. tuberosa* L. est de 22 mm d'inhibition contre *Staphylococcus aureus* et 15 mm d'inhibition contre *Escherichia coli* [24]. D'après Ghosh et al. [12], l'huile de *P. tuberosa* extraite par le CO₂ supercritique et soxhlet a montré un effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et la croissance de *Candida albicans*, par contre aucun effet trouvé contre *Helicobacter pylori* et *Vibrio cholerae*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits montre que l'extrait de CO₂ supercritique (40 °C, 100 bar) et l'extrait d'hexane (de soxhlet) sont les meilleurs inhibiteurs de croissance des microorganismes testés. Ces auteurs ont montré que l'activité antimicrobienne est due à l'aspect des huiles de *P. tuberosa* (qualitatif et quantitatif) par rapport aux autres extraits étudiés et à la présence dans ces huiles des composés ont une activité antimicrobienne déjà rapporté dans la littérature, tels que : acétophénone, eugénol, méthyl eugénol, alpha farnesene et beta bisabolene, dans l'extrait CO₂-SC (40°C, 100 bar) et p-xylène, limonène, méthyl eugénol dans l'extrait d'hexane.

L'extrait méthanolique des fleurs de *P. tuberosa* L. n'a aucune influence contre *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* résistante au méthicilline et *Bacillus subtilis*. Un effet positif a été trouvé contre *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli* à 40 µg/mL [24]. L'extrait éthanolique et d'éther de pétrole des feuilles ont un effet antibactérien (CMI : 100, 250 et 500 µg/mL) contre les bactéries à Gram+ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) et contre les bactéries à Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi*) [23].

1.7.3. Activité anti-inflammatoire

Il a été rapporté que les saponines de *P. tuberosa* L. ont une activité anti-inflammatoire [2]. Le traitement de 200 mg/kg d'extraits éthanolique et d'éther de pétrole des feuilles de *P. tuberosa* L. a un effet significatif contre l'œdème induite par la carraghénine comparé au Diclofenac sodique [23].

1.7.4. Activité anticancéreuse

Quatre saponines spirostanols isolés des bulbes de *P. tuberosa* L. sont doués d'une activité cytotoxique modérée contre les cellules HL-60 (IC₅₀: 3.9-9.0 µg/mL), et significative contre les cellules HSC-2 (IC₅₀: 1.5-13.0 µg/mL) comparé au témoin positif Etoposide (IC₅₀: 0.30 µg/mL pour HL-60 et 24.4 µg/mL pour HSC-2) [22]. Jin et *al.* [19] notent que les saponines ayant un groupe carbonyle à C-12 de l'aglycone ont montré une cytotoxicité plus forte (IC₅₀: 4.02- 8.61 µg/mL) contre les cellules Hela que les saponines sans le groupe carbonyle attaché à l'aglycone (IC₅₀ > 18.83 µg/mL).

1.7.5. Activité insecticide

L'extrait acétonique des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa* a un effet inhibiteur contre la chymotrypsine et aucun effet contre la trypsine ni les protéinases de *Helicoverpa armigera* [25], insecte nuisible envahisse les récoltes causant ainsi des pertes économiques considérables.

1.7.6. Activité molluscicide

Le traitement de *Lymnaea acuminata* par l'extrait éthanolique des bulbes de *P. tuberosa*, l'hécogénine et la tigogénine réduit la fécondation, l'éclosion des œufs, (la tigogénine cause la mortalité totale des descendants après 48h d'éclosion), il cause même une réduction en taux de protéines, acides aminés, acides nucléiques et l'activité de la phosphatase alcaline/acide. Une reprise de fécondation, d'éclosion, la survie des escargots traités, ainsi que, le taux de protéines, acides aminés et acides nucléiques et même l'activité de la phosphatase alcaline/acide ont été observée après un retrait de 7 jours dans une eau fraîche. La combinaison entre la poudre des bulbes avec un molluscicide synthétique a donné les mêmes résultats, et une combinaison entre la poudre des bulbes et ses constituants actifs : tigogénine, hécoogénine, azadirachtine, allicine,

thymol et 6-gingérol avec piperonyl butoxide causent une réduction significative de fécondation, éclosion, et la survie de petits escargots mais le retrait de ceux-ci dans une eau fraîche cause une reprise significative de fécondation chez *L. acuminata* [26-28].

1.7.7. Activité larvicide et de dissuasion

Rawani et *al.* [29] ont prouvé que 0.5% d'extrait brute des bourgeons mûrs de *P. tuberosa* est efficace contre les larves d'*Anopheles stephensi* (un vecteur de malaria dans les endroits urbains) et *Culex quinquefasciatus* (un vecteur pour *Wuchereria bancrofti* responsable de la filariasis) après 72h et 6 % de chaque extrait : d'acétate d'éthyle, de chloroforme : méthanol (1:1 v/v) et d'acétone sont efficaces contre les deux espèces après 72h.

1.8. Usage traditionnel

P. tuberosa gagne une popularité et une importance comme une plante ornementale dans le monde entier. Elle est cultivée et utilisée pour des pratiques médicinales depuis des époques préhispaniques [3,4]. Au Cambodge, au Laos et au Vietnam, les rhizomes sont utilisés pour calmer des spasmes et pour traiter la malaria. Aux Philippines, les rhizomes sont bouillis dans l'eau pour faire un liquide employé pour traiter la gonorrhée et les furoncles. En Chine, les rhizomes sont utilisés pour son effet sur les brûlures, l'infection et le gonflement [2,4]. En raison de la forte concentration de sapogénine dans leurs rhizomes et racines tubéreux, *P. tuberosa* a été utilisée en tant que substitut de savon. Pour cet usage, cette espèce est connue par le nom «amole» de Nahuatl qui signifie le savon [5].

Les fleurs de *P. tuberosa* sont la source de l'huile de tubéreuse de haute qualité qui reste aujourd'hui la matière première la plus chère du monde parfumeur. Les fleurs sont également utilisées pour les guirlandes artistiques, les ornements floraux, les bouquets et les boutonnières. Les longues hampes parfumées de fleur sont excellentes comme fleurs coupées pour la décoration de table. En Chine, les dames chinoises font des chapelets des fleurs de *P. tuberosa* pour lier les cheveux. En périodes victoriennes, ces fleurs sont utilisées en funérailles. Les chinois ont utilisé les fleurs sur les autels pour les cultes religieux et ancestrales [1,3,4].

1.9. Culture de *Polianthes tuberosa* L.

1.9.1. Culture traditionnel

Bien que fertile *P. tuberosa* se multiplie uniquement par voie végétative. Seuls les gros bulbes fleurissent. A l'arrachage en automne, les bulbes doivent être soigneusement détachés, nettoyés et stockés correctement. Il a été observé que les bulbes frais s'ils sont plantés, mènent seulement à la croissance végétative prodigue mais peu à la floraison. Le stockage des bulbes pendant 30 jours à 10°C est essentiel pour une production élevée de fleurs [6].

1.9.1.1 Préparation du sol

La parcelle est désherbée par les assolements antérieurs. Pour favoriser le drainage, le labour est profond, à 40cm. On enfouit la fumure de fond minéral, suivant l'analyse de terre, le fumier ayant été enfoui un an auparavant. Puis des façons superficielles sont pratiquées pendant l'hiver pour niveler et installer le système d'arrosage à la raie [6].

1.9.1.2 Plantation

a. Taille des bulbes

La taille des bulbes influence la floraison de *P. tuberosa*, les gros bulbes provoquent une floraison précoce et donnent un rendement plus élevé de fleurs et de hampes, alors que, les bulbes de 2.5 à 3.0 cm de diamètre produisent tôt la tige florale (96.7 jours) [1]. Ahmed et al. [30] et Hatamzadeh et al. [31] trouvent que les bulbes de 3.5 à 4.0 cm de diamètre sont les meilleures dimensions pour la plantation de *P. tuberosa*.

b. Temps de plantation

Le temps de plantation dépend des conditions climatiques de la région. La période de plantation de *P. tuberosa* dans l'hémisphère Nord est entre Mars et Juillet, quand le temps est chaud et humide. Dans l'hémisphère Sud, le temps de plantation est Novembre [1]. Selon Asif et al. [32], la plantation est recommandée entre la semaine dernière de Mars et la première semaine d'Avril pour une bonne croissance, meilleure fleurs coupées et une production élevée de bulbes de *P. tuberosa* à fleur simple. D'après Padaganur et al. [33], le mois d'Avril est la

période favorable pour une bonne production de *P. tuberosa* L. cv Single. La culture durant le mois d'Avril en Dharwad (Inde) où les précipitations sont de 44.10 mm, température maximale 37.3°C et minimale est 21.5 °C et le taux d'humidité est 57%, ces conditions climatiques engendrent une réduction de la période de germination des bulbes et l'émergence de la hampe, un nombre maximal de hampes et de fleurs par plant.

c. Profondeur de plantation

La profondeur de plantation de *P. tuberosa* dépend à la fois du diamètre des bulbes et de la texture du sol. Les gros bulbes sont plantés plus profondément que les petits et produisent significativement une plante prolongée, un rendement élevé de hampes et de bulbes. La profondeur varie de 4-7 cm selon la nature du sol. La plantation est plus profonde dans le sol de sable comparé au sol d'argile. Dans le sol sablo-limonneux, la profondeur de plantation à 6 cm est recommandée [1, 31, 32].

d. Arrosage

Il est recommandé d'arroser le terrain avant la plantation des bulbes pour fournir l'humidité suffisante pour la germination. Le nouvel arrosage pourrait être évité jusqu'à ce que les bulbes germent. Une teneur en humidité élevée au moment de la germination peut provoquer la pourriture des bulbes, et la même condition pendant la période de floraison affectera défavorablement le développement de la plante, et réduit la qualité des fleurs et le rendement des hampes.

La fréquence d'arrosage dépend principalement du type de sol, du stade phénologique et des conditions climatiques. Généralement, plus d'irrigation est exigée dans le sol léger et en temps sec. Habituellement, en été, la culture devrait être irriguée à l'intervalle de 5 à 7 jours, contre 10 à 12 jours, en hiver [1, 6].

1.9.2. Etudes sur la propagation de *P. tuberosa* L

Cela fait des années que *P. tuberosa* a fait l'objet de plusieurs études, et le but était aussi bien quantitatif que qualitatif. Les substances utilisées étaient généralement de deux natures : des engrais chimiques, ou des apports organiques/biologiques, généralement des biostimulants :

D'après Amin et al. [34], l'application de 155 kg P₂O₅/ha a augmenté significativement les fleurs chez *P. tuberosa* (19.3 t/ha et 24.7 t/ha) cultivée à Bangladesh, en utilisant des gros bulbes (3.7 cm de diamètre). Les travaux de Hussain et al. [35] montrent que l'application de 150 kg de K₂O/ha à 5cm de profondeur a réduit la durée de floraison chez *P. tuberosa* L., alors que l'application de cette dose de potassium à 15 cm de profondeur a augmenté le nombre de fleurs par plant. Selon Kumar et Singh [36], l'application de 300 kg de N/ha, en cultivant les gros bulbes de *P. tuberosa* L. (2.6-3.0 cm) a un effet positif sur la longueur des plants, le nombre de fleurs/hampe, le nombre de hampes, et sur la production des bulbes en terme qualitatif et quantitatif. Un effet similaire prouvé par Singh [27], où l'application de 200 kg de N/ha a produit des hampes longues avec un nombre important de fleurs/hampe. Nair et al. [37] trouvent dans leur travail que le rapport 30 :30 :15 g/m² de NPK est le meilleur pour une bonne production végétative, et le rapport 15 :90 :15 g/m² de NPK est admirable pour les fleurs coupées. Pour une production maximale de bulbilles le rapport de 30 :60 :15 g/m² de NPK est donc recommandé. Kadu et al. [38] révèlent dans leur travail que l'application de NPK en raison de 300 :150 :100 kg/ha sur *P. tuberosa* L. cv. Single, cultivée en Maharashtra (Inde) donne un nombre maximal de fleurs/plant (41.58) et un rendement maximal de fleurs/hectare (15.15 tonnes). Cependant, le traitement par NPK en raison de 200:200:100 kg/ha augmente la production de bulbes (25.68) et leurs poids (221.10 mg) par plant. Bahadoran et al. [39], trouvent que l'application des ordures de volailles a un effet positif sur la croissance de *P. tuberosa* L. cultivée en pots en Iran, dont l'application de 41.5 g et 49.0 g d'ordure a augmenté le nombre de fleurs/plant, tandis que l'application de 36.5 g d'ordures a augmenté le nombre de bulbilles/plant. Selon El-Sayed [40], la germination des bulbes de *P. tuberosa* L. ne dépend pas au fertilisant, mais elle dépend de la taille des bulbes, car les gros bulbes germent en premier. L'auteur conclut que l'usage des gros bulbes de tubéreuse pesés plus de 45 g, lorsqu'ils sont plantés dans des pots (20cm de diamètre) ; contiennent 2.5 kg sable/argile (1:1 v/v) et fertilisés par 2 g NPK (application mensuelle répété 3 fois) ; donne un effet significatif sur la croissance et la floraison de la tubéreuse. Selon Ikram et al. [41] l'effet des combinaisons de milieux (sable+fumier de ferme) donne un nombre maximal de feuilles et une propagation maximale de la plante. La fibre de coco+fumier de ferme donne une plante longue, et une longue hampe. Alors que, la combinaison

sable et le compost des feuilles conduit à une production importante de fleurs par plant. Kabir et *al.* [42], ont approuvé que l'usage des engrais chimique et leurs combinaisons avec des engrais organiques, tels que les ordures des volailles et des vaches, le vermicomposte ont un effet significatif sur la croissance et le rendement des feuilles, fleurs et bulbes par plant, les meilleurs résultats ont été relevés en appliquant la moitié des engrais chimiques recommandés NPK, gypse en plus de 20 t/ha d'ordures des volailles. Padaganur et *al.* [43] rapportent que l'application de 3 kg de vermicomposte+ moitié des engrais chimiques recommandés, donne le meilleur rendement en fleurs sous les conditions climatiques de Dharward (Inde).

D'après Bahadoran et *al.* [44], l'application de 5g/kg de zéolite dans des pots de 3 kg, où la culture de *P. tuberosa* a été effectuée sous serre; à température 30 ± 3 °C le matin et 20 ± 3 °C la nuit et une humidité de 55 ± 5 % a augmenté le long des plants, le diamètre des fleurs, le nombre de fleurs par inflorescence (17.7). Toutefois, le rapport de zéolite a diminué le nombre de bulbilles. Selon Asil et *al.* [45], l'application de 100 ppm d'acide gibbérellique a réduit la période requise pour la croissance chez *P. tuberosa*. Il a augmenté le long des feuilles, et la hampe et induit une floraison précoce, toutefois, cette concentration a réduit le nombre de fleurs par plant, l'application de benzylaldénine (cytokinins) n'a pas un effet significatif sur la croissance de *P. tuberosa* cultivée sous les conditions climatiques d'Iran. Tandis que, le trempage des bulbes dans 200 ppm d'acide gibbérellique après avoir stocké les bulbes pendant un mois, a amélioré la croissance et la floraison de *P. tuberosa* L. double. Pandhare et *al.* [46] trouvent qu'un prétraitement des bulbes de *P. tuberosa* par l'*Azotobacter*, une bactérie qui solubilise le phosphore (PSB), et l'usage des doses de NPK de 150 :225 :200 kg/ha ont un effet significatif sur le nombre de fleurs/hampe et par plant. Chaudhary [47], dans son travail trouve que l'application de l'*Azotobacter*, *Azospirillum*, PSB et champignon AM, non seulement ont amélioré les nutriments apportés par *P. tuberosa*, et stimulé les hormones de croissance et les antibiotiques, mais ils ont également amélioré la qualité de produit en faible cout de production, et substituent l'application des fertilisants chimiques. L'auteur annonce que, pour maximiser une croissance bénéfique des plantes, il faut identifier la meilleure souche de microorganismes, vérifier leurs compatibilités et efficacités combinés avant de les utiliser dans le système de production agricole,

en tant que candidats potentiels, pour les systèmes viables de l'horticulture et de la floriculture. Mahawer et *al.* [48] rapportent dans leur travail sur *P. tuberosa*, que le prétraitement des bulbes par les biostimulants a un effet significatif; sur les hampes coupées de *P. tuberosa* L. cv Phule Rajani. Les auteurs trouvent que les plantes pulvérisées par 4% Panchagavya+4% Manchurian champignons de thé, ont donné de bons résultats : longueur maximale des plants (69.02 cm), durée de floraison réduite (140.50 jours), nombre de fleurs par hampe important (50.17), nombre de hampes par plant (2.55) les résultats obtenus par les biostimulants sont mieux que ceux obtenus par l'application de NPK à 200 :150 :00 kg/ha. D'après le travail de l'Eid et *al.* [49], la pulvérisation de *P. tuberosa* L. cultivée en Égypte par 3.0 g/L de Zinc avec 100 ppm de Benzyladenine a un effet significatif sur les paramètres de croissance de la plante et augmente le taux de carbohydrates, alors que la combinaison de 1.5 g/L de Zn avec 50 ppm augmente le rendement en huile essentielle et augmente par conséquent, les teneurs en certains constituants d'huile essentielle, c'est le cas de tubérons, benzyl benzoate, pentacosane et geraniol. Selon Kashyap et *al.* [50], l'application de 5 kg/m² de fumier de ferme (FYM) +*Azotobacter* + PSB+NPK (20 :15 :12.5 g/m²) sur *P. tuberosa* L. réduit les jours requis pour la germination des bulbes, et augmente le nombre de feuilles/plant sous les conditions climatiques de l'Inde. Koley et Pal [51] trouvent que l'application de NPK (10 :4 :8 g/m²) + *Azotobacter* donne une hauteur maximale de la plante, nombre optimal de feuilles et fleurs/plant chez *P. tuberosa* L. cv Prajwal cultivée à l'ouest du Bengale.

II. BIOSTIMULANTS

Les biostimulants par définition sont des extraits obtenus à partir de matières premières organiques ; contenant des composés bioactifs. Les composants les plus communs des biostimulants sont les éléments minéraux, les substances humiques, les vitamines, les acides aminés, la chitine, le chitosane et les poly- et oligosaccharides [52]. Une autre définition et selon le Conseil Européen des Biostimulants : « Les biostimulants végétaux contiennent des substances et/ou des microorganismes dont la fonction, appliquée aux plantes ou à la rhizosphère, est de stimuler les processus naturels pour améliorer l'absorption des nutriments, la tolérance au stress abiotique et la qualité de la récolte. Les biostimulants n'ont

aucune action directe contre les parasites, et ne tombent donc pas dans le cadre réglementaire des pesticides ». L'effet des biostimulants selon le Conseil Européen des Biostimulants est le suivant : « Les biostimulants favorisent la croissance, et le développement des plantes tout au long du cycle végétatif de la germination des graines jusqu'à la maturité des plantes, sans s'y limiter, y compris : induire des augmentations de rendement et améliorer la qualité des cultures; l'augmentation de la tolérance et de la récupération des plantes par rapport aux stress abiotique; faciliter l'assimilation, la translocation et l'utilisation des nutriments; améliorer les attributs de qualité des produits, y compris la teneur en sucre, la couleur, l'ensemencement des fruits...etc.; rendre l'utilisation de l'eau plus efficace, renforcer certaines propriétés physico-chimique du sol et favoriser le développement de micro-organismes complémentaires du sol » [53]. Dans ce travail nous intéressons à la possibilité d'utiliser l'acide humique, l'hydrolat de plumes de poulet, le marc de café et les grignons d'olive comme des biostimulants pour la culture de la tubéreuse.

2.1. Acide humique

Les substances humiques sont les produits finaux de la décomposition microbienne et de la dégradation chimique du biota mort dans les sols. Cet assemblage complexe de molécules provenant de débris végétaux et animaux, représente l'un des matériaux organiques les plus abondants sur la terre. Les substances humiques sont présentes à la fois dans les milieux aquatiques, et dans l'atmosphère et représentent les principaux composants du mélange de matériaux qui composent la matière organique du sol. Dans le sol, les substances humiques jouent un rôle clé dans diverses fonctions du sol et des plantes, comme le contrôle de la disponibilité des éléments nutritifs, l'échange de carbone et d'oxygène entre le sol, l'atmosphère, la transformation et la protection contre les produits chimiques toxiques. De plus, les substances humiques dans les sols affectent la physiologie des plantes ainsi que la composition et la fonction des microorganismes de la rhizosphère [53,54].

2.2. Hydrolat des plumes de poulet

Les plumes de poulet sont un sous-produit de la volaille, constituées de protéines kératinisées (90%), générées en millions de tonnes par an. La biodégradation des

plumes par *Chryseobacterium* sp produit des peptides et plusieurs acides aminés, comme la glycine, l'alanine, la sérine, la cystéine, la valine et les micro et macroéléments, qui peuvent être une bonne source d'azote organique, bénéfique pour les plantes et qui stimule l'activité microbienne dans le sol. Par conséquent, le concentré riche en protéines issu des plumes peut être utilisé pour l'agriculture biologique [55].

En fait, il existe trois méthodes principales qui peuvent être appliquées aux plumes pour obtenir une solution riche en protéines hydrolysées :

2.2.1. Hydrolyse acide des protéines

La fabrication des hydrolats acides nécessite des réacteurs. Les facteurs déterminants pour l'hydrolyse acide sont la concentration et le type d'acide (acide chlorhydrique ou acide sulfurique), la température (250-280°F), la pression (32-45 psi), le temps d'hydrolyse (2-8h) et la concentration en protéine (50-65%). Tous ces éléments indépendamment combinés auront un impact sur la qualité du produit élaboré [56].

2.2.2. Hydrolyse alcaline des protéines

L'hydrolyse alcaline est un processus assez simple et direct. D'abord, la protéine est solubilisée par chauffage, suivie de l'addition d'agents alcalins tels que l'hydroxyde de calcium, de sodium ou de potassium, et le maintien de la température jusqu'à un point défini (80-130°F). L'hydrolyse sera poursuivie pendant plusieurs heures jusqu'au degré d'hydrolyse souhaité est atteint, ensuite le produit est évaporé, pasteurisé et séché par pulvérisation [56].

2.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines

La plupart des enzymes utilisées pour fabriquer des hydrolats de protéines pour des applications en biotechnologie sont obtenues à partir de sources animales, végétales et microbiennes. Les enzymes les plus utilisées pour les hydrolats de protéines d'origine animale sont la pancréatine, la trypsine et la pepsine. La source végétale est la papaïne, et celles de la source microbienne sont les protéases [56].

Les hydrolats de protéines sont produits par hydrolyse enzymatique, chimique ou thermique de divers résidus animaux (plumes de poulet) et végétaux. Les acides

aminés individuels comprennent les vingt acides aminés structurels, impliqués dans la synthèse des protéines et d'acides aminés non protéiques, qui sont abondants dans certaines espèces végétales et animales. Ces acides aminés sont absorbés à la fois par les racines et par les feuilles, puis transportés dans la plante [54]. Ils ont la capacité d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote des plantes et de stimuler la photosynthèse et la croissance des plantes. Leurs effets sur le métabolisme du carbone et de l'azote, aussi sur le métabolisme primaire et secondaire des plantes sont déterminés. L'activité hormonale, y compris l'activité auxine-like et l'activité gibbérelline-like a été également attribuée aux acides aminés et aux peptides [57].

2.3. Marc de café

Aujourd'hui le café est considéré après l'eau la seconde boisson préférée, dans le monde entier. L'hors de son production, le marc de café est résulté après la percolation de la poudre des graines, il a été estimé que 650 Kg de marc de café est généré d'un ton de café préparée de poudre, et en moyen 6 millions de ton de marc de café est généré dans le monde après préparation de café. Vue sa richesse en polyphénols (acide chlorogénique, caféine et tanins), polysaccharides (mannose, galactose, arabinose et glucose) et en minéraux (phosphore, calcium et azote), le marc de café a été largement étudié en ces derniers 10 ans comme fertilisant et comme fourrage pour les animaux, et aussi comme herbicide naturel [58,59]. Yamane et *al.* [60]. trouvent que l'application de marc de café a augmenté la teneur en N et en C dans le sol.

2.4. Grignons d'olive

Le grignon d'olive est produit en grande quantité dans de nombreux pays méditerranéens entre novembre et février, qui représente un problème environnemental important dans la zone. Une fois que les olives ont été moulues en pâte, la pâte est séparée en trois composants; l'eau végétale, l'huile et le grignons. Les grignons contiennent les peaux, la pulpe et les fragments de noyaux. Leurs concentrations élevées en phénol, lipides, en acides organiques les transforment en matériaux phytotoxiques, mais ces déchets sont riches de ressources précieuses telles qu'une grande proportion de matière organique et une large gamme d'éléments nutritifs qui pourraient être recyclés. Les grignons

d'olives pourraient être appliqués au sol, comme amendement du sol ou lors de son élimination [61, 62]. Winkelhausen et *al.* [63], reportent dans leur travail que les polyphénols extraits de grignons d'olives ont un effet antifongique contre *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum*. Alors que Assaf et *al.* [62], dans leur travail trouvent que l'application de grignons d'olives, dans le sol a augmenté la population de mycorhize arbuste (arbuscular mycorrhizal) fongique chez *Cicer arietinum* L. Selon Brunetti et *al.* [64], l'application des grignons d'olives dans le sol a apporté des modifications sur les substances humiques, surtout l'augmentation de l'oxygène et les groupements fonctionnels acides, le rapport C/N, et en parallèle diminution dans le rapport C/H et la teneur en N et en C.

III : COMPOSES PHYTOCHIMIQUES, METHODES D'EXTRACTION ET APPLICATIONS

3.1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées depuis la nuit des temps notamment pour les cérémonies religieuses. On obtient des huiles essentielles pures à l'issue d'une distillation (ou autre méthode extractive) des substances aromatiques, ou des essences présentes dans les plantes. Ces extraits naturels sont largement employés en parfumerie. Non grasse et très volatiles, les huiles essentielles sont donc très différentes des huiles végétales, animales ou minérales [65,66].

Dans la nature, les huiles essentielles ont un important rôle protecteur en faveur des plantes. Elles servent en tant qu'agents antibactériens, antiviraux, antifongiques, et insecticides, et voire même des effets contre l'action des herbivores. Dans certains cas, les huiles essentielles attirent les insectes pollinisateurs (le cas des abeilles), par contre, elles repoussent les insectes envahissants. Les huiles essentielles sont généralement liquides, volatiles, transparentes, rarement colorées, solubles dans les solvants organiques, et elles ont des densités moins faible que celle de l'eau. Synthétisées par tous les organes de plant, tels que bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, graines, fruits, racines et écorces. Les huiles essentielles sont stockées à l'intérieur des cellules sécrétrices, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques et des trichomes glandulaires [67].

3.1.1. Origine et extraction

Les huiles essentielles utilisées dans la composition d'un parfum sont généralement fabriquées à partir de matières premières d'origines végétales : fleurs (Jasmin, tubéreuse), herbes, fruits (anis), zestes des agrumes, graines (noix de muscade), feuilles (eucalyptus), écorces (cannelle), rhizomes et racines, d'origines animales : musc, castoréum, civette, ambre gris, cire d'abeille et hytaceum et d'origines synthétiques : aldéhydes [68, 69]. L'étude actuelle se base sur les matières végétales dont les huiles essentielles peuvent être extraites par différentes méthodes y compris :

3.1.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau

La plante placée dans un alambic est traversée par un courant de vapeur d'eau, les principes volatiles, peu soluble dans l'eau, sont entraînés et après condensation, séparés du distillat par décantation dans un récipient spécial ou vase florentin (Figure 1.2) [70].

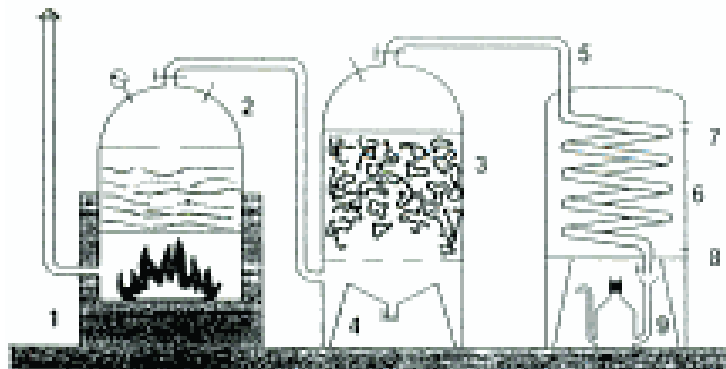


Figure 1.2 : Alambic de distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

1 : foyer, 2 : chaudière, 3 : vase à fleurs, 4 : vidange de condensation, 5 : col de cygne, 6 : réfrigérant type serpentin, 7 : sortie d'eau chaude, 8 : arrivée d'eau froide, 9 : essencier servant à la décantation de l'essence et de l'hydrolat [70].

3.1.1.2. Expression à froid

Expression à froid est principalement utilisée pour les écorces d'agrumes (différentes espèces de *Citrus*) qui renferment une quantité importante d'huiles essentielles. Cette opération mécanique vise à éclater les vésicules qui contiennent l'essence dans les zestes des agrumes frais. Dans ce cas, on utilise le terme « essence » plutôt que « huile essentielle » [70,71].

3.1.1.3. Hydrodistillation

Hydrodistillation est la méthode la plus simple, et la plus ancienne pour obtenir les huiles essentielles de plantes. Dans cette méthode, l'échantillon est conditionné dans une unité de distillation en ajoutant l'eau, celle-ci est portée à l'ébullition en appliquant une chaleur douce (distillation d'eau), alternativement, la vapeur est directement injectée dans l'échantillon (distillation par vapeur directe). Les huiles essentielles sont libérées des glandes d'huile présentes dans les tissus de la plante (due aux effets de l'eau chaude et la vapeur). Le mélange vapeur d'eau-huile est condensé, lorsqu'il reparte le condensateur. Du condensateur, l'hydrolat coule dans un séparateur, où l'huile essentielle est séparée automatiquement de l'eau. Au laboratoire, l'extraction d'huiles essentielles des fleurs est accompli par hydrodistillation à l'aide d'un montage de type Clevenger. Dans cette méthode, la distillation d'eau est employée, où l'échantillon chargé dans le ballon de ce montage est complètement immergé dans l'eau, puis porté à l'ébullition [72].

3.1.1.4. Enfleurage et solvant chimique

Lorsque l'huile essentielle est altérable par entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation, l'extraction peut être effectuée soit par graisse, ou de préférence par solvant volatile à faible point d'ébullition comme l'éther de pétrole ou le benzène. Dans certains cas, l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau ne donnera pas un rendement satisfaisant d'huile parce que la matière volatile n'est produite que dans les plantes vivantes et seulement en petites quantités qui sont stockées dans les tissus végétaux, c'est le cas de tubéreuse (*P. tuberosa*). Donc nous devons donner à la fleur l'occasion de continuer à vivre et à excréter ses composants odoriférants pour que nous puissions les rassembler. L'industrie de parfum au sud de la France a résolu ce problème en utilisant la graisse. Ce que l'on appelle « enfleurage », s'effectue de la manière suivante : les fleurs sont disposées à température ambiante sur des plaques de graisse qui ont pour but d'absorber le parfum (Figure 1.3). Une fois la plaque est bien imprégnée, la matière grasse est séparée de l'huile essentielle à l'aide d'un solvant (alcool dans laquelle la graisse est insoluble). Quoique par cette méthode, on obtiendra des huiles essentielles de grande qualité, elle est peu utilisée aujourd'hui, parce que très coûteuse [71, 73].



Figure 1.3: Méthode de l'enfleurage. Les plaques de graisse [69]

L'extraction par des solvants volatils est pratiquée au niveau industriel pour l'extraction des huiles essentielles des fleurs. Les fleurs sont placées dans d'énormes cuves en acier appelées extracteurs, et soumises à des lavages successifs aux solvants qui se chargent ainsi de leur parfum. Après décantation et filtrage, le solvant est évaporé afin d'obtenir une sorte de pâte fortement odorante appelée **concrète**. Après une série de lavages à l'alcool dans des batteuses mécaniques et de glaçages, la concrète donne naissance à une essence pure appelée **absolu**. L'huile essentielle ainsi obtenue peut garder des traces du solvant organique utilisé dans l'opération (2 ou 3 %) [69, 71, 72].

3.1.1.5. Extraction au CO₂ supercritique

Extraction au CO₂ supercritique est une technique moderne, très coûteuse : du dioxyde de carbone à haute pression est employée pour faire exploser les poches végétales contenant l'essence, qu'il est alors possible de récupérer (Figure 1.4) [71]. L'huile essentielle ainsi obtenue est de bonne qualité et exempte du solvant organique.

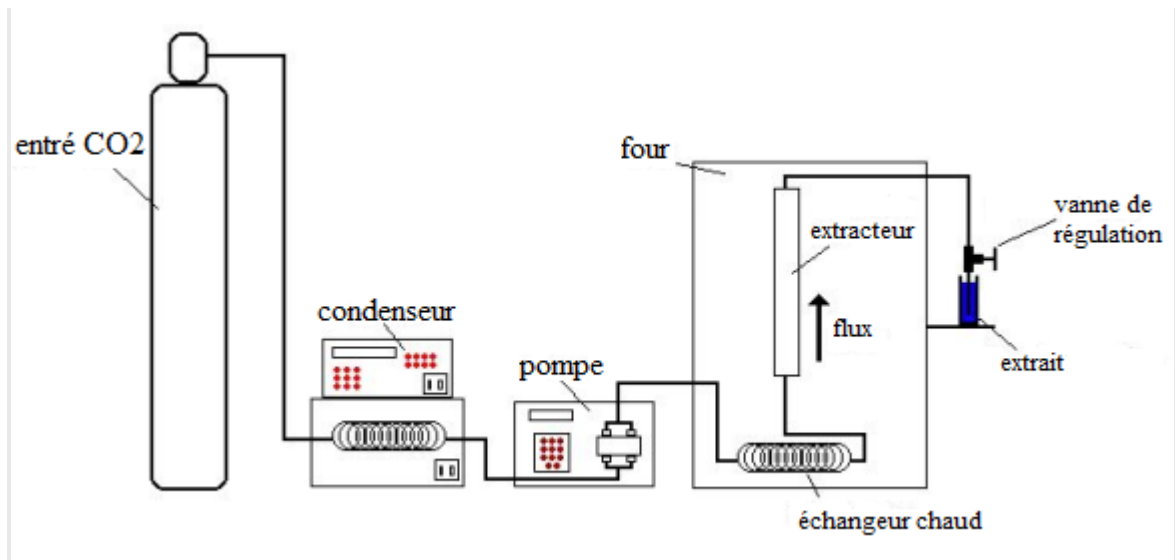


Figure 1.4 : Procédé d'extraction au CO₂ supercritique [12].

3.1.2. Composition chimiques des huiles essentielles

Généralement, l'étude phytochimique d'huile essentielle s'effectue soit par la chromatographie phase gazeuse CG (analyse quantitative), ou par la chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CG-SM (analyse qualitative). On trouve généralement de nombreux constituants dans une huile essentielle appartenant principalement à trois groupes chimiques :

- Les composés terpéniques : on trouve surtout des mono-sesquiterpène, qui sont issus de métabolisme d'isoprène (isopentyl diphosphate), les carbures peuvent acyclique, monocyclique ou bicyclique et porteurs des groupements fonctionnels variés : alcools, cétones, esters et/ou phénols.
- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane : ils sont moins répandus que les précédents, ce sont souvent des benzoïdes, des allylphénols quelquefois aussi des aldéhydes.
- Les dérivés des acides gras : sont souvent considérablement modifiés (oxidés, esterifiés, méthylés....etc.).

Autres composants de fragrance, tels que les alcools à chaîne courte et les aldéhydes, qui sont synthétisés par conversion ou dégradation métabolique des phospholipides et des acides gras sous l'action concertée de la lipoxygénase, hydroperoxyde liyase, isomérase et déhydrogénase [68, 70].

3.1.3. Vertus des huiles essentielles

Certaines huiles naturelles ont été mentionnées plus tôt, mais les huiles essentielles sont très importantes et ont des effets si différents qu'elles doivent être classées seules. Les plantes aromatiques et leurs huiles sont largement exploitées dans différents domaines :

3.1.3.1. Effets physiologiques

Plusieurs huiles essentielles ont des effets anti-inflammatoires, comme le bisabolol, trouvé dans la camomille et l'huile volatile de curcuma. Les huiles essentielles possèdent également un effet bactéricide ou bactériostatique, telles que les huiles essentielles de *Artemisia afra*, *Pteronia incana*, *Rosmarinus officinalis* et *Polianthes tuberosa*, un effet antiviral, antioxydant et anticancéreuse [68].

3.1.3.2. Intérêt psychique

L'aromathérapie traditionnelle divise les huiles essentielles en celles qui sont yin (passive, calmante) et celles qui sont yang (active, stimulante). Bien que ce ne soit ni une définition scientifique ni exclusive, en effet, chaque huile est considérée plus stimulante que calmante. Des études décrivent les effets des odeurs sur la mémoire et l'humeur, puisque les composés de parfum absorbés par l'inhalation sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, et d'interagir avec des récepteurs dans le système nerveux central [68].

3.1.3.3. Intérêt cosmétique

Des études ont démontré que le système conservatif dans un produit cosmétique peut être augmenté, en utilisant un mélange d'huiles essentielles naturelles, ayant des propriétés antibactériennes, mais l'efficacité de ces huiles est différente et dépend à la fois du type et de la concentration de l'huile, aussi bien que la souche microbienne d'essai. Les huiles essentielles sont employées dans les parfums, formulations de la peau, et produits de soins des cheveux et pour fournir la brillance.

Les produits cosmétiques peuvent également contenir des huiles essentielles, comme agents de refroidissement (comme le menthol, le camphre, les huiles de

ment et d'eucalyptus), et les dérivés de menthol qui donnent une sensation de fraîcheur durable à la peau [68].

3.1.3.4. En parfumerie

La parfumerie est l'application principale d'huiles essentielles, concrète, absolus et autres résinoïdes de plantes. L'admiration du parfum de fleur a rapidement transformé les substances volatiles en marchandise commerciale à haut-impact. Depuis de nombreuses années, la recherche sur le parfum floral, s'est concentrée sur son élucidation chimique couplée à la synthèse chimique, pour produire de grandes quantités exigées par les industries alimentaires et de parfumerie. Les extraits de fleurs comme celui de rose, tubéreuse, narcisse, gardénia et lavande, ses absolus ou concrètes sont utilisés en parfumerie, en cosmétique et en tant que parfum thérapeutique. Les ingrédients de parfumerie d'origine naturelle viennent des huiles essentielles, elles-mêmes peuvent être considérées comme parfum créatif, car elles contiennent des constituants parfaitement mélangés, qui une fois ajoutée à une composition de parfum améliorent l'odeur.

Bien que les composés de parfum modernes s'appuient fortement sur l'impact, et la longévité, qui peuvent être obtenus avec des synthétiques, beaucoup de composés réussis de parfum contiennent toujours des quantités significatives d'huiles essentielles naturelles [68].

3.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une des principales classes des métabolites secondaires des plantes, ayant des structures et des fonctions très diverses. Ce sont des dérivés non azotés qui possèdent, au minimum, un cycle aromatique portant un à plusieurs groupes hydroxyles [74,75].

Un composé phénolique est issu du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate. Ces deux voies d'aromagenèse sont en effet, sauf rares exceptions, celles qui permettent au végétal de construire le noyau aromatique:

- La voie de l'acide shikimique conduit aux acides cinnamiques et à leurs dérivés : acides benzoïques et phényl propanoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines ;
- La voie de l'acétate conduit, par cyclisation d'un polyacétate, aux chromones, orcinols et autres quinones ;

- La participation simultanée de ces deux précurseurs à un même processus conduit pour sa part aux stilbènes, pyrones, flavonoïdes, anthocyanosides et autres proanthocyanidols.

Les polyphénols peuvent se trouver à l'état libre, conjugués ou polymérisés. Ils ne sont pas répartis uniformément dans les tissus ou les cellules des plantes, et peuvent être associés à des composants de la paroi cellulaire, tels que les polysaccharides et les protéines [75].

Au niveau des plantes, les phénols jouent un rôle important dans la protection contre la photo-oxydation. Ils sont également impliqués dans la défense contre les maladies, les infections, les blessures, les rayons UVs et les insectes. En plus des effets protecteurs, ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables de la couleur (teintes automnales des feuilles et couleurs des fleurs et fruits), du goût et des propriétés organoleptiques de la plante [76, 75]. Les polyphénols se trouvent dans le thé (vert et noir), le café, les fruits, les jus, les légumes, l'huile d'olive, le vin (rouge et blanc) et le chocolat [76].

3.2.1. Méthode d'extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols est une étape délicate et très importante, et considéré comme l'étape première lors de l'utilisation des constituants phytochimiques dans les préparations pharmaceutiques, agroalimentaire et cosmétique. Avant l'extraction des composés phénoliques, l'échantillon doit être collecté, réservé et préparé proprement, le soin et la prudence sont indispensables pour minimiser le risque de perte des composés bioactifs. Pour cette raison, et pour éviter la dégradation des polyphénols, les échantillons doivent être séchés, congelés ou lyophilisés, puisque la présence d'eau ou d'humidité déclenche l'activité des hydrolases, aussi le chauffage, l'exposition à la lumière et l'oxygène affecte la composition en polyphénols [77]. Il existe plusieurs méthodes anciennes et récentes pour l'extraction des polyphénols y compris :

3.2.1.1. Extraction liquide-liquide ou solide-liquide

Les méthodes d'extraction liquide-liquide (partage ou fractionnement) et solide-liquide (macération), sont les plus utilisées avant l'analyse des polyphénols et les phénols simples. Les solvants d'extraction largement acceptés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone et l'acétate d'éthyle. Cependant, les acides

phénoliques les plus polaires (acide benzoïque et acide cinnamique) ne peuvent pas être extraits par les solvants organiques purs, mais le mélange alcool-eau ou l'acétone-eau sont recommandés. Les conditions expérimentales tels que la température, le rapport échantillon/solvant, le nombre et le temps d'extraction, jouent également un rôle important dans la procédure d'extraction des polyphénols, l'extraction se répète 2-3 fois et les extraits sont ensuite combinés [78].

3.2.1.2. Extraction par micro-ondes

L'extraction par micro-ondes est un procédé utilisant l'énergie micro-ondes pour faciliter la répartition des analytes à partir de la matrice d'échantillon dans le solvant. Le principal avantage de cette technique est la réduction de temps d'extraction, et le volume de solvant par rapport aux techniques d'extraction classiques. Cette méthode d'extraction a été utilisée pour l'extraction de certains composés phénoliques à structure moléculaire simple, tels que les acides phénoliques, quercétine, isoflavone qui ont été stables sous les conditions de chauffage assisté par micro-ondes à température jusqu'à 100 °C pendant 20 mn. Les composés phénoliques ont un nombre important en groupements d'hydroxyle qui sont sensibles à une température élevée, dans ce cas cette méthode ne peut pas être utilisée due à la dégradation prévue sous les conditions de micro-ondes [79].

3.2.1.3. Extraction par ultrasons

L'extraction par ultrasons est une technologie potentielle utile, car elle n'exige pas des instruments complexes (juste un bain ultrasons). Elle est relativement peu coûteuse. Elle peut être utilisée à la fois pour une petite et grande échelle dans l'industrie phytopharmaceutique [79]. Les radiations ultrasonores provoquent des ruptures au niveau des membranes biologiques, libérant ainsi les composés extractibles et améliorent la pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires, et augmentent l'échange substrat-solvant et donnent un rendement élevé des composés d'intérêt, en courte durée et en utilisant une petite quantité du solvant [80]. L'extraction par ultrasons est largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la plante, feuilles, tiges, fruits,

graines....etc. Elle a l'avantage de réduire la dégradation des composés phénoliques par rapport aux autres méthodes [79]

3.2.1.4. Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique est une méthode récente. Elle a des avantages plus que les méthodes conventionnelles, où l'absence de l'effet de température, inconsommable de l'énergie et elle établit un produit de haute qualité, dépourvu des traces des solvants organiques nocifs. Cette méthode utilise comme solvant le CO₂ pour l'extraction, qui est non toxique, stable chimiquement et disponible. Toutefois, le CO₂ est un peu polaire, donc ça se diffère de la nature chimique des polyphénols [80].

3.2.2. Vertus des polyphénols

Certaines plantes et épices font partie des traditions ancestrales à travers le monde entier, mais avec les progressions scientifiques actuelles, les chercheurs et par leurs travaux scientifiques ont permis de confirmer les propriétés médicinales entre autres attribués aux polyphénols à savoir :

3.2.2.1. Vertus médicinales

Notre organisme, soumis à un stress oxydant, responsable des maladies cardiovasculaire, cancer et les maladies neurodégénératives. L'effet préventif des polyphénols a été de mieux en mieux établis par leurs effets anti-inflammatoire, antithrombotique, antiallergique, antivirale, hépatoprotectrice et anticarcinogène. Ces effets protecteurs sont observés à 3 niveaux grâce aux données épidémiologiques (alimentations riches en polyphénols), aux données expérimentales et par des études *in vivo* sur des cellules en culture [74].

3.2.2.2. Vertus agroalimentaires

L'ingestion de flavonoïdes d'origine alimentaire a été associée à une réduction considérable de la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires. Ghedira et *al.* [81] rapportent que la consommation de quercétine dans les oignons (0,3 mg/g de masse fraîche) et les pommes (1 mg/g de masse fraîche de la peau de pommes) sont inversement corrélatives au risque de cancer du poumon. D'après Edeas [74], les polyphénols peuvent être utilisés comme conservateur des aliments, où

les catéchines présentent dans le thé et dans certains cas peuvent substituer l'acide ascorbique ou des agents de conservation chimiques tels que le BHT (hydroxytoluène butylé) et le BHA (hydroxyanisole butylé) qui sont des agents cancérigènes.

3.2.2.3. Vertus cosmétiques

Les polyphénols sont des antioxydants par excellence et leur effet est bien établi. Pour lutter contre la production des radicaux libres néfastes à la santé, à la beauté et déclenche un vieillissement rapide de la peau, comme de l'organisme. Selon Edeas [74], les laboratoires pharmaceutiques ont mis au point des cosmétiques contenant des polyphénols aux propriétés antioxydantes à la fois pour leur effet conservateur et pour leur action anti-inflammatoire due à l'exposition aux rayons UV.

3.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont dérivés de sources végétales, ils sont basiques, ils contiennent un ou plusieurs atomes d'azote (habituellement dans un cycle hétérocyclique). Ils ont habituellement une action physiologique marquée sur l'homme ou d'autres animaux. Les plantes contenant des alcaloïdes constituent un groupe extrêmement varié à la fois taxonomiquement et chimiquement [82], un azote basique étant le seul facteur pour les différentes classes :

***Alcaloïdes vrais** : sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.

***Pseudo-alcaloïdes** : ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques.

***Proto-alcaloïdes** : sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés [83].

3.3.1. Extraction des alcaloïdes

Les méthodes d'extraction varient selon l'échelle et le but de l'opération, et selon la matière première. Pour de nombreuses recherches, la chromatographie donne des résultats rapides et précis. Cependant, si une quantité appréciable d'alcaloïde est nécessaire, l'une des méthodes générales suivantes sera habituellement utilisée :

* la poudre du matériel est humidifiée par l'eau et mélangée avec la chaux qui se combine avec des acides, des tanins et d'autres substances phénoliques et libère les alcaloïdes (s'ils existent dans la plante sous forme de sels). L'extraction est ensuite réalisée avec des solvants organiques tels que l'éther de pétrole. Le liquide organique concentré est ensuite agité avec l'acide et laissé se séparer. Les sels d'alcaloïdes sont maintenant dans le liquide aqueux, tandis que de nombreuses impuretés restent dans le liquide organique.

* la poudre du matériel est extraite par l'eau ou l'alcool aqueux contenant l'acide dilué. Les pigments et autres matières indésirables sont éliminés par agitation avec le chloroforme ou d'autres solvants organiques. Les alcaloïdes libres sont précipités par l'ajout de bicarbonate de sodium ou d'ammoniaque et séparés par la suite par filtration ou par solvant organique.

L'extraction et la purification finale d'un mélange d'alcaloïdes peuvent parfois être effectuées par précipitation fractionnée, ou par cristallisation fractionnée de sels tels que des oxalates, des tartrates. L'extraction par fluide supercritique, bien qu'elle ne soit pas encore appliquée à de nombreux alcaloïdes, deviendra probablement de plus en plus importante pour ces composés [82].

3.3.2. Mis en œuvre

La mise en évidence des alcaloïdes est basée généralement sur des réactions de précipitation. Elle fonde sur la capacité des alcaloïdes à se combiner avec des métaux et des métalloïdes : mercure, tungstène, iode...etc. Dans la pratique, il y a des réactifs utilisés y compris : réactif de Mayer (tétraiodomercurate) qui donne un précipité blanc, le réactif de Hager (solution saturée d'acide picrique) qui donne un précipité jaune, et il y a le réactif de Dragendorff (le tétraiodo bismuthate de potassium) qui donne un précipité marron rougeâtre, mais la spécificité de ces réactifs n'est pas absolue, des protéines, des α -pyrones, certaines coumarines et des hydroxy-flavones, des lignanes et autres composés peuvent donner des

réactions faussement positives avec le réactif de Dragendorff. Ces réactifs permettent de caractériser la présence des alcaloïdes, et sont utilisés pour la révélation des plaques de CCM, mais ils sont insuffisants pour déterminer la qualité et/ou la quantité des alcaloïdes. Dans ce cas et comme pour la plupart des autres métabolites secondaires des végétaux, les méthodes d'identification sont la CCM, l'HPLC en phase normale ou en phase inverse (avec des solvants de type eau-méthanol ou eau-acétonitrile). La non-volatilité de la quasi-totalité des alcaloïdes limite l'utilisation de la CG-SM à quelque cas particuliers [82,83].

3.3.3. Alcaloïdes d'Amaryllidacée

Les Amaryllidacées sont richement représentées au niveau des sous tropiques. Ils ont des centres de diversité prononcés en Afrique du Sud et dans la région Andine. Certains genres sont également présents dans la région méditerranéenne et dans les régions tempérées d'Asie [84].

Une caractéristique particulière des Amaryllidacées est la présence constante des alcaloïdes Amaryllidacée, qui représentent un groupe important et toujours en expansion d'alcaloïdes d'isoquinoline. A ce jour, plus de 500 alcaloïdes d'Amaryllidacées, divers structurellement ont été isolés, et bien que leurs structures varient considérablement, ces alcaloïdes sont considérés comme biogénétiquement liés [84,85]. Les alcaloïdes d'Amaryllidacées sont classés principalement en neuf types selon leur squelette, les alcaloïdes représentatifs sont : norbelladine, lycorine, homolycorine, crinine, hémanthamine, narciclasine, tazettine, montanine et galanthamine (Figure 1.5). Comme les alcaloïdes des espèces de la famille des Amaryllidacées appartiennent principalement à l'un de ces sous-groupes, ils peuvent servir d'outil de classification pour inclure les genres et les espèces de cette famille [84]. La plupart des alcaloïdes d'Amaryllidacées disponibles dans le commerce sont obtenus à partir de leurs sources naturelles, seulement quelques-uns sont produits synthétiquement. Bien que plusieurs synthèses chimiques aient été décrites pour la galanthamine, la narciclasine et d'autres alcaloïdes d'Amaryllidacées, les chimistes ont encore du mal à concevoir une voie de synthèse courte pouvant être utilisée pour produire ces composés à une échelle commerciale économique [85].

3.3.4. Vertus des alcaloïdes d'Amaryllidacée

Les plantes de la famille d'Amaryllidacée ont été utilisées pendant des milliers d'années comme remèdes à base de plantes. Les alcaloïdes de leurs extraits ont fait l'objet d'une recherche chimique active pendant près de 200 ans. Au cours des trois dernières décennies, beaucoup ont été isolés, criblés pour différentes activités biologiques, qui sont énumérés comme suivant :

* Lycorine est un émétique, analgésique, anti-inflammatoire, stimulant respiratoire, expectorant. Elle traite la bronchite et l'asthme, inhibe la peroxydase, inhibe la synthèse de l'acide ascorbique et la croissance cellulaire, inhibe la synthèse des protéines, inhibe la synthèse d'ADN, antitumeur, agent cytotoxique, antimalaria, insecticide, antifeedent pour les insectes [86]. En plus, la lycorine est un hepatoprotecteur [87], il inhibe la nitrique oxide synthase induit (iNOS), il est antiviral (flavivirus), hypotensive, antifongique, antiplaquettaire, antifertilité [84].

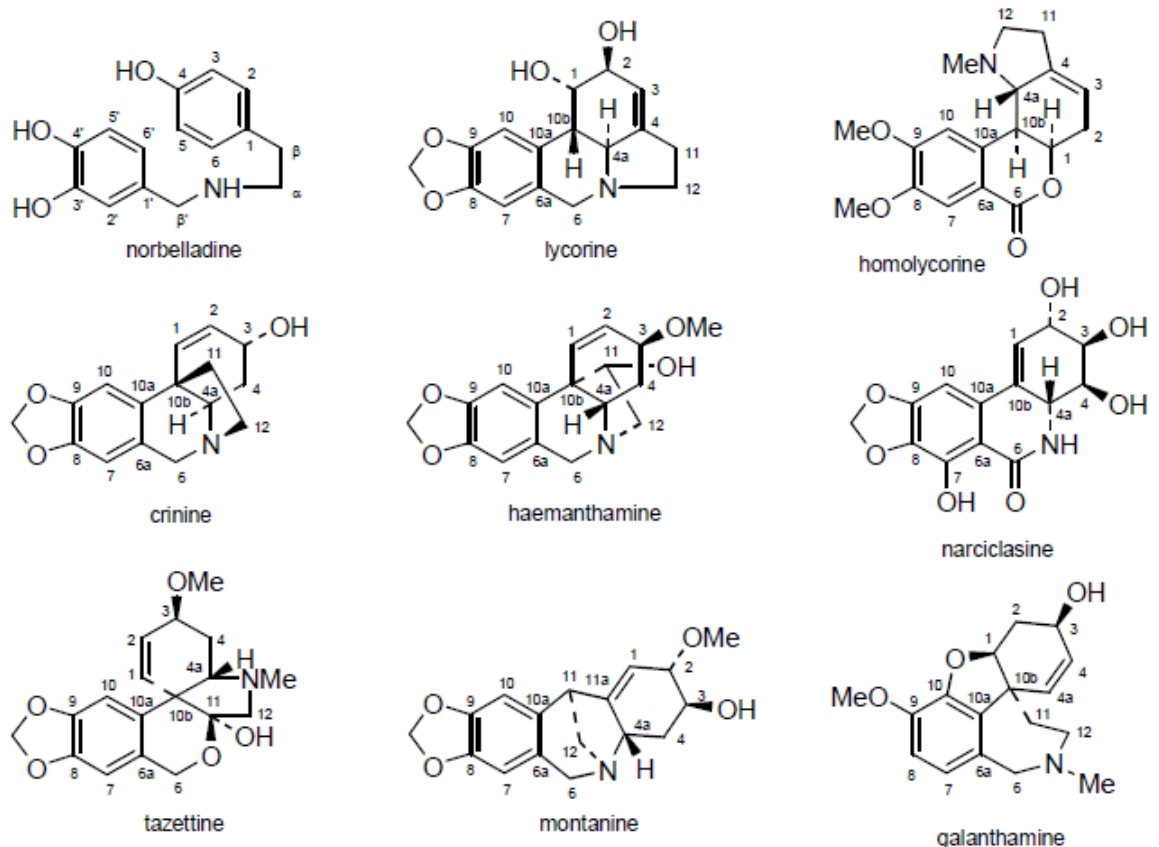


Figure 1.5 : Les principaux types des alcaloïdes d'Amaryllidacées selon leur squelette [85].

* Lycoramine inhibe l'acétylcholine estérase, la synthèse des peptides et des protéines, antagoniste la paralysie musculaire, produit des poisons graves des systèmes digestif, respiratoire, cardiovasculaire, neuromusculaire et nerveux central [86].

* Haemanthamine est hypertensif, un agent cytotoxique, inhibe la croissance des cellules HeLa, inhibe la synthèse des protéines, réduit la synthèse d'ADN, antioxydant, anticonvulsant [86], antitumeur contre le cancer de la prostate humaine, antimalaria, antirétroviral [84].

* Tazettine est un faible hypotensif, actif contre les cellules souches Co 12, il est faible cytotoxique contre les fibroblastes [86], il a une faible activité antimalarial [84].

*Vittatine faible analgésique chez les souris, il augmente l'effet analgésique de morphine [86], c'est un antibactérien contre *S. aureus* et *E. coli* [84].

*Galanthamine est un puissant analgésique, antispasmodique, hypotensif, inducteur d'hypothermie chez les rats, inhibe l'acétylcholinestérase utilisée pour traiter l'Alzheimer, nausée et vomissement, usé pour traiter l'alcoolisme, réduit la pression intraoculaire [86].

IV. STRESS OXYDANT

Le stress oxydant est un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatique et non enzymatique) ou encore par une association des deux phénomènes [88].

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées (EOA), suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'EOA soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante [89].

4.1. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme étant une espèce chimique (atome ou molécule, neutre ou chargée) possédant au moins un électron non apparié sur sa couche externe [90]. Les radicaux libres (RLs) sont très instables et réagissent rapidement avec les molécules environnantes essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité [88]. Le principal danger des RLs vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que : la membrane cellulaire, l'ADN ou les protéines [91].

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante des espèces radicalaires générées dans les organismes vivants.

4.1.1. Sources des radicaux libres

La cellule est exposée à une grande variété de radicaux libres d'origines variées : endogène et exogène (Tableau 1.2) [92].

Tableau 1.2: sources exogènes et endogènes des radicaux libres [92].

Sources des radicaux libres	
Sources exogènes	Sources endogènes
Radiations γ	Cellules (ex: neutrophiles)
Radiations UV	Enzymes de production directe
Ultrasons	(ex: nitrique oxyde synthase NOS)
Alimentation	Enzymes de production indirecte
Médicaments	(ex: xanthine oxydase)
Polluants	Métabolisme (ex: mitochondrie)
Xénobiotiques	Maladies
Toxines	(ex: processus ischémique)

4.1.2. Pathologies liées au stress oxydant

Les dommages oxydatifs d'ADN, des protéines et d'autres macromolécules ont été impliqués dans la pathogenèse d'une grande variété de maladies (Tableau 1.3). En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles les diabètes, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et la maladie d'Alzheimer [93, 94].

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes, et augmente la production mitochondriale des radicaux [95]

Tableau 1.3: Maladies associées au stress oxydatif [95].

Maladies chroniques	Maladies aiguës
Cancer	Maladies inflammatoires
Cataracte	Chocs, traumatismes et ischémie
Diabète	Insuffisance rénale
Sclérose en plaques	Pancréatite
Maladie de Parkinson	Colites et maladies inflammatoires de l'intestin
Arthrite	Lésions cutanées

4.2. Systèmes antioxydants

L'ensemble des dommages radicalaires envers l'organisme semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action des molécules dites « antioxydantes ». On peut envisager sous le titre d'antioxydants, l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les RLs lorsqu'elles sont présentes à des concentrations faibles en comparaison avec le substrat oxydable [96]. Des systèmes de défense antioxydants neutralisent les RLs de plusieurs manières :

- En inhibant leur formation : la séquestration des métaux de transition par des protéines spécifiques empêche la réaction de Fenton et la production de OH^\bullet ;
- En les piégeant : composés endogènes comme le glutathion, ou exogènes comme l'ascorbate, l' α -tocophérol, les caroténoïdes et les polyphénols ;
- En les métabolisant grâce à des enzymes : Superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydases [91].

4.3. Tests de l'activité antioxydante

L'intérêt récent en antioxydants a mené au développement d'un certain nombre d'essais d'activité antioxydante (EAA). Les plantes contiennent des concentrations élevées de nombreux métabolites secondaires redox-actifs ou des antioxydants, tels que l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les huiles essentielles, les polyphénols.....etc. Il n'y a aucune méthode universelle qui peut mesurer la capacité antioxydante de façon précise et quantitative, un accord sur une méthode standardisée mis en valeur :

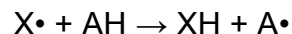
- * L'orientation pour l'application appropriée d'essais,
- * Des comparaisons significatives des produits commerciaux,
- * Le moyen pour contrôler la variation dans ou entre les produits,
- * La fourniture des normes de qualité pour les questions de réglementation et les réclamations de santé. Pas mal des méthodes analytiques aboutissent aux résultats contradictoires, applications et interprétations inadéquates des analyses, et une impropre spécification d'EAA. Une méthode normalisée pour évaluer l'activité antioxydante doit répondre aux exigences «idéales» suivantes :
- * Mesurer effectivement la chimie survenant dans l'application potentielle,
- * Utiliser une source de radical biologiquement approprié,

- *Simple,
- * Utiliser une méthode dont le point final et le mécanisme chimique sont connus,
- * L'instrumentation est facilement disponible,
- * Bonne reproductibilité intra-série et entre les jours,
- * Adaptable pour le dosage des antioxydants hydrophiles et lipophiles, aussi bien l'utilisation de différentes sources des radicaux,
- * Adaptable à l'analyse de haut-sortie pour les analyses courantes de contrôle de qualité [97, 98].

Les antioxydants peuvent désactiver les radicaux selon deux mécanismes, par transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et par transfert d'électron unique (SET) [97]. Le résultat final est le même, considérant le mécanisme. Cependant, la cinétique et le potentiel pour les réactions diffère.

4.3.1. Méthodes basées sur HAT

Cette méthode mesure la capacité classique d'un antioxydant pour neutraliser les radicaux libres en lui donnant un hydrogène.



La réaction HAT est indépendante du pH et du solvant utilisés. Elle est très rapide généralement achevée en quelques secondes ou minutes. La présence des agents réducteurs (les métaux) est compliquée pour la réaction HAT et peut conduire à forte réactivité apparente. Parmi les tests qui suivent le mécanisme HAT, nous avons :

4.3.1.1. ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity)

ORAC est un nouveau test qui peut être utilisé pour détecter le pouvoir antioxydant des nourritures et d'autres produits chimique. Ce test peut être effectué en utilisant le β -phycoerythrine (β -PE) ou la fluoréscéine comme marqueurs. A partir de 2005, le β -PE ne se rencontre pas dans les publications. Il a été substitué par la fluoréscéine. ORAC est basé sur la génération des radicaux libres en utilisant l'AAPH (2,2'-azobis 2-amidopropane dihydrochloride) pour générer le radical peroxy ($ORAC_{ROO\cdot}$) ou le Cu^{2+} - H_2O_2 comme générateur du radical hydroxyl ($ORAC_{OH\cdot}$) et le Cu^+ comme oxidant ($ORAC_{Cu}$). La décroissance et/ou le maintien de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un piègeur de radicaux libres est mesuré par fluoromètre [99]. Le Trolox (un analogue de la

vitamine E soluble dans l'eau) est utilisé comme un antioxydant de référence mais pas dans le cas d'ORAC_{OH•}, car le Trolox peut réagir comme oxidant en présence de Cu²⁺, les résultats sont exprimées comme micromole équivalent Trolox par gramme ou par litre d'échantillon (µmol/g ou µmol/L) et identifié comme la valeur d'ORAC [97,99], plus haute est la valeur ORAC, plus grand est le pouvoir antioxydant [98]. L'ORAC est un test qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur temporelle de cette inhibition en une seule mesure. La mesure de la fluorescence dans ce test réduit l'interférence causée par les composés colorés [99]. L'ORAC est largement adaptable aux antioxydants lipophiles, mais il peut être adapté aux antioxydants hydrophiles en utilisant une solution contient acétone/eau (50% : 50% v:v) et 7 % de β-cyclodextrine méthylé (RMCD) pour solubiliser les antioxydants [97]. Ce test fournit une source contrôlable des radicaux peroxy, reflète la réaction déroulée entre les antioxydants et les lipides dans les aliments et le système physiologique. Les marqueurs fluorescents, bien que sensibles, exigent la détection par un fluoromètre, qui ne se trouve pas souvent dans les laboratoires analytiques, en plus ce test est temps consommable (~1h).

4.3.1.2. TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

TRAP contrôle la capacité des composés antioxydants à interférer dans la réaction entre le radical peroxy généré par AAPH ou ABAR (2,2'-azobis 2-amidopropane dihydrochloride) et un cible indicateur [97].

Différentes variations de la méthode ont utilisé la consommation d'O₂, la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE), ou l'absorbance de l'ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) comme indicateur de réaction. Les réactions de base de ce test sont similaires à ceux de l'ORAC. Les exigences de TRAP sont la sensibilité maximale de l'indicateur envers le ROO•, et aucune réaction en chaîne après l'oxydation de l'indicateur aura lieu [98]. Typiquement, la réaction est suivie optiquement ou de la fluorescence. L'activité antioxydante a été déterminée en temps de consommation des antioxydants des échantillons, ou dans le milieu réactionnel comparé au temps obtenus par Trolox.

TRAP est simple et utilisé pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo* du sérum ou du plasma, parce qu'elle mesure les antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion et l'acide ascorbique [100]. Elle peut être également appliquée pour

évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des boissons et des nutriments [99]. Le plus grand problème de TRAP est sa force ; plusieurs points finaux ont été déterminés, ainsi les comparaisons entre les laboratoires sont difficiles. Elle est relativement complexe et longue et exige un niveau élevé d'expertise et d'expérience [100].

4.3.1.3. TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity)

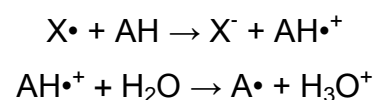
TOSC permet la quantification de la capacité d'absorbance des antioxydants spécifiquement envers trois puissants oxydants, c'est le cas de radical hydroxyl, le radical peroxy, et le peroxy-nitrite. L'indicateur de la réaction l'acide α -keto- γ -methiolbutyrique (KMBA) va être oxydé donnant naissance à l'éthylène, l'évolution temporelle de la formation d'éthylène (partiellement inhibée en présence des antioxydants) est suivie par chromatographie phase gazeuse. La réaction est longue 300 min et a plusieurs points finaux, donc une comparaison des résultats sera difficile [97, 99].

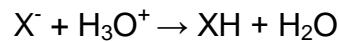
4.3.1.4. β -carotène/acide linoléique

Les caroténoïdes se blanchissent via une autoxydation, oxydation induite par lumière ou chaleur, ou via une oxydation induite par le radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$) [97]. Le principe de test de β -carotène/acide linoléique est basé sur l'oxydation d'acide linoléique par les radicaux libres et le produit formé initie l'oxydation de β -carotène, qui peut être empêchée par les antioxydants. Du fait, une diminution de la coloration de β -carotène mesurée à 490 nm indique l'activité. En effet, c'est une méthode simple, rapide, reproductible pour évaluer l'activité antioxydante. Cependant, le carotène émulsionné et le linoléate ou le méthyl linoléate utilisés comme substrats dans ce test ne sont pas des modèles appropriés pour les aliments d'une part, et d'autre part, l'acide linoléique est polaire, donc il peut affecter l'activité relative des antioxydants hydrophiles comparés aux antioxydants lipophiles [99].

4.3.2. Méthodes basées sur SET

Cette méthode détecte la capacité d'un antioxydant à transférer un électron et réduire les composés, notamment les métaux, les carbonyles, et les radicaux :





La réactivité relative dans les méthodes SET est basée sur la déprotonation et la force ionique, donc elles sont dépendantes au pH du milieu réactionnel.

Les réactions SET sont généralement lentes et sont très sensibles à l'acide ascorbique et l'acide urique, et la réduction de polyphénols est aussi détectée. C'est le cas de :

4.3.2.1. DMPD

Dans ce test, le radical $DMPD^{\bullet+}$ dérivé de N,N-diméthyl-p-phénylénédiamine (DMPD) est employé. En présence d'une solution d'oxydant (chlorure ferrique) au pH acide, DMPD est converti en radical stable et coloré chargé positivement $DMPD^{\bullet+}$ mesuré à 505 nm. L'antioxydant réduit le radical $DMPD^{\bullet+}$, résultant une décoloration proportionnelle à la concentration des antioxydants. L'efficacité de cette méthode dépend aux concentrations des réactifs utilisés (DMPD, oxydant, et l'antioxydant). DMPD est rapide, simple, moins chère et plus reproductible, elle peut être utilisée aux composés hydrophiles. Cependant, la sensibilité et la reproductibilité diminuent en présence des composés hydrophobes, tels que, α -tocophérol et BHT, le même effet a été observé en utilisant le méthanol comme solvant. La présence d'acide organique peut interférer l'analyse par DMPD [99].

4.3.2.2. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

FRAP mesure la capacité antioxydante en mesurant la réduction de la triazine tripyridyl ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en un complexe ferreux (Fe^{2+} -FPTZ) à pH faible, le complexe ferreux a une couleur bleue foncé mesuré à 593 nm. Ce test est élaboré pour évaluer l'activité antioxydante du plasma, des antioxydants purs ou en mélange. FRAP est simple, précise, sensible, reproductible et moins chère et elle n'exige aucun prétraitement d'échantillon. Toutefois, la réduction mesurée ne reflète pas nécessairement l'activité antioxydante. Si FRAP est employé pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo*, le Fe^{2+} peut interagir avec l' H_2O_2 pour produire le radical hydroxyle. La valeur du pH non physiologique limite son usage [98, 99].

4.3.2.3. CUPRC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)

Modification de test de FRAP, en utilisant le Cu au lieu de Fe a été présentée comme CUPRAC, et le Cu^{2+} -néocuproïne (Cu^{2+} -Nc) est utilisé comme agent d'oxydation chromogène. Ce test s'est basé sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par des antioxydants combinés ou une réduction par les polyphénols dans un milieu hydro-éthanolique en présence de néocuproïne, formant des complexes qu'absorbent à 454 nm. Le cuivre est plus utile que le fer pour les essais d'activité antioxydante, du fait tous les classes des antioxydants, y compris les thioles, peuvent être détectés facilement, en plus que la cinétique des réactions de cuivre est plus rapide que le fer. CUPRAC est adaptable pour les antioxydants hydrophiles et hydrophobes, et vue que le pH 7.0 de réaction est presque physiologique, donc la réaction simule l'action antioxydante dans des conditions presque normale [97,98].

4.3.3. Méthodes basés sur HAT et SET

Bien que les méthodes de TEAC/ABTS et DPPH soient généralement classifiées en réaction SET, ces radicaux en fait peuvent être neutralisés soit par réduction directe via de transfère d'électron ou par trempe radicale par transfère d'atome d'hydrogène.

4.3.3.1. TEAC/ABTS

ABTS mesure la capacité des antioxydants qui réagissent directement avec le radical cationique $\text{ABTS}^{+\cdot}$, généré par des méthodes chimiques. C'est un test de décoloration qui détermine l'effet scavenger en mesurant l'absorbance de mélange antioxydant-radical à 734 nm. $\text{ABTS}^{+\cdot}$ est un radical cationique à centre azoté, du couleur bleu-vert caractéristique, lorsque ce radical est réduit en ABTS par les antioxydants, il va perdre son couleur. En utilisant le Trolox comme antioxydant de référence, la méthode est nommée TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Dans le TEAC original, l' $\text{ABTS}^{+\cdot}$ est généré par le ferry-myoglobine (Fe^{4+}), produit lors de la réaction entre le met-myoglobine (Fe^{3+}) et le H_2O_2 sous l'action de la peroxydase [99].

Les différences entre les essais sont les approches pour former l' $\text{ABTS}^{+\cdot}$, comme l'utilisation de dioxyde de manganèse, le persulfate de potassium, l'usage d'AAPH, générateurs du radical peroxy qui se trouve dans le corps [88].

ABTS⁺ réagit rapidement avec les antioxydants, il est stable que se soit dans les solutions aqueuses ou organiques, et il est non affecté par la force ionique ou le pH, donc il peut être utilisé dans plusieurs milieux pour déterminer la capacité des antioxydants hydrophiles et hydrophobes extraites ou de fluides corporels [97].

4.3.3.2. DPPH

La réactivité de DPPH est une méthode populaire de dépistage le pouvoir anti-radicalaire des composés, qui a été largement employée pour les antioxydants des fruits et des légumes. Cette méthode a été décrite en premier fois par Blois 1958, des modifications ont été portées par les chercheurs. DPPH est un radical libre stable du couleur violet qu'absorbe en 517 nm. La méthode est basée sur le piégeage du DPPH^{*} par les antioxydants conduisant ainsi à une décoloration de la solution. Le taux de la décoloration est proportionnel à la concentration et la puissance des antioxydants ; une diminution brusque de l'absorbance du mélange réactionnel indique un effet scavenger significatif de composé à analyser. Les résultats sont exprimés en IC₅₀, la concentration correspondante à 50% d'inhibition de DPPH [97] plus faible est l'IC₅₀, plus puissant est l'antioxydant.

DPPH est une méthode valide, facile, précise, reproductible, sensible, et économique pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes, des fruits et légumes. Elle peut être largement appliquée pour les solutions opaques qu'on ne peut pas les étudier par spectrophotomètre voir même les produits qui contiennent des antioxydants comme les nutriments [99]. Toutefois, le radical DPPH est sensible à l'oxygène et la lumière qui peuvent diminuer son absorbance. Il est soluble dans les solvants organiques tels que le méthanol ou l'éthanol, l'usage d'acétone a diminué l'absorbance de DPPH [99]. Cet essai n'est pas utile pour déterminé l'activité antioxydante de plasma du fait que les protéines se précipitent en milieu alcoolique.

D'après la littérature, le stress oxydant est considéré comme une initiative de divers pathologies et anomalies physiologiques dans le corps humaine et comme altérant des propriétés organoleptiques et physicochimiques des aliments. Pour cette raison et pour mettre en valeur l'intérêt de *P. tuberosa*, nous allons évaluer l'activité antioxydante des extraits des organes de *P. tuberosa* par des méthodes convenables pour que nous puissions l'exploiter dans dévers domaine entant qu'un antioxydant.

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'expérimentation a été réalisée durant 5 ans (2013-2018) au niveau de la serre et le laboratoire de recherches des plantes aromatiques, médicinales à l'université de Blida 1, où la culture de la tubéreuse et la préparation de différents extraits ont eu lieu. Au niveau de laboratoire de recherche en phytothérapie appliquée aux maladies chroniques à l'université de Sétif 1, dont les différents tests biochimiques ont été réalisés, au niveau de centre de recherche en Biotechnologie (CRBT), pour analyser l'absolu de la tubéreuse, et dans le laboratoire de pédologie BNEDER. Les parties des études sont énumérées comme suit :

1- L'évaluation de la croissance et la floraison chez la tubéreuse en fonction des facteurs d'études par l'étude de la propagation de la tubéreuse en utilisant deux volets :

1^{er} Essai : Une culture des bulbes de *P. tuberosa* L. sous deux conditions : sous abris et en plein champ, en considérant différents diamètres des bulbes à Sétif en mai 2014, en vue de la sélection des conditions favorables à savoir la taille des bulbes et le type de conduite de la culture, pour lancer le second essai de culture des bulbes de la plante.

2^{eme} Essai : Une culture des bulbes de la tubéreuse en appliquant des biostimulants a été réalisée sous serre à l'université de Blida au mois d'avril 2016-2017, et par l'usage de différents diamètres des bulbes.

2- La caractérisation phytochimique de différentes parties de la plante ; bulbes, feuilles et fleurs, par extraction des métabolites secondaires spécifiques pour chaque partie comme : les alcaloïdes et les polyphénols extraits des bulbes, polyphénols et leurs fractions pour les feuilles et l'absolu et les polyphénols des fleurs, ainsi la caractérisation par différentes méthodes spectrophotométrique et chromatographique correspondantes pour chaque type des métabolites secondaires.

3- L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits élaborés.

I. Matériel végétal

Les bulbes de *P. tuberosa* L. proviennent de la pépinière de Chiffa-Blida. D'où ils ont été récoltés des cultures biologiques conventionnelles, soigneusement séparés, nettoyés de la tourbe et conservés à 10-15°C dans un endroit sec.

II. Méthodes

2.1. Mise en culture de *P. tuberosa* L.

La culture des bulbes de *P. tuberosa* L. a été réalisée en deux essais, la première sert d'une culture des bulbes sans aucun traitement, en utilisant différents diamètres des bulbes, sous deux conditions climatiques en 2014, et pour le deuxième essai, une culture sous serre en employant des biostimulants et des bulbes de différents diamètres durant 2016-2017.

2.1.1. Culture témoin

Les bulbes de *P. tuberosa* ont été soigneusement séparés après avoir mesuré leurs diamètres et longueurs en cinq lots selon leurs diamètres : $T_1 : \leq 1$ cm, $T_2 : 1-1.5$ cm, $T_3 : 1.5-2$ cm, $T_4 : 2-3$ cm et $T_5 : 3-4$ cm (les longueurs : $T_1 : 3.2-4$ cm, $T_2 : 2.8-4.2$ cm, $T_3 : 3.1-5.1$ cm, $T_4 : 4-4.6$ cm, $T_5 : 5.7-6.1$ cm) (Figure 2.1) et conservés dans un sac en papier à l'obscurité dans un endroit sec. Les bulbes ont été cultivés en mai 2014 dans des pots (30 cm diamètres) contenant un mélange : sol/terreau (2:1 v/v), les caractères de sol sont: texture : limon-sableaux, pH : 7.12, capacité d'échange des cations : 10.16 méq/100 g, CaCO_3 :3.75%, conductivité électrique : 0.45 Emmhos/cm, carbone : 2.47%, matière organique : 4.24%, P : 677.08 ppm.

Les bulbes cultivés sont répartis en deux groupes : un groupe a été cultivé sous abri et l'autre en plein champ, l'arrosage s'effectuait quotidiennement (30mL d'eau de robinet), une fois par jour, le relèvement de la température de la culture sous abri s'effectuait aussi durant la culture soit 33 ± 5 °C.



Figure 2.1 : Morphologie des bulbes de *P. tuberosa* L. selon les diamètres.

a : T₅ : 3-4 cm, b : T₄ : 2-3 cm, c : T₃ : 1.5-2 cm, d : T₂ : 1-1.5 cm, e : T₁ : ≤ 1 cm.

2.1.2. Conduite de la culture sous l'effet des biostimulants

Sur la base des résultats obtenus du premier essai de culture. La seconde culture a été réalisée sous serre, en utilisant deux groupes en fonction de leur diamètre : gros bulbes (GB) : diamètre ≥ 2 cm, petits bulbes (PB) : diamètre < 2 cm. La culture a été réalisée sous serre durant l'année 2016 et durant l'année 2017, mais sans l'utilisation d'acide humique (pour la culture de 2017) par défaut de manque de celui-ci, afin de confirmer les résultats et d'augmenter le nombre de répétitions par traitement.

2.1.2.1. Préparation des biostimulants et mode d'application

a. Préparation de substrat

Le sol de culture est prélevé de la station expérimentale du département des Biotechnologie, université de Blida 1, séché à l'air libre puis passé à travers un tamis de maille de 2 mm, ensuite mélangé avec le terreau en raison (sol/terreau 1/2 v:v). Des prélèvements pour l'analyse du sol (Tableau 2.1) ont été pris au hasard pour achever à un 1 Kg de sol, qui est de texture limon-argileux.

b. Grignons d'olive

Les grignons d'olive ont été obtenus à partir d'une distillerie d'extraction d'huile d'olive au niveau de Blida. Ensuite ceux-ci ont été mélangés avec la tourbe en raison de 10% (v/v) [101]. Un échantillon a été pris pour des analyses (Tableau 2.1).

c. Hydrolat de plumes de poulet

Les plumes de poulet ont été obtenues des éleveurs de poulets. L'hydrolat des plumes a été préparé par autoclavage (la méthode qui donne un taux élevé de protéines), la pression appliquée a été de 2.45 bar, la température a été de 140°C pendant 50mn [102]. La dose recommandée est de 20% (v/v) d'hydrolat dilué appliqué par arrosage (30 mL/pot) chaque 15 jour [103]. Des échantillons de sol traité par l'hydrolat des plumes ont été prélevés pour des analyses physico-chimiques (Tableau 2.1).

d. Marc de café

Le marc de café préalablement collecté des cafétérias a été séché à l'air libre et à l'abri de la lumière. Le marc séché a été homogénéisé à l'aide d'un mortier et des échantillons ont été pris pour l'analyse (Tableau 2.1), puis, le reste a été incorporé et homogénéisé avec la tourbe en raison de 10% (m/m) (dose recommandée par Cruz *et al.* [104]).

e. Acide humique

L'acide humique a été offert par la société allemande Humnitee. Une solution de 20% (m/v) d'acide humique [105] a été préparée dans l'eau distillée. 750 mL de cette solution a été appliquée par arrosage sur les bulbes cultivés [105]. Des échantillons d'acide humique avec le sol ont été pris pour des analyses (Tableau 2.1).

Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques du sol de pot de témoin ainsi ceux traités par les biostimulants sont présentés dans le Tableau 2.1. Les paramètres étudiés sont : le calcaire total dans le sol, le pH, la capacité d'échange cationique, le taux de cendres, la conductivité électrique, le taux de carbone et la teneur en matière organique. Ces tests ont été réalisés selon des méthodes des normes AFNOR et ISO.

Tableau 2.1: Caractères physico-chimiques du sol et des biostimulants (BNEDER, 2018).

Paramètres physico-chimiques du sol	Marc de café	Grignons d'olive	Sol+hydrolat des plumes	Sol+acide humique	Sol témoin
CaCO ₃ total (%)	-	-	3.38	3.50	56.13
Capacité d'échange cationique (méq/100g)	-	-	12.01	10.49	14.72
pH	5.68	6.14	7.11	7.61	7.79
Conductivité Electrique (mmhos/cm)	0.97	1.25	1.60	2.77	0.90
Cendre (%)	98.90	96.73	-	-	-
P ₂ O ₅ (ppm)	387.77	198.47	473.27	294.65	216.79
C (%)	3.93	3.77	2.73	3.17	0.57
Matière organique (%)	6.77	6.48	4.70	5.45	0.99

2.1.2.2. Mise en culture des bulbes

En effet, la culture a été réalisée dans des pots en plastique noir de 30 cm de diamètre. Les bulbes ont été mis en culture sous serre en avril 2016-2017 à la température d'environ 31 ± 5 °C. L'arrosage par l'eau de robinet a été effectué quotidiennement (une fois par jour).

Quatre biostimulants comparés à des témoins ont été étudiés pour évaluer leur effet sur la croissance et la floraison de *P. tuberosa* L. A chaque traitement correspond 12 pots (divisés en deux groupes GB/PB) pour l'essai de culture de 2016 et 20 pots (divisés en deux groupes GB/PB) pour l'essai de culture de 2017, donc au total 60/80 pots (2016/2017).

2.1.3. Paramètres biométriques de la croissance

Les différentes informations de développement de *P. tuberosa* ont été enregistrées, pour les deux essais de la culture par l'évaluation des paramètres morphométriques suivants :

2.1.3.1. Paramètres de croissance

- * Période de germination, comptée en jours à partir de la date de plantation jusqu'au jour où les bulbes terminent leurs germination.
- * Période d'émergence des feuilles, comptée de la date de plantation jusqu'au jour d'apparition de la première feuille.
- * Période d'émergence de la hampe, à partir du jour de plantation jusqu'au jour d'émergence de la hampe.
- * Nombre de feuilles: déterminé à la fin de la croissance végétative de la plante.
- * Production des bulbilles : enregistrée pour les plants traités par les biostimulants après la récolte des bulbes cultivés (environ après 9 mois de culture).
- * Hauteur de la plante en cm: définir à la pleine floraison [30,106].

2.1.3.2. Paramètres de floraison

- * Période d'émergence des fleurs: déterminée à partir du jour de plantation jusqu'au jour de l'émergence de la première fleur.
- * Nombre de fleurs par hampe et la longueur de la hampe: déterminés en pleine floraison [30,106].

2.2. Caractérisation phytochimique des parties des plants cultivés

2.2.1. Récolte et séchage des feuilles, fleurs et bulbes

Les feuilles sont récoltées au stade de floraison, après la récolte de toutes les fleurs, à partir de la fin du mois d'octobre. Elles ont été dépoussiérées et séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyées en poudre à l'aide d'un moulin à café pour réaliser l'extraction des métabolites secondaires.

Les fleurs sont récoltées en pleine floraison entre les mois de juillet-octobre après le coucher du soleil, et séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière afin de maintenir leurs principes actifs.

Les bulbes sont récoltés en automne après séchage de toutes les feuilles [6], les bulbes sont rincés de la tourbe, et conservés proprement dans un endroit sec à

10-15°C. Le stade de dormance est recommandé par les chercheurs pour l'extraction et l'analyse des alcaloïdes [107].

2.2.2. Criblage phytochimique

2.2.2.1. Préparation de l'infusé

Afin de mettre en évidence la présence des glycosides, des flavonoïdes, des phlobatanins, des saponines, les tanins, le mucilage et les terpénoïdes, selon la méthode citée par Bhuvaneswari et *al.* [108], la préparation de l'infusé a été faite en introduisant 5 g de la poudre des feuilles, des bulbes et des fleurs de *P. tuberosa* L. dans un Erlen Mayer refermant 100 mL d'eau distillée (1:20 m/v). Le mélange est placé pendant 2 mn dans le micro-onde, l'extrait est ensuite filtré à travers papier filtre, et utilisé immédiatement sans conservation pour les tests phytochimique.

a. Mis en évidence des glycosides

5 mL d'extrait aqueux a été mélangé avec 2 mL d'acide acétique glacial contenant des morceaux de chlorure ferrique, auquel est ajouté 1 mL d'acide sulfurique. La présence d'un rond brun indique la présence des glycosides.

b. Mis en évidence des flavonoïdes

5 mL d'extrait aqueux a été mélangé avec 2 mL de 1% d'ammoniaque, la formation d'une couleur jaune révèle la présence des flavonoïdes.

c. Mis en évidence des phlobatanins

L'apparition d'un précipite rouge, lorsque 10 mL d'infusé est bouilli avec 1mL d'HCl (1%) donne des réactions positives de la présence des phlobatanins.

d. Mis en évidence des saponines

3 mL d'eau distillée a été ajoutée à 10 mL d'extrait aqueux. Après une forte agitation, la formation d'une mousse confirme la présence des saponines.

e. Mis en évidence des tanins

La formation d'une couleur brune-verte ou bleue-verte suite à l'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique FeCl_3 (5%) à 5 mL d'extrait aqueux indique la présence des tanins.

f. Mis en évidence du mucilage

5 mL d'éthanol absolu a été ajouté à 1mL d'extrait aqueux, l'apparition des précipitations blanches indiquent la présence de mucilage.

g. Mis en évidence des terpenoides

2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique ont été ajoutés à 5 mL d'extrait aqueux de la plante. La formation d'une couleur brune rouge dans la solution indique la présence des terpenoides.

2.2.3. Etude phytochimique des parties de *P. tuberosa* L. du premier essai de culture

2.2.3.1. Extraction des alcaloïdes des bulbes de *Polianthes tuberosa* L.

Un facteur a été pris en considération lors de l'extraction des alcaloïdes, diamètre équivalent de bulbes : des bulbes ($\Phi > 2.5\text{cm}$) et des bulbilles ($\Phi < 1\text{cm}$). L'extraction des alcaloïdes est effectuée selon la méthode décrite par Cahlíková et al. [109] (Figure 2.2). En bref, 45 g de bulbes frais sont macérés trois fois dans 50 mL d'éthanol pendant 24 h sous agitation mécanique, Après filtration, l'éthanol a été évaporé à 60°C. Ensuite, le résidu est récupéré avec 10 mL d'HCl (2%). Les composés neutres sont séparés par l'ajout de 45 mL d'éther diéthylique. La phase aqueuse récupérée est rendue basique par 25% d'ammoniaque à pH : 8-9. Les alcaloïdes sont extraits par l'acétate d'éthyle 45 mL, et cette fois-ci la phase organique est récupérée et l'acétate d'éthyle est évaporé à 60 °C (Figure 4.2). Les extraits des alcaloïdes des bulbes ainsi obtenus ont été pesés pour calculer les rendements exprimés en pourcentage par rapport au poids initial de matériel végétal.

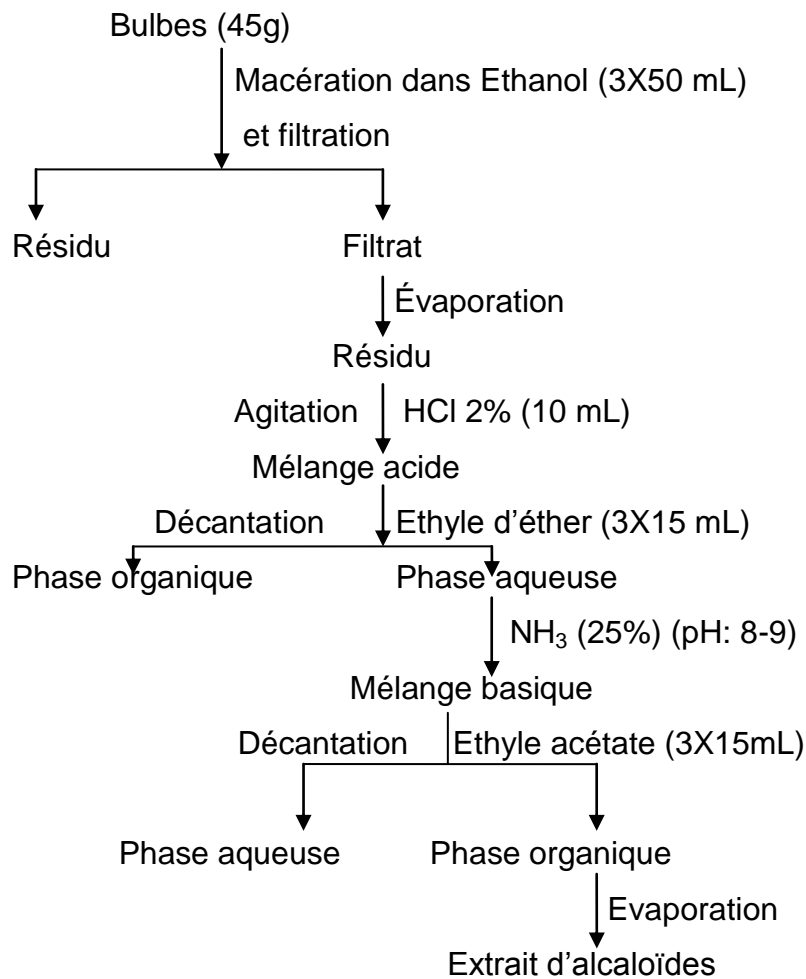


Figure 2.2. : Etapes d'extraction des alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa*

2.2.3.2. Teneur en eau des bulbes de *P. tuberosa*

On procède à une dessiccation de matériel végétal à la température de $103\pm 2^\circ\text{C}$, dans une étuve ventilée, à la pression atmosphérique, jusqu'à masse pratiquement constante [110].

Les bulbes sont coupés en rondelles de 2mm d'épaisseur environ. Sécher à l'étuve, une boîte de Pétri à tarer durant 15' à $103\pm 2^\circ\text{C}$, couvercle enlevé. Laisser refroidir au dessiccateur pendant 30'. Puis on tare la boîte et son couvercle posé. Soit m_1 la masse de la boîte et son couvercle vide. On place dans la boîte 5 g de bulbes coupés, puis répartis uniformément sur le fond de la boîte. On ferme le couvercle, on pèse l'ensemble. Soit m_2 l'ensemble des masses boîte +couvercle+bulbes coupés. Ensuite, on place la boîte contenant les bulbes coupés, couvercle enlevé, dans l'étuve préalablement réglée à $103\pm 2^\circ\text{C}$. Maintenir cette température durant 3h, puis mettre rapidement en place le couvercle et refroidir l'ensemble au dessiccateur. Dès que la vase est refroidie à la température

du laboratoire, la peser. Remettre la boîte, couvercle enlevé, à l'étuve durant 1h et la peser de nouveau en opérant comme précédemment. Si la différence entre les deux pesées n'excède pas 5 mg pour une prise d'essai de 5 g, considérer l'opération comme terminée. Sinon, on effectue autant de séjours d'1h à l'étuve, pour que l'écart entre deux pesées successives soit inférieur ou égal à 5 mg. Soit m_3 , l'ensemble des masses marquées boîte+matière sèche. L'expérience est répétée trois fois, et la teneur en eau (T_{eau}) et la matière sèche (MS) sont calculées selon les formules suivantes:

$$\%T_{\text{eau}} = 100(m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)$$

$$\%MS = 100 - T_{\text{eau}}$$

2.2.3.3. Extraction et fractionnement des polyphénols de feuilles de *Polianthes tuberosa*

L'extraction des polyphénols à partir des feuilles de *P. tuberosa* a été effectuée selon la méthode solide-liquide décrite par Meziti et al. [111]. 10g de poudre des feuilles ont été mélangés avec 100mL de méthanol/eau (70:30 v:v), le mélange est macéré pendant 24h sous agitation mécanique et à l'abri de la lumière. L'extrait obtenu est filtré par papier filtre, ensuite évaporé à 40°C par un rotavapor. Le fractionnement de l'extrait méthanolique a été réalisé successivement par l'hexane (agent de délipidation), le dichlorométhane (Figure 2.3) à raison de 1:1 (v/v). A chaque fois la phase organique est évaporée à sec et les rendements sont calculés. Les extraits et la phase aqueuse sont séchés (dans l'étuve à 50°C), ensuite pesés pour calculer les rendements exprimés en pourcentage par rapport au poids initial de matériel sèche, et ils sont conservés à 4°C jusqu'à leurs analyses.

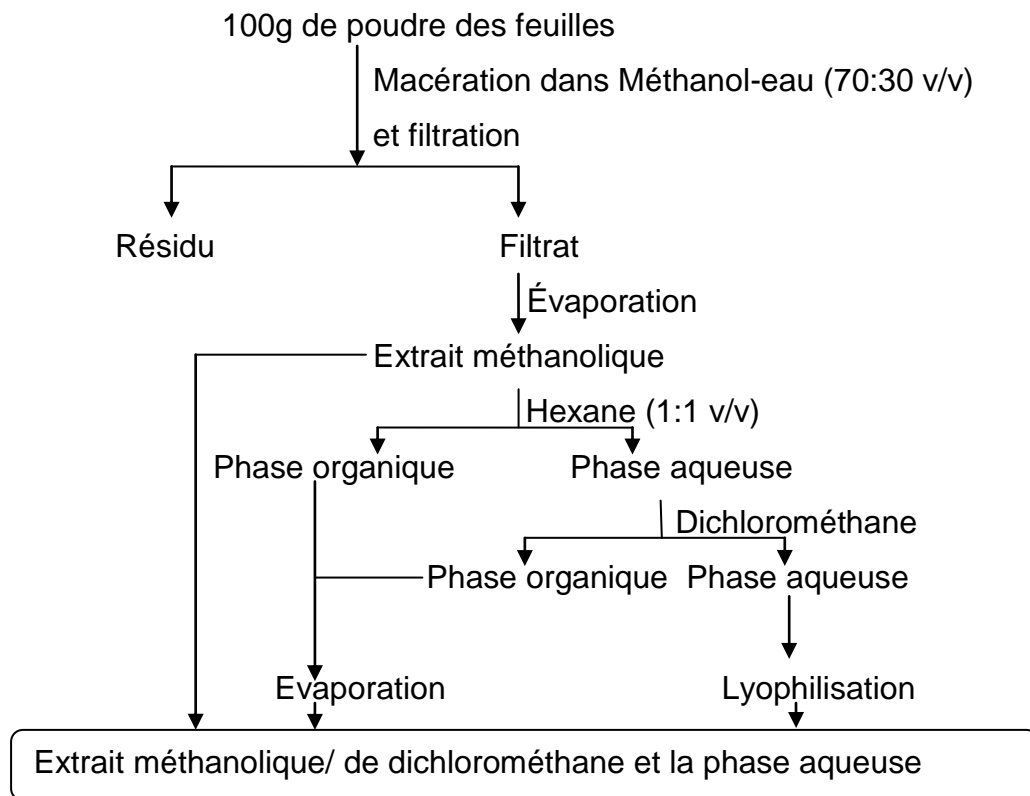


Figure 2.3. : Différentes étapes d'extraction des polyphénols de *P. tuberosa* L.

2.2.3.4. Extraction de l'absolu des fleurs de *Polianthes tuberosa* L.

L'extraction de l'absolu de *P. tuberosa* L a été effectuée selon la méthode citée par Chandravadana *et al.* [7] et Chaudhary et Kumar [112] avec quelques modifications. 100 g de fleurs en pleine maturité ont été collectées le soir (environ 6 PM) puis séchées à l'obscurité et à la température ambiante. Celles-ci ont été introduites dans 1L d'hexane pendant 24 heures 3 à 4 jusqu'à 6 fois (jusqu'à l'obtention d'un extrait limpide) et filtrées. L'hexane a été évaporé à sec donnant la concrète qui sera pesée pour calculer son rendement en pourcentage par rapport à la matière sèche. Cette dernière a été dissoute dans 10 mL d'éthanol chaud et laissée refroidir à -20°C pendant 24 h, puis filtrée froide pour éliminer la cire qu'elle contient. L'éthanol a été évaporé à sec donnant l'absolu de la tubéreuse (Figure 2.4), et le rendement est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche.

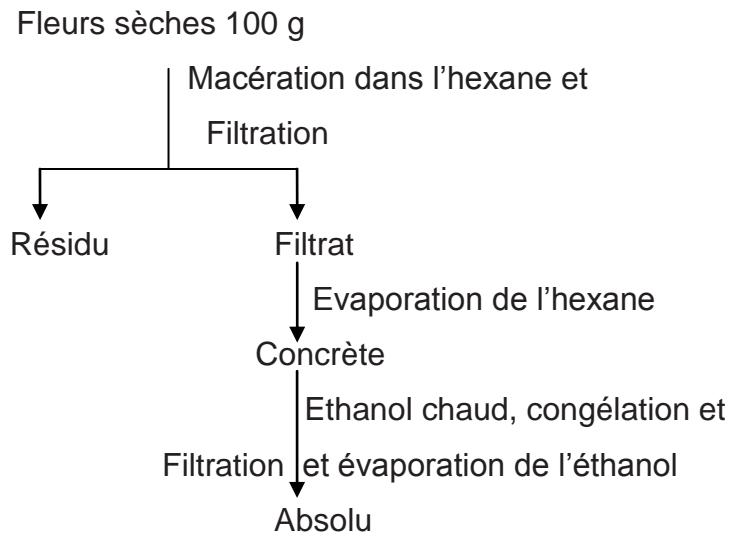


Figure 2.4 : Etapes d'extraction de l'absolu de *P. tuberosa* L.

2.2.3.5. Analyse chromatographique de l'absolu de *Polianthes tuberosa* L.

L'absolu a été analysé par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Agilent GC-MS) selon la méthode de Maiti *et al.* [11]. Une colonne de HP-5 (30 m de long, 0,25 mm de diamètre, 0,25 μm d'épaisseur) a été utilisée pour la séparation des composés volatils. L'Hélium a été utilisé comme gaz vecteur.

Le volume d'injection était de 2 μL (l'absolu est dissous dans le méthanol) avec un rapport de division 2:1. La température de l'injecteur a été fixée à 260°C. La température du four a été initialement fixée à 50°C pendant 2 min, puis portée à 60°C à une vitesse de 2°C/min et maintenue à cette température pendant 2 minutes, puis portée à 210°C à une vitesse de 3 °C/min et maintenue pendant 2 min et enfin à 270°C à 10°C/min et maintenue pendant 7 min. Le débit de la colonne était de 1 mL/min. Les conditions de fonctionnement du spectromètre de masse ont été définies comme suit : température de source d'ions était 200°C, température d'interface 280°C, énergie d'électron 70 eV et la gamme de balayage m/z était de 40-600 a.m.u (unité de masse atomique). Les différents composants ont été identifiés à partir de leurs spectres de masse, et par comparaison avec la littérature [11, 10, 49, 12] et selon les bases de données NIST 11 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) et Wiley 11 (Wiley, New York, NY, USA), le pourcentage relatif de chaque constituant a été calculé à partir du pourcentage global des composants séparés et identifiés.

2.2.4. Etude phytochimique des polyphénols extraits des plants cultivés sans/sous l'effet des biostimulants

L'extraction des polyphénols a été réalisée séparément à partir des bulbes, des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée sans et sous l'effet des biostimulants, selon la méthode solide-liquide décrite par Meziti et *al.*, [111] et Bouriche et *al.*, [113]. 10g de poudre de chacune des parties de la plante (bulbes/feuilles et fleurs) ont été mélangés avec 100mL de méthanol/eau (70:30 v:v), le mélange est macéré pendant 24h sous agitation mécanique et à l'abri de la lumière. L'extrait obtenu est filtré par papier filtre, et une deuxième macération comme la précédente a été effectuée afin d'épuiser l'extrait du poudre, ensuite évaporé à 40°C par un rotavapor (Figure 2.5). Les extraits sont séchés (dans l'étuve à 50°C), ensuite ils ont été pesés pour calculer les rendements exprimés en pourcentage par rapport au poids initial de matériel sèche. Les extraits obtenus ont été conservés à 4°C jusqu'à leurs analyses.

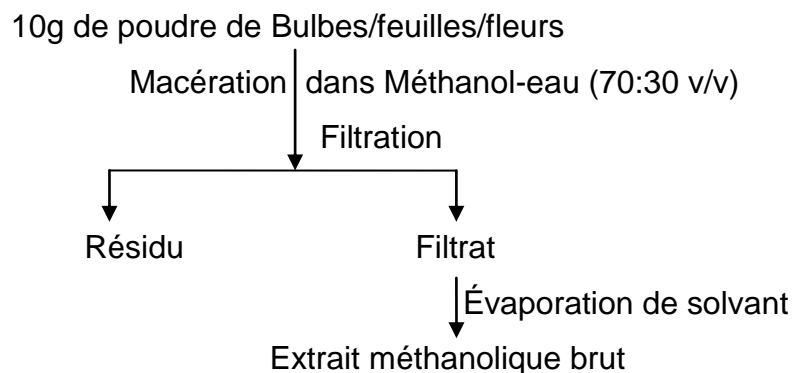


Figure 2.5. Etapes d'extraction des polyphénols des bulbes, des feuilles et des fleurs de *Polianthes tuberosa* L

2.2.4.1. Analyse quantitative des polyphénols

Le dosage quantitatif des polyphénols concerne l'analyse spectoscopique des polyphénols totaux, des flavonoïdes et les tanins condensés.

a. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué suivant la méthode de Folin-Ciocalteu [114]. La teneur totale en phénols est exprimée par rapport à un composé de référence (en µg équivalent d'acide gallique). Un volume de 0.2mL de chaque

extrait (1 mg/mL) a été mélangé à 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (1:10 dans l'eau distillée). Une incubation de 4 minutes a été effectuée, puis 0.8 mL de carbonate de sodium (75 mg/mL) a été ajouté. Après incubation de 2 h à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 765nm. La courbe d'étalonnage a été obtenue dans les mêmes conditions décrites précédemment en utilisant une gamme de concentrations (10-160 µg/mL) de solution d'acide gallique préparée dans l'eau distillée. Les teneurs en phénols totaux des extraits des parties de la plante ont été déterminées graphiquement et exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E).

b. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits de différentes parties de la plante est faite par la méthode du trichlorure d'aluminium [115]. 1 mL de la solution d'AlCl₃ (20 mg/mL dans le méthanol) a été additionné à 1 mL de chaque extrait 1 mg/mL. Après incubation pendant 15 minutes, la lecture a été réalisée à 430 nm.

La courbe d'étalonnage a été établie par les concentrations de la quercétine comme standard (1-50 µg/mL). Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en milligramme équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g E).

c. Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins condensés a été effectuée par la méthode de vanilline citée par Chaouche et *al.* [116]. 50µL d'extrait (10 mg/mL dans le méthanol) a été mélangé avec 3 mL de solution de vanilline 4% (dans le méthanol) et 1.5 mL d'HCl concentré. Le mélange a été incubé pendant 15 minutes. La lecture à 500 nm a été effectuée contre le blanc. La courbe d'étalonnage a été établie dans les mêmes conditions décrites précédemment en utilisant le catéchine (0-300 µg/mL). La teneur en tanins condensés a été exprimée en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g E).

2.2.4.2. Analyse qualitative des polyphénols

L'analyse qualitative des polyphénols et des flavonoïdes a été réalisée par HPLC série Agilent 1200, équipé par une pompe quaternaire 1260 G1311B, détecteur DAD 1260 VL G1315D selon la méthode citée par Justesen et *al.* [117] et Tavallali et *al.*, [118]. Pour cela, 10µl de chaque extrait (1 mg/mL) et de chaque

standard préparé (1 mg/mL) ont été filtré par la suite à travers des filtres seringues de 0.45 µm et ont été injectés par la suite sur une colonne phase inverse C18 (Zobrax Extend-C18), de dimensions égales à 5µm×4.6×250mm. L'élution a été effectuée en faisant varier la proportion du solvant A (acide formique à 1% dans de l'eau distillée) par rapport au solvant B (Méthanol) (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Gradient d'élution de la phase mobile pour la séparation des polyphénols

Temps (mn)	% des solvants B:A
0	Méthanol: acide formique 1% (10:90)
10	Méthanol: acide formique 1% (25:75)
20	Méthanol: acide formique 1% (60:40)
30	Méthanol: acide formique 1% (70:30)
40	Méthanol: acide formique 1% (70:30)
45	Méthanol: acide formique 1% (10:90)

Une minute de rééquilibrage a été retenue pour stabiliser le système, le débit est de 1 mL/mn. La détection a été observée à 280 nm. La quercétine, l'acide gallique, la vanilline, l'acide caféique, l'acide syringique, la rutine, l'acide ascorbique, la catéchine et l'acide salicylique ont été utilisés comme des standards pour l'identification des différents polyphénols dans les différents extraits en fonction de leur temps de rétention.

2.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de différentes parties de la tubéreuse cultivés a été réalisée par le test de DPPH, β-carotène et le pouvoir chélateur, afin d'estimer le pouvoir antioxydant de ces extraits selon leur mode d'action, pour les exploiter comme antioxydants.

2.3.1. Test de DPPH

L'activité anti-radicalaire du DPPH est évaluée selon la méthode de Boumerfeg et *al.* [119], 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits de polyphénols de *P. tuberosa* L. 30-0.2 mg/mL (préparés dans le méthanol), et les extraits des alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa* L., aussi des solutions d'acide

ascorbique et de BHT (comme antioxydants de références) ont été mélangés avec 2.5 mL de la solution de DPPH (0.004 %). Après incubation pendant 30 minutes, les absorbances du mélange ont été mesurées à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH a été calculé comme suit:

$$I\% = 100 (AC - AE) / AC$$

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 (IC₅₀) de chaque extrait a été calculée pour chaque extrait, selon de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur, exprimée en mg/mL.

2.3.2. Test de β-carotène/acide linoléique

Le test de β-carotène/acide linoléique est basé sur la mesure spectrophotométrique de la décoloration de β-carotène par les produits de dégradation de l'acide linoléique [111, 120].

Pour y procéder, une solution mère de β-carotène/acide linoléique a été préparée comme suit: 1mg de β-carotène a été dissous dans 1 mL de chloroforme, 25 µl d'acide linoléique et 200 mg Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement évaporé à l'aide d'un rotavapor, puis, 100 mL d'eau saturée oxygénée (100 mL/min/30 min) ont été ajoutées avec agitation vigoureuse. Ce mélange a été distribué (2.5 mL) dans des tubes à essai et 350 µl de chacun des extraits (2 mg/mL) ont été ajoutés. L'émulsion a été ensuite incubée à l'obscurité et à température ambiante et les absorbances (490 nm) ont été enregistrées après 1 heure, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h.

La même procédure a été répétée avec l'antioxydant synthétique : le BHT et le méthanol et l'eau distillée comme contrôles négatifs. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA%) a été calculé comme suit:

$$AA\% = 100(AE/AC)$$

AE: Absorbance en présence de l'extrait après 48 h.

AC: Absorbance en présence du contrôle positif BHT après 48 h.

2.3.3. Pouvoir chélateur

Le pouvoir chélateur de fer des extraits de *P. tuberosa* a été évalué par le test de ferrozine, qui produit lors de son association avec le fer libre Fe^{2+} le complexe ferrozine- Fe^{2+} d'une couleur violette. En présence des agents chélateurs la formation de ce complexe sera empêcher et par conséquence l'intensité de la couleur diminue. Le test de ferrozine a été évalué selon la méthode citée par Le *et al.* [121]. En effet, 500 μL de différentes concentrations des extraits des polyphénols de *P. tuberosa* L. et de chélateur standard EDTA (extrait de 0-35 mg/mL, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été mélangé avec 100 μL de FeCl_2 (0.6 mM en eau) et 900 μL de MeOH. Le contrôle contient les mêmes réactifs sauf l'extrait ou l'EDTA. Le mélange a été bien agité et laissé réagir pendant 5 mn, ensuite, 100 μL de ferrozine (5 mM en méthanol) a été additionné, le mélange a été agité encore une fois et une incubation à température ambiante pendant 10 mn a été effectué pour que le fer résiduel s'associe. L'absorbance a été mesurée à 562 nm. L'effet chélateur (%Ch) des extraits et de standard a été calculé comme suit :

$$\% \text{ Ch} = 100 (1 - \text{AE}/\text{AC})$$

AE : Absorbance de l'extrait d'étude ou le chélateur standard,

AC : Absorbance de contrôle.

Les résultats sont déterminés en EC_{50} concentration efficace de substance étudiée permettant le balayage de 50% de Fer dans le milieu réactionnel.

3. Analyse statistique

Les résultats des paramètres de croissance et de floraison de la culture de *P. tuberosa* L. sont représentés en moyenne \pm standard de déviation (SD) de trois répétitions. Chaque répétition renferme deux plants (pour la culture 2016), et trois plants (pour la culture de 2017). L'analyse de variance des résultats a été effectuée par GLM suivi par le test de Tukey en utilisant le Systat 7, et la différence est considérée significative à un seuil de confiance de ($p \leq 0.05$).

Chaque test biologique a été répété trois fois et les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. L'analyse statistique a été faite par l'analyse de variance sens

unique ANOVA suivi par le test de Tukey en utilisant GraphPad Prism ver. 06. La différence est considérée significative à un seuil de confiance de ($p \leq 0.05$).

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. RÉSULTATS

1. Mise en culture de *Polianthes tuberosa* L.

1.1. Culture témoin de *P. tuberosa* L.

1.1.1 Paramètres de croissance

1.1.1.1 Germination des bulbes

La période de la germination des bulbes selon les conditions de la culture et les diamètres sont présentés dans la Figure 3.1. D'après les résultats obtenus, il ressort que l'effet de diamètre des bulbes sur la germination est important. Les gros bulbes ayant un diamètre entre 3-4 cm germent en premier ensuite ceux de taille moyenne et en dernier les petits bulbes, où la germination était tardive, la différence était hautement significative ($p=0.000$). Par ailleurs, la germination était similaire pour l'ensemble des bulbes cultivés en plein champ et ceux cultivés sous abri. La différence n'était pas significative entre les périodes de germination des bulbes ($p>0.05$). La culture menée en plein champ a nettement réduit la durée de germination des bulbes de taille moyenne comparée à celle des bulbes cultivés sous abri.

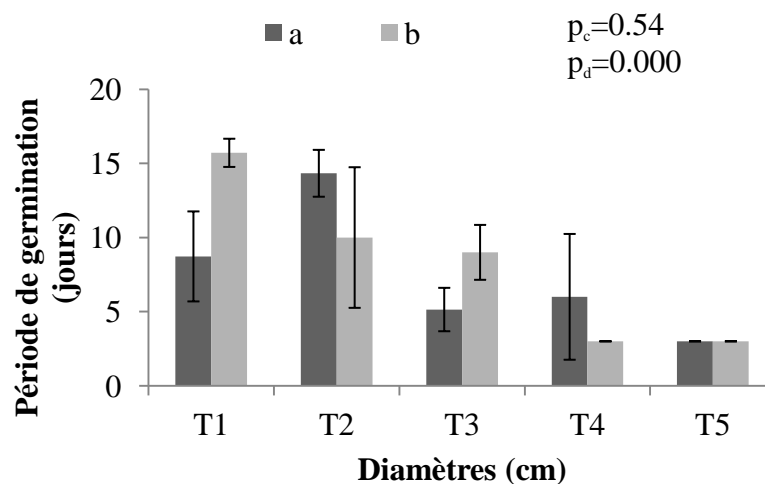


Figure 3.1.: Période de germination des bulbes de *Polianthes tuberosa* L. en fonction des conditions de la culture et les tailles des bulbes.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T_1 : ≤ 1 cm, T_2 : 1-1.5 cm, T_3 : 1.5-2 cm, T_4 : 2-3 cm et T_5 : 3-4 cm

1.1.1.2. Emergence des feuilles

L'émergence des feuilles chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. en fonction des tailles des bulbes, ainsi que sous les conditions de la culture sont représentées dans la Figure 3.2. En effet, une différence hautement significative a été enregistrée sur l'émergence des feuilles selon les diamètres des bulbes, et selon la condition de la culture ($p < 0.05$). Les gros bulbes ont montré une émergence des feuilles précoce, et la culture sous abri a réduit la période d'émergence des feuilles.

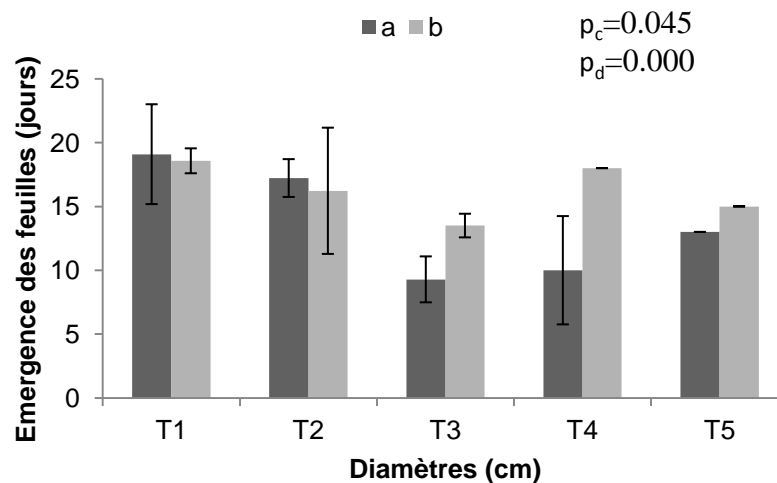


Figure 3.2 : Emergence des feuilles chez *P. tuberosa* L. en fonction des tailles des bulbes et la condition de la culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T₁ : ≤ 1 cm, T₂ : 1-1.5 cm, T₃ : 1.5-2 cm, T₄ : 2-3 cm et T₅ : 3-4 cm

1.1.1.3. Emergence de la hampe

L'émergence de la hampe chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. en fonction des tailles des bulbes ainsi que les conditions de la culture sont représentées dans la Figure 3.3. Il ressort que l'émergence de la hampe a été conditionnée principalement par la taille des bulbes où la différence était hautement significative ($p < 0.05$), mais un effet similaire a été enregistré selon les conditions de culture ($p > 0.05$).

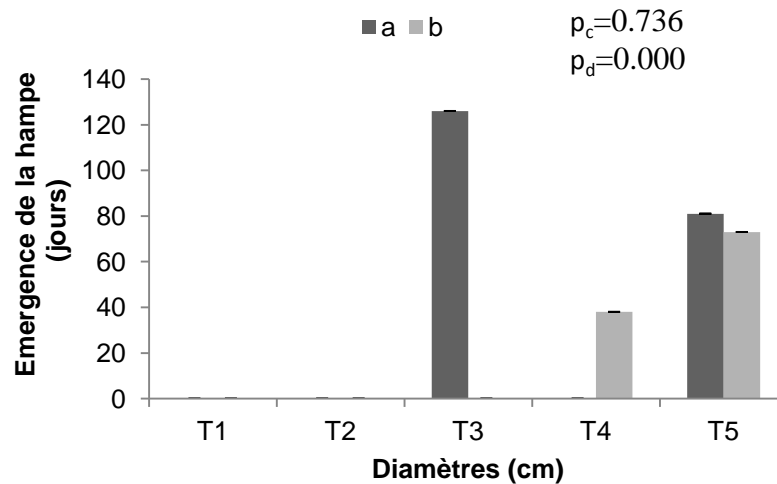


Figure 3.3 : Emergence de la hampe de *Polianthes tuberosa* L. en fonction des diamètres des bulbes et en fonction de condition de culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T₁ : ≤ 1 cm, T₂ : 1-1.5 cm, T₃ : 1.5-2 cm, T₄ : 2-3 cm et T₅ : 3-4 cm

1.1.1.4. Nombre de feuilles

Le nombre de feuilles chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. selon les diamètres des bulbes, ainsi que sous l'effet des conditions de la culture sont représentées dans la Figure 3.4. Le nombre de feuilles a été influencé par la taille des bulbes, où la différence était hautement significative ($p < 0.05$). Les gros bulbes ont montré un nombre plus important en feuilles que les petits bulbes, alors que l'effet des conditions de culture sur le nombre de feuilles était similaire ($p > 0.05$).

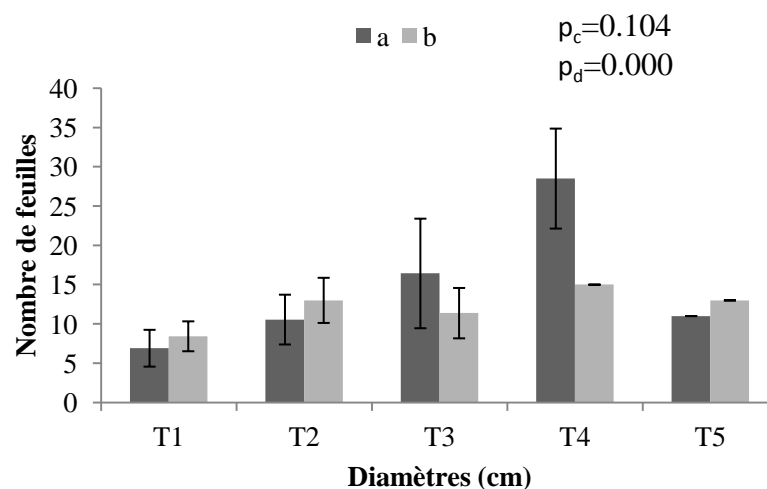


Figure 3.4 : Nombre de feuilles chez *Polianthes tuberosa* L. cultivée selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T_1 : ≤ 1 cm, T_2 : 1-1.5 cm, T_3 : 1.5-2 cm, T_4 : 2-3 cm et T_5 : 3-4 cm.

1.1.1.5. Hauteur de la plante

La hauteur des plants cultivés de *P. tuberosa* L. selon les tailles des bulbes et en fonction des conditions de la culture sont représentées dans la Figure 3.5. La hauteur des plants a été influencée par le diamètre des bulbes ($p < 0.05$), où les gros bulbes ont montré une hauteur des plants plus importante. Aussi, une différence hautement significative ($p < 0.05$) a été enregistrée entre les plants cultivés sous-abri, ils étaient plus longs que ceux cultivés en plein champ.

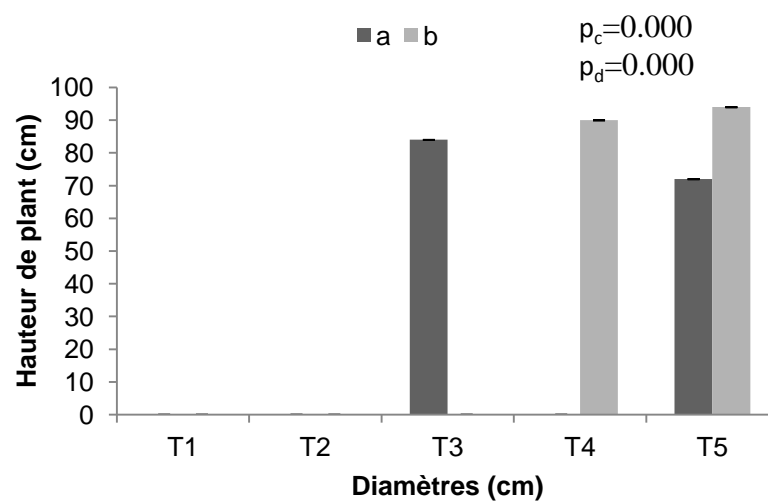


Figure 3.5 : Hauteur des plants de *Polygonatum tuberosum* L. selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T_1 : ≤ 1 cm, T_2 : 1-1.5 cm, T_3 : 1.5-2 cm, T_4 : 2-3 cm et T_5 : 3-4 cm

1.1.2. Paramètres de floraison

1.1.2.1. Emergence des fleurs

L'émergence des fleurs chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. selon les tailles des bulbes et les conditions de la culture sont présentées dans la Figure 3.6. D'après les résultats obtenus, l'émergence des fleurs a été influencée par la taille des bulbes (différence hautement significative $p < 0.05$). Les gros bulbes ont révélé une émergence précoce. La culture sous abri a également amélioré l'émergence des fleurs des plants issus des bulbes de taille ≥ 2 cm, alors que la culture menée en plein champ a stimulé la floraison chez certains bulbes ayant une taille ≤ 2 cm.

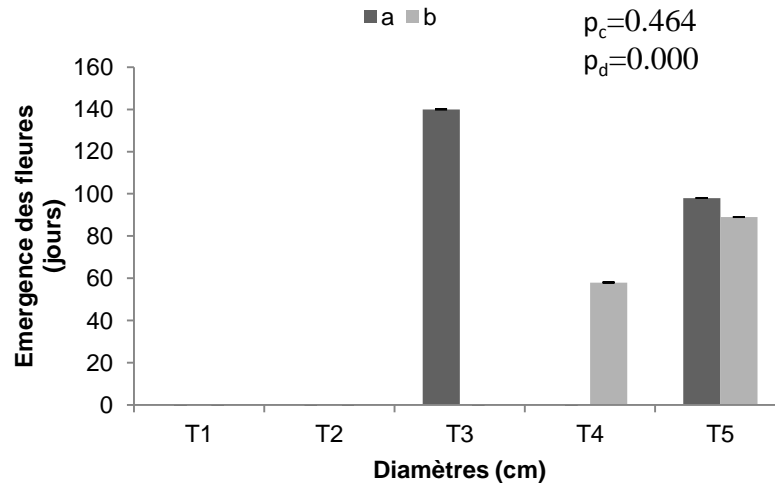


Figure 3.6 : Emergence des fleurs selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T_1 : ≤ 1 cm, T_2 : 1-1.5 cm, T_3 : 1.5-2 cm, T_4 : 2-3 cm et T_5 : 3-4 cm

1.1.2.2. Nombre de fleurs et longueur de la hampe

Le nombre de fleurs et la longueur de la hampe chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. selon les tailles des bulbes et sous les conditions de la culture sont représentés dans la Figure 3.7. Le nombre de fleurs était important pour les gros bulbes (différence hautement significative $p < 0.05$), et la culture sous abri a augmenté le nombre de fleurs (différence hautement significative $p < 0.05$). La longueur de la hampe était proportionnelle au nombre de fleurs. Elle était longue chez les gros bulbes (différence hautement significative $p < 0.05$), et importante sous l'abri (différence hautement significative $p < 0.05$).

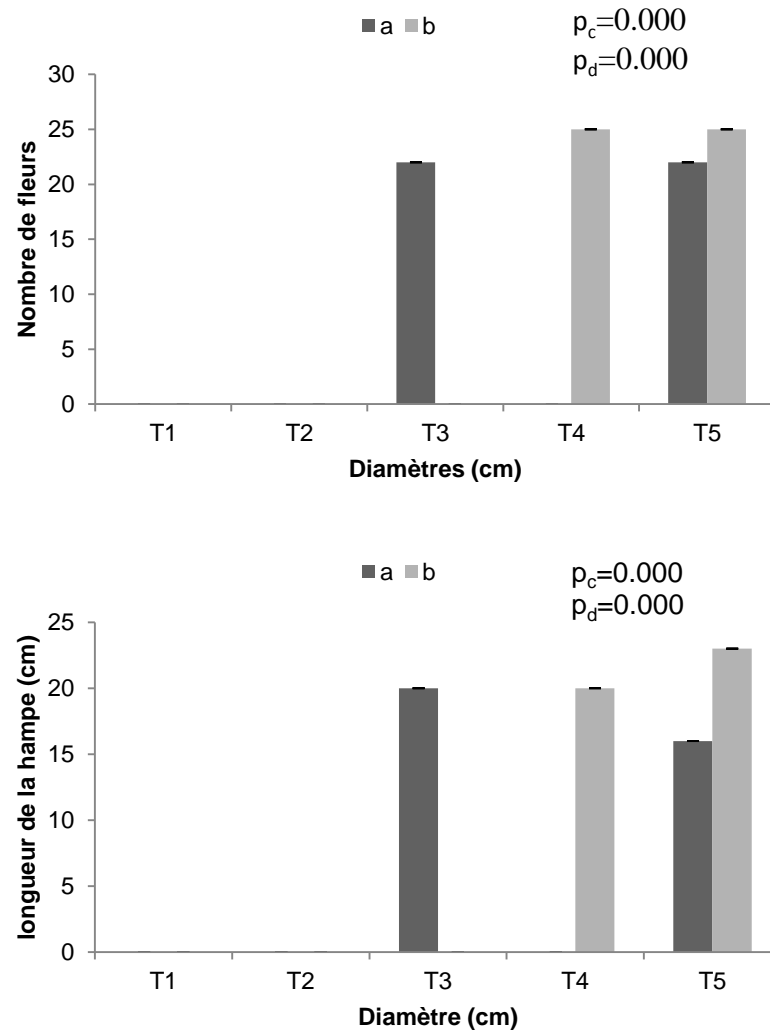


Figure 3.7 : Nombre de fleurs et longueur de la hampe chez *Polianthes tuberosa* L. selon les diamètres des bulbes et les conditions de culture.

p_c : probabilité de condition de culture, p_d : probabilité de diamètre des bulbes, a : culture en plein champ, b : culture sous abri. T₁ : ≤ 1 cm, T₂ : 1-1.5 cm, T₃ : 1.5-2 cm, T₄ : 2-3 cm et T₅ : 3-4 cm

II. DISCUSSION

Les paramètres de croissance des plants cultivés de *P. tuberosa* L. sous les deux conditions expérimentales et selon les différentes tailles des bulbes, à savoir, la germination, l'émergence des feuilles, et celle de la hampe et le nombre des feuilles, ont prouvé l'effet similaire des conditions de culture ($p > 0.05$). Cependant, la culture sous-abri a montré des plants plus longs. L'effet remarquable (différence significative, $p < 0.05$) a été noté chez les gros bulbes, dont la croissance était plus importante. Ainsi, la taille des bulbes a un impact sur la durée nécessaire pour la

germination, l'émergence des bulbes, l'émergence de la hampe et l'augmentation du nombre des feuilles par plant. Ces résultats sont en concordance avec ceux d'El-Sayed [40] et de Hatamazdah et *al.* [31], où les gros bulbes de *P. tuberosa* présentent une bonne croissance par rapport aux petits bulbes cultivés sous serre, et une réduction des jours nécessaires pour la germination, l'émergence des feuilles, et une production importante en feuilles ont été enregistrés.

L'émergence des fleurs a été influencée par la taille des bulbes. Les gros bulbes ont donné une émergence précoce et une bonne production en fleurs, par contre la culture sous abri a amélioré l'émergence des fleurs chez les gros bulbes par rapport aux autres exposées aux conditions naturelles. Le nombre de fleurs était important pour les gros bulbes en comparaison avec les petits bulbes, et la culture sous abri a augmenté le nombre de fleurs par rapport à la culture externe. La longueur de la hampe était proportionnelle au nombre de fleurs. Elle était longue chez les gros bulbes et sous l'abri. La même tendance a été soulevée par Hatamzadeh et *al.* [31], où au niveau d'une culture des bulbes sous serre de *Polianthes tuberosa* L., les gros bulbes ont produit et augmenté le nombre des fleurs par rapport aux petits bulbes. Ces derniers n'ont pas donné des fleurs, qui confirment nos résultats. Cette différence est due à la carence physiologique au niveau des petits bulbes, traduite par une faible activité métabolique des carbohydrates au niveau des petits bulbes. Les travaux d'Ahmed et *al.* [30] et Amin et *al.* [34] confirment et supportent nos résultats, dont les gros bulbes de *P. tuberosa* L. cultivés sous condition climatique naturelle du Pakistan et du Bangladesh respectivement, ont donné un nombre important en fleurs par rapport aux petits bulbes. Ceci est lié à l'intense de la photosynthèse au niveau des gros bulbes que les petits [30].

1.2. Conduite de la culture de *Polianthes tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants

1.2.1. Paramètres de croissance

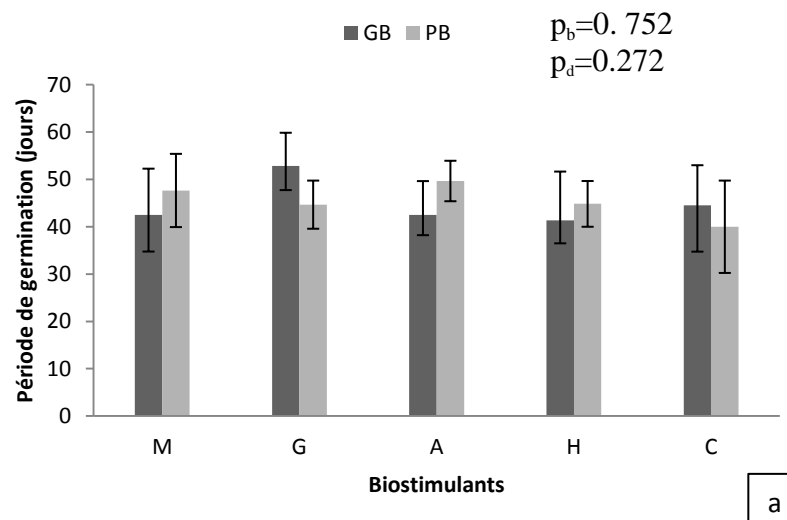
1.2.1.1. Germination des bulbes

La période de la germination des bulbes de *P. tuberosa* L. (Figure 3.8) a été affectée par l'utilisation des biostimulants. La première année de culture, le marc de café, l'acide humique et l'hydrolat des plumes ont stimulé la germination comparés aux bulbes témoins et ceux traités par les grignons d'olive (Figure 3.8a), qui ont montré une prolongation de la période de germination. Cependant, les

petits bulbes ont révélé une prolongation de la période de la germination sous l'effet des biostimulants. En général, l'hydrolat des plumes a réduit la durée de germination par rapport au témoin et aux autres biostimulants.

L'analyse de variance des périodes de germination des bulbes a montré que l'effet des biostimulants (Figure 3.8a) sur la période de germination est similaire et la différence est non significative ($p > 0.05$). Les stimulants testés avaient un effet inférieur à celui de témoin. Le facteur diamètre des bulbes a montré un effet non significatif ($p > 0.05$) entre les gros et les petits bulbes sur la période de germination.

Les résultats de la deuxième culture sont présentés dans la Figure 3.8b. Ils ont montré que l'hydrolat des plumes a réduit la durée de la germination par rapport au témoin, suivi par le marc de café et les grignons d'olive. Selon l'analyse de variance, la taille des bulbes n'a pas d'effet sur la durée de germination ($p > 0.05$), contrairement à l'effet marquant des biostimulants ($p < 0.05$).



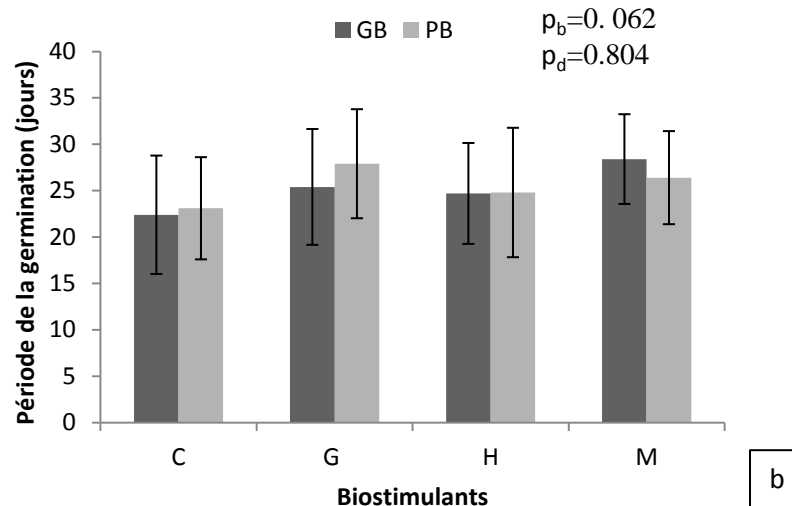


Figure 3.8 : Période de germination des bulbes de *Polianthes tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants et selon la taille des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petit bulbes, p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.1.2. Emergence des feuilles

Il ressort que l'émergence des feuilles n'a pas été affectée par le type de biostimulants testés (Figure 3.9a). L'application de l'hydrolat des plumes, du marc de café et de l'acide humique ont favorablement réduit la période d'émergence des feuilles pour le cas de gros bulbes, tandis que l'utilisation du marc de café et de l'acide humique l'a prolongée pour les petits bulbes. Cependant, la même période d'émergence des feuilles a été enregistrée pour les deux tailles des bulbes traités par les grignons d'olive. Une différence non significative a été enregistrée sur la période d'émergence des feuilles ($p > 0.05$) selon les biostimulants testés et selon la taille des bulbes (Figure 3.9a).

L'émergence des feuilles a été similaire chez les plants cultivés de *Polianthes tuberosa* L. témoins et ceux cultivés sous l'effet des biostimulants en 2017 et selon la taille des bulbes ($p > 0.05$) (Figure 3.9b).

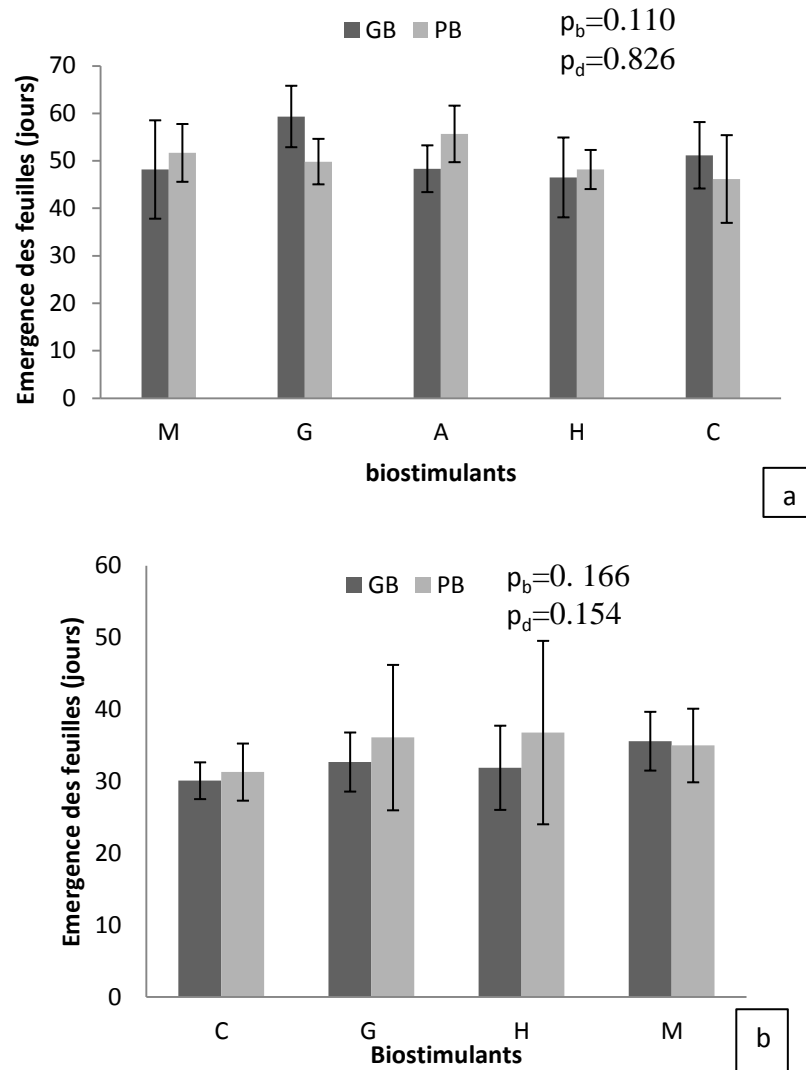


Figure 3.9 : Emergence des feuilles chez *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes.

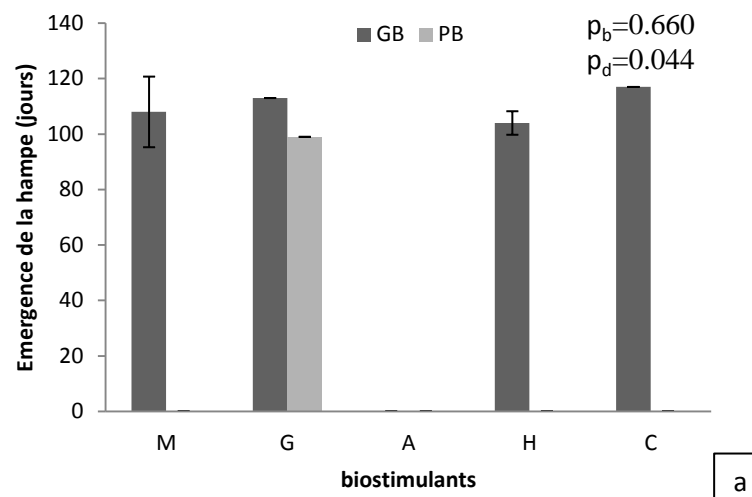
H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.1.3. Emergence de la hampe

L'hydrolat des plumes a réduit les jours requis pour l'émergence de la hampe chez les bulbes (Figure 3.10a), suivi par le marc de café et les grignons d'olive. Ces derniers ont induit l'apparition précoce de la hampe chez les petits bulbes, comparés aux gros bulbes et les autres traitements et le témoin. Cependant, aucune apparition de la hampe n'a été enregistrée chez les bulbes traités par l'acide humique.

L'analyse de la variance des périodes d'apparition de la hampe n'a pas montré l'influence des types de traitements (différence non significative $p > 0.05$), mais une différence significative a été enregistrée pour le facteur diamètre des bulbes (différence significative $p < 0.05$) (Figure 3.10a).

Les résultats de la deuxième conduite de la culture sous l'effet des biostimulants sont présentés dans la Figure 3.10b. Ils ont montré que seuls les gros bulbes ont formé des hampes (une différence hautement significative avec ceux des petits bulbes $p < 0.05$). Les grignons d'olive ont nettement réduit la durée d'émergence de la hampe, suivi par le marc de café, le témoin et l'hydrolat des plumes. Cependant, le nombre de plants montrant des hampes était important sous l'effet d'hydrolat des plumes (7/10 plants) comparés à ceux conduits sous l'effet de marc de café (4/10 plants), les plants de témoin (3/10 plants) et ceux traités par les grignons d'olive (2/10 plants) ($p > 0.05$).



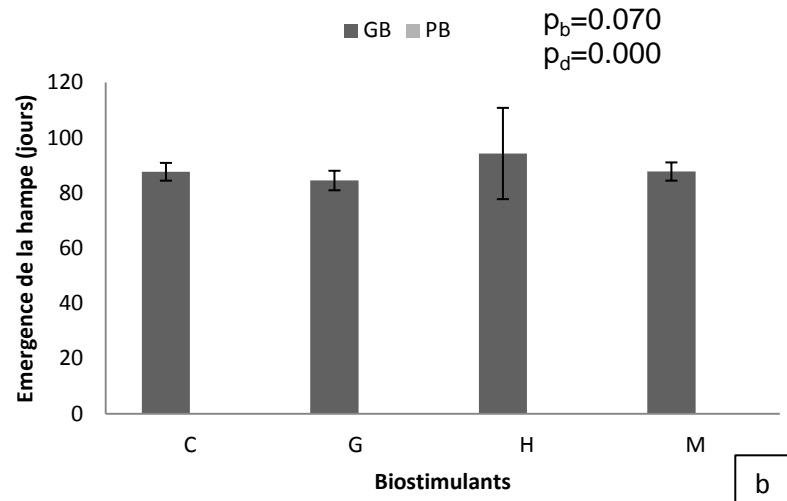


Figure 3.10: Emergence de la hampe chez *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.1.4. Nombre de feuilles

Le nombre de feuilles enregistré chez les plants cultivés sous l'effet des biostimulants était moindre qu'au niveau des plants témoins (Figure 3.11a). L'application des biostimulants n'a pas affecté le nombre de feuilles par plant. Il était similaire et non significatif ($p > 0.05$) (Figure 3.11a), alors que l'effet de diamètre des bulbes a montré un nombre important de feuilles chez les plants issus des gros bulbes ($p < 0.05$) (Figure 3.11a).

Le nombre de feuilles chez les plants cultivés de *Polianthes tuberosa* sous l'effet des biostimulants pour la deuxième conduite est représenté dans la Figure 3.11b. Le nombre de feuilles enregistré était important chez les plants témoins, suivi par le marc de café, les grignons d'olive et l'hydrolat des plumes ($p > 0.05$). En revanche, les gros bulbes ont donné un nombre important de feuilles comparés aux petits bulbes d'une façon hautement significative ($p < 0.05$).

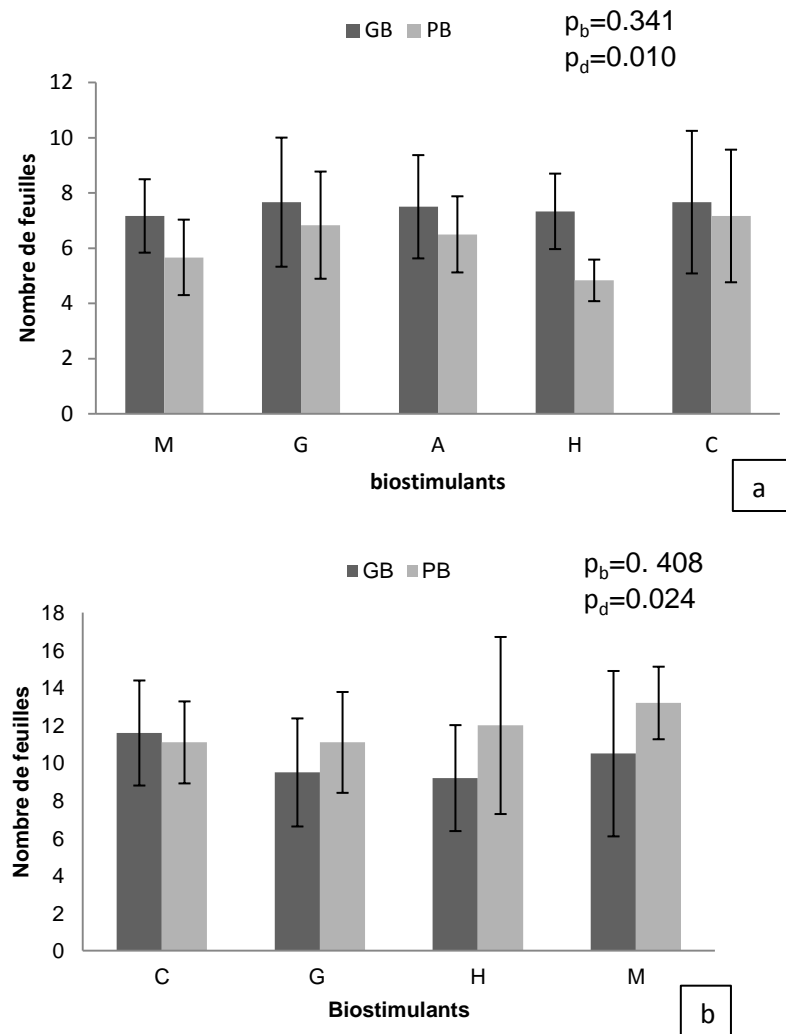


Figure 3.11 : Nombre de feuilles chez *P. tuberosa* L. traitée par les biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.1.5. Hauteur des plants

La hauteur des plants de *P. tuberosa* L. a été affectée par l'application des biostimulants (Figure 3.12a). Le classement des plants cultivés selon leur hauteur a montré par ordre décroissant, ceux issus de l'application du marc de café, de l'hydrolat des plumes et les grignons d'olive par rapport au témoin. Les bulbes traités par l'acide humique n'ont pas donné des hampes, ils avaient uniquement donné des feuilles et ils ont arrêté à ce stade. Un effet similaire et non significatif des biostimulants ($p > 0.05$) a été enregistré, mais l'effet de la taille des bulbes était

significatif ($p < 0.05$), où les gros bulbes ont montré des plants plus allongés (105-129 cm) (Figure 3.12a).

La hauteur des plants de *Polianthes tuberosa* L cultivés en 2017 sous l'effet des biostimulants est représentée dans la Figure 3.12b. L'hydrolat des plumes a montré des plants plus longs, suivis par ceux traités par les grignons d'olive, le marc de café et les plants témoins. La taille des bulbes a également influencé sur la hauteur des plants, où les gros bulbes ont continué leur croissance jusqu'au stade de floraison. L'analyse de variance montre que l'hauteur des plants sous l'effet des biostimulants était marginalement significative ($p = 0.07$), mais la différence était significative pour la hauteur des plants selon la taille des bulbes ($68.33-82.42$ cm) ($p < 0.05$) (Figure 3.12b).

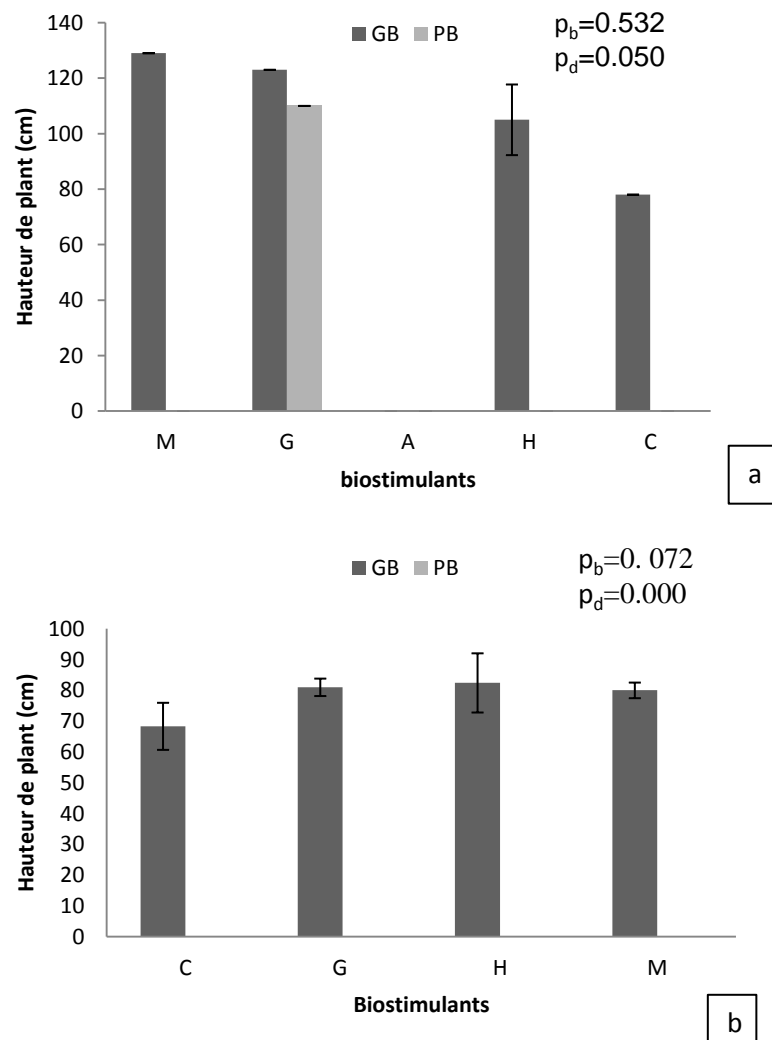


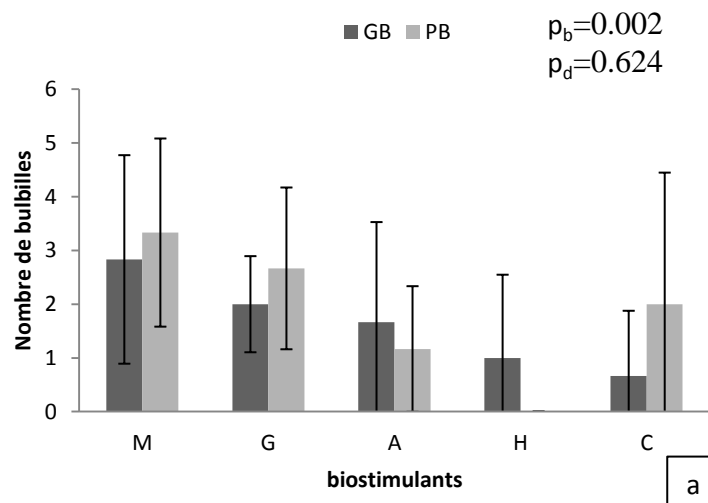
Figure 3.12 : Hauteur des plants chez *P. tuberosa* L. cultivées dans des biostimulants en utilisant deux tailles des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.1.6. Production des bulbilles

Le nombre de bulbilles est influencé par l'application des biostimulants (Figure 3.13 a,b). Pour la première culture (Figure 3.13a), l'application de marc a montré le meilleur rendement en bulbilles, suivie par les grignons d'olive, le témoin et l'acide humique qui ont donné un nombre de bulbilles plus que l'hydrolat des plumes. Ce dernier a donné le plus faible rendement en bulbilles. L'effet des biostimulants sur la production des bulbilles par plant est significatif ($p < 0.05$). Cependant, la production des bulbilles n'était pas affectée par la taille des bulbes ($p > 0.05$) (Figure 3.13a).

Pour la deuxième culture, les résultats de la production des bulbilles sont représentés dans la Figure 3.13b. En effet, les grignons d'olive ont induit un nombre important de bulbilles suivi par le marc de café, les témoins et l'hydrolat des plumes. L'effet des biostimulants était variable et hautement significatif ($p < 0.05$). Contrairement, l'effet de la taille des bulbes était similaire sur la production des bulbilles ($p > 0.05$) (Figure 3.13b).



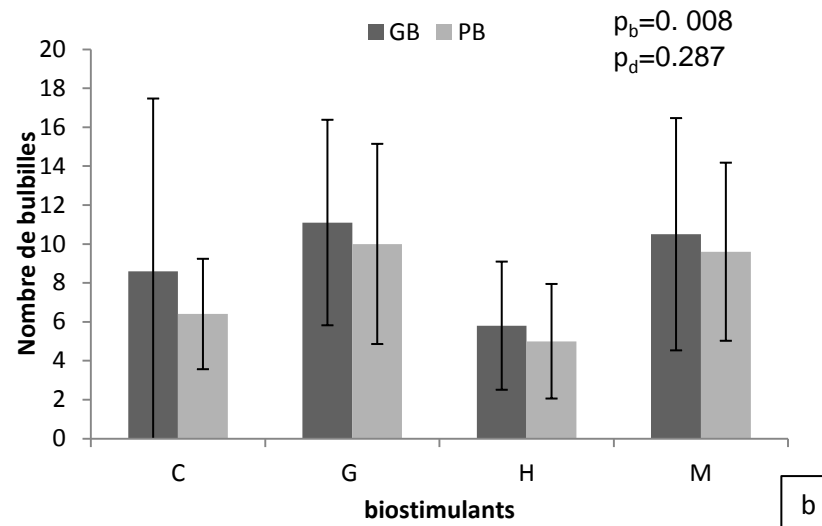


Figure 3.13: Nombre de bulbillles chez *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants et selon les tailles des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.2. Paramètres de floraison

1.2.2.1. Emergence des fleurs

La période d'émergence des fleurs (Figure 3.14 a,b) a été significativement réduite par l'application des biostimulants, pour la première culture durant 2016. L'effet des biostimulants a montré une différence non significative ($p > 0.05$) (Figure 3.14a). L'application des grignons d'olive, d'hydrolat des plumes et le marc de café ont engendré un effet similaire (Figure 3.14a). Ils ont tous accéléré le processus de floraison. Cependant, le témoin a montré l'apparition de la hampe sans donner des fleurs. Le même cas a été enregistré pour les petits bulbes traités par les grignons d'olive. Par ailleurs, l'effet de taille des bulbes sur l'émergence des fleurs était significatif ($p < 0.05$). Les gros bulbes ont donné un nombre de fleurs plus important que les petits.

Les résultats de l'émergence des fleurs de *P. tuberosa* L. pour la deuxième culture sont représentés dans la Figure 3.14b. L'émergence des fleurs a été enregistrée uniquement chez les gros bulbes. L'application des grignons d'olive a nettement réduit les jours requis pour l'émergence des fleurs dans les plants cultivés de *Polianthes tuberosa* L., suivis par l'hydrolat des plumes, des témoins et le marc de café. L'analyse de variance de l'émergence des fleurs a montré une différence

hautement significative que pour l'effet de taille des bulbes ($p < 0.05$), alors qu'une similarité a été soulignée pour les biostimulants testés ($p > 0.05$) (Figure 3.14b).

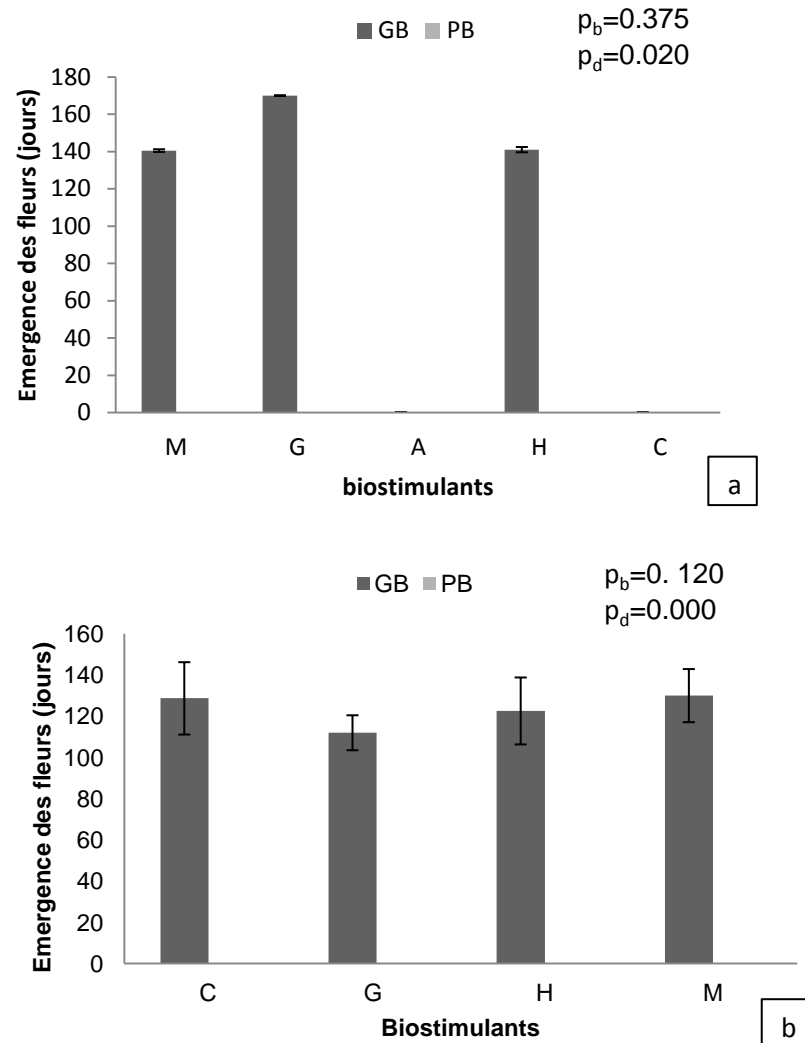


Figure 3.14 : Emergence des fleurs chez les plants cultivées de *P. tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants et selon deux tailles des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

1.2.2.2 Nombre de fleurs et longueur de la hampe

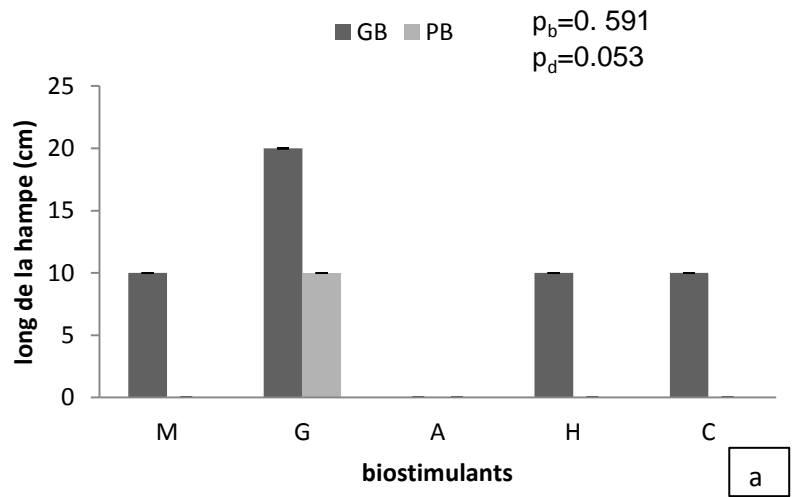
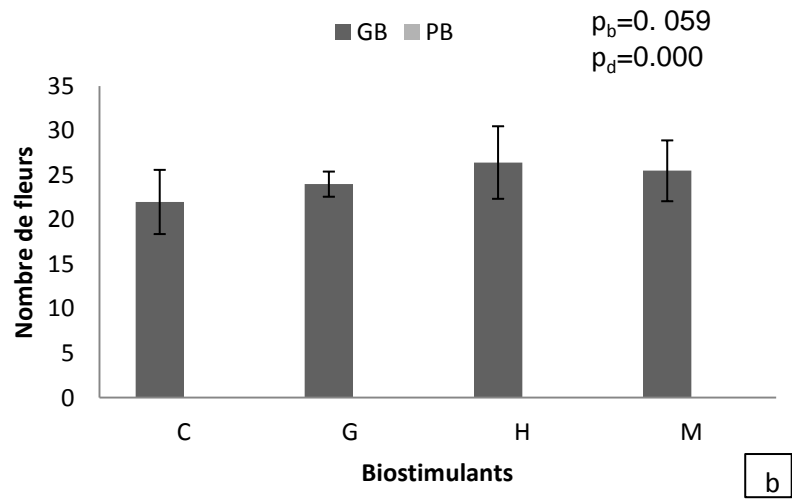
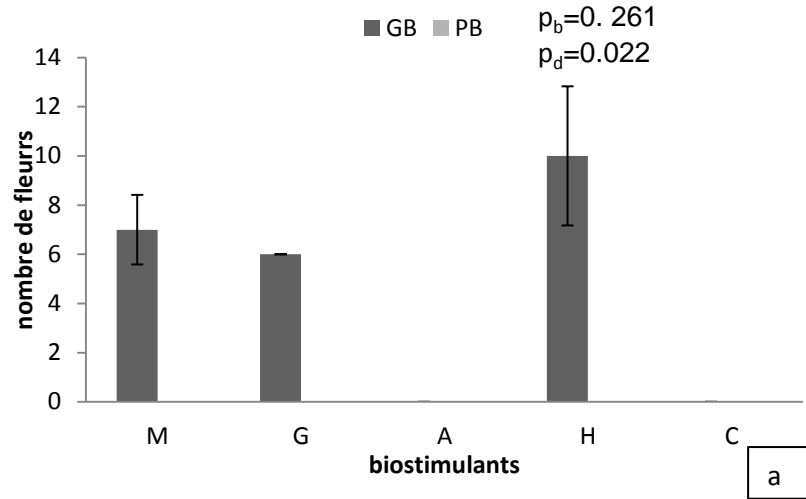
Les résultats de la première culture (Figure 3.15a) ont révélé que l'hydrolat des plumes a augmenté le nombre des fleurs, suivi par le marc de café et les grignons d'olive pour les gros bulbes. Cependant, ces derniers n'ont pas montré l'effet sur la floraison chez les petits bulbes. Comme pour les témoins, l'acide humique n'a pas eu d'effet sur la floraison. Il y'a eu formation de la hampe mais sans floraison.

La longueur de cette dernière (Figure 3.15a) variait selon les traitements utilisés. L'hydrolat des plumes a enregistré le plus important nombre de fleurs avec une hampe très petite (10 cm) contrairement aux grignons d'olive, qui ont induit un faible nombre de fleurs sur une hampe allongée, mais, une similarité pour le marc de café un faible nombre de fleurs sur une courte hampe. Nous avons remarqué qu'une bonne croissance de la hampe a poussé chez les témoins et les grignons d'olive (chez les petits bulbes) avec un faible nombre de fleurs.

L'analyse de variance du nombre de fleurs produit a révélé l'effet des biostimulants sur le nombre de fleurs, mais une différence non significative ($p > 0.05$), concernant la taille des bulbes. Les gros bulbes ont enregistré un nombre de fleurs plus important que chez les petits, la différence était significative ($p < 0.05$). Tandis que l'effet de production de fleurs était significatif pour les gros bulbes donnant une longue hampe florale ($p \leq 0.05$).

Pour la deuxième culture, il ressort que l'hydrolat des plumes a donné un nombre important de fleurs (26 fleurs) (Figures 3.15b), suivi par le marc de café (25 fleurs), les grignons d'olive (24 fleurs) et les témoins (22 fleurs). L'analyse de variance du nombre de fleurs par plant cultivé a montré une différence hautement significative ($p < 0.05$) entre les biostimulants et la taille des bulbes.

Une similarité a été enregistrée entre les biostimulants ($p > 0.05$) pour la longueur de la hampe (Figure 3.15b). Le marc de café a produit des hampes plus longues (24cm), suivi par les grignons d'olive (22.5cm), l'hydrolat des plumes (20.42cm) et les témoins (16cm). Donc, aucune corrélation n'existe entre le nombre de fleurs et la longueur de la hampe. Une différence hautement significative a été décelée entre la taille des bulbes ($p < 0.05$), où les gros bulbes seuls ont achevé la floraison. Les petits bulbes ont arrêté leur croissance en stade feuillaison (Figure 3.15b).



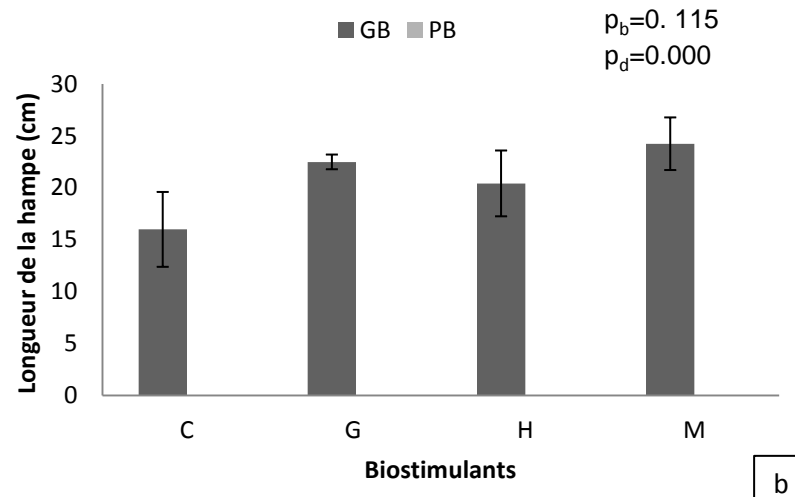


Figure 3.15 : Nombre de fleurs et longueur de la hampe chez les plants cultivés de *P. tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants, selon la taille des bulbes.

H : hydrolat des plumes, M : marc de café, A : acide humique, T : témoin, GB : gros bulbes, PB : petits bulbes. p_b : probabilité des biostimulants, p_d : probabilité de diamètre, a : conduite de la culture 2016, b : conduite de la culture 2017.

II.DISCUSSION

L'étude de l'effet des biostimulants sur la croissance des plants de *P. tuberosa* L. cultivés sous serre au niveau du département de Biotechnologies, à l'université de Blida 1 durant 2016 et 2017, a montré une différence entre les deux années en ce qui concerne ; la germination des bulbes, l'émergence de la hampe, le nombre de feuilles, et la hauteur des plants. Par ailleurs, une similarité entre les deux années a été enregistrée en ce qui concerne, l'émergence et le nombre de fleurs selon les biostimulants, qui peuvent être expliqués par la différence climatique des deux années.

Les résultats obtenus ont montré l'effet positif de l'hydrolat des plumes sur la croissance, et la floraison de la tubéreuse, qui est dû essentiellement à la richesse de l'hydrolat des plumes en acides aminés particulièrement la cystéine, la glycine, l'arginine, la phénylalanine et la kératine [122] qui ont un impact sur le sol et sur la plante traitée dont : l'hydrolat des protéines augmente l'activité enzymatique et microbienne dans le sol [123], tels que l'*Azotobacter*, *Azospirillum*. Ces microorganismes ont un impact stimulant sur la croissance et la floraison de la tubéreuse bien déterminé dans la littérature [46, 47, 50, 51]. L'application

d'hydrolat des protéines favorise aussi la mobilité et la solubilité des micronutriments (une conductivité électrique estimée dans notre travail de 1.6 mmhos/cm, et une capacité d'échange cationique 12.01 méq/100g). Comme l'hydrolat peut interférer comme phytohormone-like pour la plante [123]. D'ailleurs, l'application de l'acide gibbérellique (100 ppm) aussi que le benzyladénine ont été reporté qu'ils valorisent la croissance et la floraison chez la tubéreuse [45,49], qui conforme peut être l'effet stimulant d'hydrolat des plumes.

Le marc de café a également enregistré un effet stimulant sur la croissance et la floraison des plants cultivés de *P. tuberosa* L. Il a engendré aussi à une production importante en bulbilles par bulbe et à des hampes allongées. Ceci est dû à l'azote organique qu'il renferme, plus le phosphore et le calcium, à côté des monosaccharides tels que le mannose, le galactose, l'arabinose et le glucose [124]. Nos résultats sont en concordance avec ceux issus d'une culture de la plante traitée par des engrais chimiques par exemple, l'application de 200-300 kg d'azote/ha a augmenté le nombre de fleurs et de bulbilles par plant. Il a donné également une longue hampe florale [27,36]. D'après nos connaissances aucun travail de recherche n'a été porté sur l'effet de marc de café sur la culture de la tubéreuse. Cervera-Mata et *al.* [125] a rapporté que l'application de marc de café frais a amélioré le rendement en carbone organique, et le NPK, au niveau de terre agricole en Espagne, mais ça a abimé la croissance de la laitue. La littérature a rapporté que l'application du marc de café frais diminue le taux des macros et des micros éléments minéraux ce qui réduit la croissance des plants cultivés [125, 126]. Ces données ne se concordent pas avec nos résultats, où l'application de marc de café séché a nettement amélioré en quelque sorte la croissance et la floraison des plants cultivés de *P. tuberosa* L. qui est dû à sa richesse en carbone et en matière organique (3.93%, 6.77% respectivement).

Selon les analyses physico-chimique du sol utilisé, il est riche en phosphore sous l'effet des traitements à base d'hydrolat des plumes et de marc de café (473.27 ppm, 387.77 ppm respectivement) comparé au sol des témoins et aux autres traitements, ça explique l'induction florale enregistrée chez la tubéreuse traitée par ces derniers comparés aux témoins et aux autres traitements. Nos résultats concordent avec ceux d'Amin et *al.* [34], Nair et *al.* [37] et Selim et *al.* [127], qui ont tous démontré que le phosphore stimule la production florale chez *P. tuberosa* L.

Les grignons d'olive ont généralement un effet tardif sur la croissance qui peut être dû au phytotoxine (phénol) présent dans le fertilisant qui influence la germination et la croissance des plants [62]. Nos résultats ont révélé que les grignons d'olive ont induit la floraison chez les petits bulbes contrairement aux autres traitements. Certains travaux [30] ont montré que seuls les gros bulbes donneront des fleurs. Ceci a été justifié par la maturité physiologique des gros bulbes par rapport aux petits. D'ailleurs, El-Sayed [40] a signalé que la germination des bulbes et la croissance de la tubéreuse ne dépend pas à l'apport organique, mais elle est liée exclusivement aux gros bulbes. Selon Assaf et *al.* [62], l'amendement du sol par les grignons d'olive augmente la concentration de phosphore dans le pois chiche. Aussi, la teneur en phosphore dans les grignons d'olive a été estimée à 198.47 ppm, ce dernier est un élément essentiel pour la production de la hampe et possède un effet significatif sur la qualité des fleurs des plants de *P. tuberosa* L.

L'acide humique a montré son effet sur la germination et la croissance des plants cultivés de *P. tuberosa* L. mais aucun effet n'a été enregistré sur la floraison. Les bulbes traités par l'acide humique et sous les conditions expérimentales ont montré une végétation importante traduite par le nombre important de feuilles mais sans floraison. Ces résultats sont paradoxaux à ceux prouvés par Ahsan et *al.* [106], où l'application de l'acide humique à 8% par plant a montré un effet significatif sur la croissance et la floraison des plants cultivés de *P. tuberosa* L. au Pakistan. On peut donc déduire que le surplus d'acide humique par plant peut engendrer un effet inhibiteur sur la croissance et la floraison chez *Polianthes tuberosa* L. puisque la culture de l'oignon (*Allium cepa* L.), sous l'application d'acide humique à 20%, a augmenté la hauteur de la plante et le nombre de feuilles [105]. Aussi Peña-Méndez et *al.* [128] ont mentionné l'effet stimulant d'acide humique car il renferme un constituant 'sodium humate' responsable de la croissance des feuilles. L'acide humique augmente l'absorption de l'azote contenu dans le sol [105], en plus des propriétés physico-chimiques du sol traité par l'acide humique déjà cités dans le Tableau 2.1, qui confirme cette tendance.

2. Caractérisation phytochimique des parties des plants cultivés

2.1. Criblage phytochimique

Le test phytochimique des bulbes, des feuilles et des fleurs des plants cultivés de *Polianthes tuberosa* L. (Tableau 3.1) a mis en évidence la présence des saponines, des terpénoïdes, des glycosides, des flavonoïdes et des tanins, Rammamurthy et al. [17] a aussi rapporté que les feuilles de *Polianthes tuberosa* L. contiennent des flavonoïdes glycosides. Les bulbes, les feuilles et les fleurs renferment du mucilage mais pas les phlobotanins, autrement aux bulbes. Il a été reporté que les bulbes de *Polianthes tuberosa* L. contiennent plusieurs sapogénines stéroïdiens [5,19], qui explique peu être la présence des saponines au niveau des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa*.

Tableau 3.1 : Criblage phytochimique des bulbes, des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa*

Constituants	bulbes	feuilles	fleurs
Glycosides	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+
Phlobotanins	+	-	-
Saponines	+	+	+
Tanins	+	+	+
Terpénoïdes	+	+	+
Mucilage	+	+	+

* + présence, - absence

2.2. Etude phytochimique des différentes parties de *P. tuberosa* L. cultivée témoin

2.2.1. Alcaloïdes totaux des bulbes et bulbilles de *P. tuberosa* L.

Le rendement en alcaloïdes des bulbes et des bulbilles de *P. tuberosa* est exprimé en mg/100 g de matière fraîche, les valeurs sont présentées dans le Tableau 3.2. Il ressort que les bulbes et les bulbilles issus des plants cultivés de *P. tuberosa* sont pauvres en alcaloïdes, et le rendement entre les bulbes et les bulbilles est similaire (0.035% et 0.055% respectivement). En effet, il est important de signaler qu'aucun travail sur les alcaloïdes de la plante étudiée n'a été rapporté par la bibliographie. Le rendement en alcaloïdes au niveau des bulbes de *Polianthes*

tuberosa L. était inférieur à celui des bulbes de *Rhodophiala mendocina* (0.26%), de *Habranthus jamesonii* (0.27%), de *Zephyranthes filifolia* (0.21%), et de *Habranthus jamesonii* (0.25%), cependant, il est inférieur de celui de *Rhodophiala mendocina* (0.38%) [129].

Tableau 3.2 : Rendement et aspect des extraits d'alcaloïde des bulbes et des bulbilles de *P. tuberosa*.

	Bulbes	Bulbilles
Rendement (g/100g MF)	0.035±0.005	0.055±0.006
Aspect d'extraits	Pate pale collante	Pate pale collante

Les valeurs représentent le moyen±standard de déviation (n=3)

2.2.2. Teneur en eau des bulbes de *P. tuberosa* L.

La teneur en eau (H%) et de la matière sèche (MS%) des bulbilles et des bulbes de *P. tuberosa* sont représentées dans l'histogramme ci-dessous (Figure 3.16). Il est évident que les bulbes et les bulbilles sont quasi totalement constitués d'eau, taux atteint les 70% (71.55±3.65%, 72.66±2.04 % respectivement). Par conséquent une faible teneur en matière sèche estimait de 27.33±2.04 % et 28.44±3.65% pour les bulbilles et les bulbes respectivement, avec une simple différence entre les deux types.

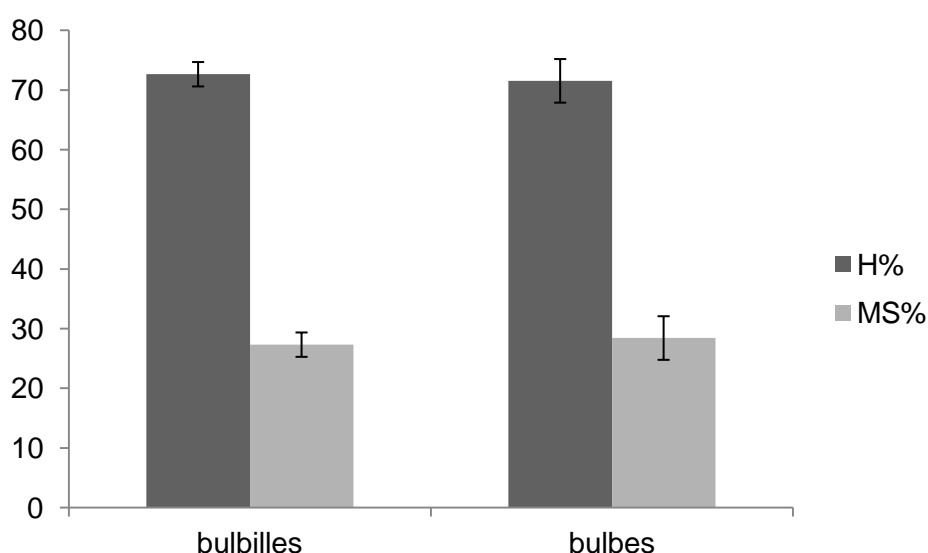


Figure 3.16 : Teneur en eau (H%) et en matière sèche (MS%) des bulbilles et des bulbes de *P. tuberosa*.

2.2.3 Rendement en concrète et en absolu des fleurs de *P. tuberosa* L.

La concrète est une pâte jaune odorante de la tubéreuse, alors que l'absolu est une pâte pale odorante de cette plante. Le rendement final obtenu de la concrète des fleurs sèches de *Polianthes tuberosa* L. cultivée dans des conditions biologiques témoin, est de $5.1\% \pm 0.6$, et celui de l'absolu est de $0.807\% \pm 0.237$ (Tableau 3.3). Nos résultats s'avèrent supérieurs à ceux obtenus par Nidiry et Babu [9] à partir des fleurs fraîches (concrète 0.1% et l'absolu 0.05%) extraits par l'hexane. Rakthaworn et al. [10] trouvent dans leur travail que l'enfleurage à chaud et à froid a donné un rendement supérieurs à notre 0.3137%, 6.5808%, qui est dû à la fragilité des fleurs de la tubéreuse et le faible taux d'huile stocké dans les vacuoles, donc l'enfleurage permis la continuation de vie des fleurs, par conséquent la production de l'huile poursuivra et la quantité d'huile augmente. Les auteurs trouvent des rendements inférieurs à nos, en utilisant l'hexane et l'éther de pétrole pour l'extraction de l'absolu 0.0279%, 0.0192% respectivement. Comparant notre méthode d'extraction à d'autres techniques, la macération par solvant à température ambiante a augmenté le rendement en concrète par rapport au Soxhlet par hexane 0.35 ± 0.19 % [12], par contre l'usage de l'éther de pétrole a augmenté le rendement en concrète 11.36 ± 9.94 %, aussi bien la technique de CO₂-supercritique à haute température et pression a montré le rendement de concrète des fleurs sèches de la tubéreuse variété *Calcutta single* (40°C, 100 bar/60°C, 200 bar/80°C, 300 bar) de $0.93 \pm 0.85\%$, $1.43 \pm 1.33\%$ et $12.61 \pm 10.77\%$ respectivement [12]. L'augmentation du rendement d'absolu et de la concrète de *P. tuberosa* L. peut être expliquée par la composition du sol, particulièrement la teneur en phosphore, élément responsable de la biosynthèse d'acétyl-CoA, précurseurs de la synthèse de l'acide mévalonique et l'isoprène, structure de base des terpènes [127].

Tableau 3.3 : Rendement de la concrète et de l'absolu des fleurs de *P. tuberosa*.

Extrait	Rendement (% MS)
Concrète	5.08 ± 0.81
Absolu	0.81 ± 0.24

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=2).

2.2.4. Analyse chromatographique de l'absolu des fleurs sèches de *Polianthes tuberosa* L.

L'analyse chromatographique de l'absolu a été évaluée par CG-MS (spectre en appendice B). Les résultats de séparation des constituants, leurs pourcentages de présence ainsi leurs temps de rétention sont présentés dans le Tableau 3.4. L'analyse chromatographique a permis l'identification de quatorze composants. Les constituants majeurs de l'absolu des fleurs sèches de *Polianthes tuberosa* L. sont isoeugénol (21.89%), limonène (19.78%), méthyle anthranilate (13.80%) et l'eugénol (13.67%) respectivement. Plusieurs travaux ont pu séparer et identifier les constituants d'huile essentielle de *Polianthes tuberosa* L., dont le benzyle benzoate est le constituant majeur identifié dans la majorité des cas, et selon différentes méthodes (méthode de headspace et extraction par solvant) [10,11]. Ghosh et al. [12] par la méthode de CO₂ supercritique pour l'extraction de l'absolu de fleurs sèches de la tubéreuse ont identifié la présence du styrène, l'eugénol et le méthyleugénol. En outre, par l'usage de soxhlet pendant 8h, en utilisant l'hexane et l'éther de pétrole comme solvants d'extraction, le trans-carveol et le cis-3-méthylcyclopentanol s'avèrent les composants majeurs de l'absolu de la tubéreuse. Ces données ne concordent pas avec nos résultats et qui peuvent être liés aux plusieurs facteurs tels que; l'effet de l'humidité de la plante, vu que les fleurs sont utilisées à l'état sec dans notre travail. De nombreux facteurs peuvent expliquer cette variabilité, comme les conditions climatiques, saisonnières et géographiques, la période de récolte, la maturité végétale, l'existence de différences chimotypiques et la méthode d'extraction [13].

Tableau 3.4 : Constituants identifiés de l'absolu de *Polianthes tuberosa* L. par CG-SM.

N° des pics	Temps de rétention (min)	Constituants identifiés ^a	Composition en %
1	3.739	Methyl ester acide benzoique	7.63
2	4.417	methyle Salicylate	1.03
3	4.871	indole	0.24
4	5.613	methyle Anthranilate	13.80
5	10.119	Benzyl salicylate	2.90
6	12.130	D-limonène	19.78
7	18.365	2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol	4.41
8	18.654	p-menthan-3-one	2.85
9	18.873	1,4 diméthyle benzène	5.70
10	22.330	pulegone	2.62
11	23.254	p-menth-4(8)-en-3-one	2.40
12	35.409	Farnesène	1.08
13	41.527	eugénol	13.67
14	42.677	isoeugénol	21.89

^a : constituants identifiés sur les bases de données NIST 11, NIST spectres de mass, Wiley 11, et en comparant avec la littérature.

2.3. Polyphénols des plants de *P. tuberosa* L. cultivés sans et sous traitements

2.3.1. Analyse quantitative des polyphénols

2.3.1.1 Rendement en extraits bruts des parties des plants cultivées témoins

Les rendements sont exprimés en pourcentage par rapport au poids initial (matière sèche), les résultats obtenus (Tableau 3.5) ont montré que les fleurs de *P. tuberosa* L. cultivées témoins sont beaucoup plus riches en extraits bruts que les feuilles et les bulbes. Le rendement d'extrait des fleurs ($30.84 \pm 2.22\%$) était de trois fois plus important que celui des bulbes ($9.63 \pm 0.63\%$), et proche de celui des feuilles ($26.9 \pm 0.45\%$).

Tableau 3.5: Rendement des extraits bruts au niveau des bulbes, feuilles et fleurs de *Polianthes tuberosa* L. cultivés témoin

Extraits	Rendement (%)	Aspect de l'extrait
Bulbes	9.63±0.63	Pâte collante jaune pale, sans odeur caractéristique
Feuilles	26.99±0.45	Pâte collante, brune foncé, odeur caramélisé ou datte
Fleurs	30.84±2.22	Pâte collante, orangé, odeur caramélisé caractéristique de la tubéreuse

Chaque valeur représente la moyenne±SD (n=3).

a. Rendement en extraits des fractions des feuilles de *P. tuberosa* L.

L'extraction et le fractionnement des polyphénols des feuilles de *P. tuberosa* L. a montré que, le rendement de fraction de dichlorométhane (24.64±0.45%) était supérieur à celui de la phase aqueuse et la fraction d'hexane (0.75±0.04% et 0.53±0.05% respectivement) (Tableau 3.6). Donc on peut déduire que les polyphénols des feuilles de *P. tuberosa* sont de nature peu polaire du faite que la majorité sont dissouts dans le dichlorométhane.

Tableau 3.6: Rendement en extraits des fractions des feuilles de *P. tuberosa* L.

Extrait	Rendement (%)
Fraction de dichlorométhane	24.94±0.45
Phase aqueuse	0.75±0.04
Fraction d'hexane	0.53±0.05

Chaque valeur représente la moyenne±SD (SD=3).

2.3.1.2. Rendement en extraits bruts de *Polianthes tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants

Les rendements des extraits des feuilles, des bulbes et des fleurs de chacun des biostimulants ainsi le témoin ont été présentés dans le Tableau 3.7. Les résultats ont révélé un rendement important en extraits bruts pour les fleurs et les feuilles par rapport aux bulbes. Cependant, les plants cultivés sous l'effet d'acide humique ont montré un rendement important pour les feuilles (23.97±0.16%) et les bulbes (4.92±0.08%). Le marc de café a montré un rendement de 33.48% pour les fleurs, 21.82±0.05% pour les feuilles et 5.62±0.002% pour les bulbes. Les rendements

des extraits bruts des fleurs, des feuilles et des bulbes traités par les grignons d'olive étaient de 27.92 %, $20.11 \pm 0.34\%$ et $7.12 \pm 0.02\%$ respectivement. Il est important de souligner que tous les traitements testés ont montré un meilleur rendement en extrait brut que chez les témoins (rendement en extrait brut des fleurs, des feuilles et des bulbes estimé de 22.42%, $19.92 \pm 0.03\%$ et $4.69 \pm 0.05\%$ respectivement). En revanche, l'hydrolat des plumes a montré des rendements en extraits bruts de 10.94%, $16.57 \pm 0.07\%$ et $4.35 \pm 0.06\%$ pour les fleurs, les feuilles et les bulbes respectivement. Ces derniers restent inférieurs à ceux des témoins. Dans ce sens, l'application de marc de café s'avère le meilleur biostimulant du rendement en extrait brut, chez toutes les parties des plants cultivés de la tubéreuse.

Tableau 3.7 : Rendement en pourcentage des extraits bruts des feuilles, des bulbes et des fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants.

Traitements	Rendement en (%)		
	Feuilles	Bulbes	Fleure
Marc de café	21.82 ± 0.05	5.62 ± 0.002	33.48
Grignons d'olive	20.11 ± 0.34	7.12 ± 0.02	27.92
Acide humique	23.97 ± 0.16	4.92 ± 0.08	---
Hydrolat des plumes	16.57 ± 0.07	4.35 ± 0.06	10.94
Témoin	19.92 ± 0.03	4.69 ± 0.05	22.42

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

*une seule répétition a été faite, par manque de matériel végétal

2.3.1.3. Dosage des polyphénols, des flavonoïdes et les tanins condensés de *P. tuberosa* L.

a. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu, les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g d'extrait (courbe d'étalonnage de l'acide gallique Appendice B) et qui sont représentés dans le Tableau ci-dessous.

Les résultats de dosage des polyphénols chez la tubéreuse cultivée témoin présentés dans le Tableau 3.8 ont montré que l'extrait hydrométhanolique des fleurs était plus riche en polyphénols (32.421 ± 0.007 mg EAG/g E), suivi par celui des feuilles (29.740 ± 0.005 mg EAG/g E) et enfin celui des bulbes (12.943 ± 0.011

mg EAG/g E) à faible teneur en polyphénols. Les feuilles et les fleurs sont considérées comme une source des polyphénols chez la tubéreuse.

Tableau 3.8 : Teneur en polyphénols des extraits des bulbes, des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa* L. cultivés témoin en équivalent acide gallique.

Extrait brut	Concentration en polyphénols (mg EAG/g E)
Feuilles	29.740±0.005
Bulbes	12.943±0.011
Fleurs	32.421±0.007

Les valeurs représentent la moyenne ±SD (SD=3).

La teneur en polyphénols de chaque fraction de l'extrait brut des feuilles de *Polianthes tuberosa* L. cultivée témoin est présentée dans le Tableau 3.9. En effet, la phase aqueuse est la plus riche fraction en polyphénols (29.95±0.0075 mg EAG/g E), suivie par la fraction de dichlorométhane (29.38±0.021mg EAG/g E) et nous avons trouvé que la fraction d'hexane était pauvre en polyphénols (16.32±0.028 mg EAG/g E) par rapport aux autres fractions. D'après ces données, les solvants polaires donnent une teneur importante en polyphénols par rapport aux solvants apolaires (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Teneur en polyphénols des extraits des fractions des feuilles de *P. tuberosa* L. cultivés témoin

Fraction d'extrait brut des feuilles	Concentration en polyphénols (mg EAG/g E)
Fraction de dichlorométhane	29.38±0.02
Fraction d'hexane	16.32±0.03
Phase aqueuse	29.95±0.008

Les valeurs représentent la moyenne ±SD (SD=3).

La teneur en polyphénols des différentes parties des plants cultivés de *Polianthes tuberosa* L (bulbes, feuilles et fleurs) sous l'effet des biostimulants (Tableau 3.10) ont montré que les fleurs sont toujours riches en polyphénols, suivies par les feuilles et les bulbes. L'application des biostimulants a augmenté la teneur en polyphénols au niveau de toutes les parties des plants. L'hydrolat des plumes a nettement augmenté la teneur en polyphénols chez les fleurs (94.62±0.04 mg EAG/g E), suivi par les témoins (93.16±0.02 mg EAG/g E), le marc de café

(68.34±0.08 mg EAG/g E) et le grignons d'olive (56.46±0.03 mg EAG/g E). Pour les feuilles, la teneur en polyphénols est approximativement similaire selon tous les biostimulants (27-28-29-30 mg EAG/g E). La même tendance pour la teneur en polyphénols au niveau des bulbes (11-12-13 mg EAG/g E) a été enregistrée (Tableau 3.10). Par ailleurs, l'application de l'hydrolat des plumes a augmenté la teneur en polyphénols au niveau des fleurs, tandis que le marc de café a stimulé la production des polyphénols dans toutes les parties de la plante étudiée (Tableau 3.10).

Tableau 3.10: Teneur en polyphénols des extraits des organes de *P. tuberosa* L. cultivés sous l'effet des biostimulants en équivalent acide gallique

Extrait	Concentration en polyphénols (mg EAG/g E)		
	feuilles	bulbes	fleurs
Marc de café	29.69±0.01	13.30±0.05	68.34±0.08
Grignons d'olive	30.17±0.01	12.69±0.02	56.46±0.03
Acide humique	27.21±0.01	13.67±0.03	--
Hydrolat des plumes	28.89±0.01	11.48±0.02	94.62±0.04
Témoin	28.78±0.01	13.77±0.058	93.16±0.02

Les valeurs représentent la moyenne ±SD (SD=3).

b. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été évalué par le trichlorure d'aluminium, et les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par g d'extrait (courbe d'étalonnage de la quercétine Appendice B).

La teneur en flavonoïdes dans les différentes parties de la tubéreuse cultivée témoin est présentée dans le Tableau 3.11. La teneur est plus importante en flavonoïdes au niveau des fleurs (4,137±0.017 mg EQ/g E) comparées aux bulbes (0,466±0,012 mg EAG/g E) et aux feuilles (0.384±0.028 mg EAG/g E). Les fleurs sont donc la partie recommandée pour l'extraction des flavonoïdes (Tableau 3.11).

Tableau 3.11 : Teneur en flavonoïdes des extraits bruts des bulbes, des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa* L. en équivalent quercétine.

Extrait brut	Concentration en flavonoïdes (mg EQ/g E)
Feuilles	0.384±0.028
Bulbes	0.466±0.012
Fleurs	4.137±0.017

Les valeurs représentent la moyenne±SD (SD=3).

Les teneurs en flavonoïdes des fractions de l'extrait brut des feuilles de *Polianthes tuberosa* L cultivée témoin sont présentées dans le Tableau 3.12. Il ressort que la phase aqueuse et la fraction d'hexane sont respectivement plus riches en flavonoïdes (1.043±0.005 mg EQ/g E et 0.609±0.016 mg EQ/g E) que la fraction de dichlorométhane, qui s'avérait pauvre en flavonoïdes de 0.449±0.043 mg EQ/g E.

Tableau 3.12 : Teneur en flavonoïdes des fractions de l'extrait brut des feuilles de *P. tuberosa* L. en équivalent quercétine.

Fraction de l'extrait brut des feuilles	Concentration en flavonoïdes (mg EQ/g E)
Fraction de dichlorométhane	0.449±0.043
Fraction d'hexane	0.609±0.016
Phase aqueuse	1.043±0.005

Les valeurs représentent la moyenne±SD (SD=3).

La teneur en flavonoïdes des parties de la tubéreuse cultivée sous l'effet des biostimulants est présentée dans le Tableau 3.13. Les fleurs et les feuilles sont assez riches en flavonoïdes que les bulbes, qui s'avèrent pauvres en ceux-ci. L'application des biostimulants a influencé la concentration en flavonoïdes, notamment chez les plantes cultivées dans le marc de café (3.69±0.06 mg EQ/g E), suivies par les plants cultivés dans les grignons d'olive (3.12±0.06 mg EQ/g E) et ceux traités par l'hydrolat des plumes (3.06±0.11mg EQ/g E), où les teneurs étaient supérieures à celles des témoins (1.24±0.05 mg EQ/g E). La même chose a été trouvée chez les feuilles des plants cultivés dans le marc de café (2.77±0.01 mg EQ/g E), où la teneur était supérieure à celle enregistrée pour les autres traitements, suivies par les feuilles issus des plants traités par les grignons d'olive (1.91±0.01mg EQ/g E), les feuilles des plants témoins (1.19±0.02 mg EQ/g E), les

feuilles des plants traités par l'acide humique (1.04 ± 0.01 mg EQ/g E) et celles traitées par l'hydrolat des plumes (0.170 ± 0.001 mg EQ/g E), à faible teneur en flavonoïdes. En ce qui concerne les bulbes, tous les traitements ont montré une faible teneur en flavonoïdes, comprise entre 0.1-0.3 mg EQ/g E. L'application de marc de café et de l'acide humique a augmenté la teneur en flavonoïdes chez les bulbes comparés aux plants des témoins.

En conclusion, l'application de marc de café a augmenté la teneur en flavonoïdes de l'ensemble des parties de la tubéreuse cultivée (Tableau 3.13).

Tableau 3.13 : Teneur en flavonoïdes des extraits bruts des bulbes, des feuilles et des fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants en équivalent quercétine.

Traitements	Concentration en flavonoïdes (mg EQ/g E)		
	feuilles	bulbes	fleurs
Marc de café	2.77 ± 0.01	0.26 ± 0.03	3.69 ± 0.06
Grignons d'olive	1.91 ± 0.01	0.17 ± 0.03	3.12 ± 0.06
Acide humique	1.04 ± 0.01	0.32 ± 0.03	--
Hydrolat des plumes	0.170 ± 0.001	0.21 ± 0.01	3.06 ± 0.11
Témoin	1.19 ± 0.02	0.21 ± 0.03	1.24 ± 0.05

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (SD=3).

c. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été évalué par le test de vanilline, et la catéchine était utilisée comme référence. Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par g d'extrait.

La teneur en tanins condensés de différentes parties de la tubéreuse cultivée témoin est présentée dans le Tableau 3.14. Les fleurs s'avèrent la partie la plus riche en tanins condensés ($1,917 \pm 0,006$ mg EC/g E), suivi par les bulbes ($1,25 \pm 0,003$ mg EC/g E) et les feuilles ($0,655 \pm 0,0085$ mg EC/g E). Par conséquent, les fleurs sont la partie recommandée pour l'extraction des tanins.

Tableau 3.14: Teneur en tanins condensés des extraits des fleurs, des feuilles et des bulbes de *P. tuberosa* L. en équivalent catéchine

Extrait brut	Concentration en tanins condensés (mg EC/g E)
Feuilles	0.655±0.009
Bulbes	1.250±0.003
Fleurs	1.917±0.006

Les valeurs représentent la moyenne±SD (SD=3).

Les résultats de dosage des tanins condensés des fractions de l'extrait brut des feuilles de la tubéreuse sont présentés dans le Tableau 3.15. En effet, la phase aqueuse et l'extrait d'hexane sont riches en tanins condensés (8,226±0,0088 mg EC/g E et 3,821±0,004 mg EC/g E respectivement), suivi par la fraction de dichlorométhane 0,821±0,0089 mg EC/g E. La même constatation a été enregistrée pour le dosage des flavonoïdes.

Tableau 3.15 : Teneur en tanins condensés des extraits des fractions des feuilles de *P. tuberosa* L. en équivalent catéchine

Fraction de l'extrait brut des feuilles	Concentration en tanins condensés (mg EC/g E)
Fraction de dichlorométhane	0.821±0.009
Fraction d'hexane	3.821±0.004
Phase aqueuse	8.226±0.009

Les valeurs représentent la moyenne±SD (SD=3).

La teneur en tanins condensés au niveau des différentes parties de la tubéreuse cultivée sous l'effet des biostimulants, est présentée dans le Tableau 3.16. Les fleurs contiennent une teneur importante en tanins condensés selon tous les types des biostimulants utilisés. L'application d'hydrolat des plumes a montré une augmentation de la teneur en tanins condensés (5.488±0.002 mg EC/g E) comparés aux autres traitements, suivi par le marc de café (3.964±0.018 mg EC/g E) et les grignons d'olive (3.964±0.011 mg EC/g E), qui est inférieure à celle des plants témoins (4.488±0.007 mg EC/g E). Le marc de café a augmenté la teneur en tanins condensés chez les feuilles (1.180±0.003 mg EC/g E) comparés aux autres traitements, suivis par l'hydrolat des plumes (1.059±0.005 mg EC/g E). Les

grignons d'olive et l'acide humique ont également proliféré la teneur en tanins (0.82 ± 0.008 mg EC/g E et 0.89 ± 0.001 mg EC/g E respectivement), mais il restait inférieur à celles enregistrées pour le marc de café et l'hydrolat des plumes, et supérieure à celle enregistrée pour les plants de témoin (0.392 ± 0.008 mg EC/g E). En conclusion, la stimulation des tanins condensés est favorisée par l'hydrolat des plumes chez les fleurs, et le marc de café au niveau de toutes les parties de la plante.

Tableau 3.16 : Teneur en tanins condensés des extraits des parties des plants cultivés de *P. tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants.

Traitements	Concentration en tanins condensés (mg EC/g E)		
	feuilles	bulbes	fleurs
Marc de café	1.180 ± 0.003	1.797 ± 0.016	3.964 ± 0.018
Grignons d'olive	0.820 ± 0.008	0.131 ± 0.011	3.964 ± 0.011
Acide humique	0.890 ± 0.001	0.535 ± 0.010	--
Hydrolat des plumes	1.059 ± 0.005	0.202 ± 0.008	5.488 ± 0.002
Témoin	0.392 ± 0.008	0.202 ± 0.002	4.489 ± 0.007

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (SD=3).

2.3.2 Analyse qualitative des extraits des polyphénols de *Polianthes tuberosa* L.

L'analyse qualitative par HPLC-DAD des extraits hydrométhanoliques des fleurs, des feuilles et des bulbes de *P. tuberosa* cultivée témoin sont représentés par le chromatogramme de Figures 3.17. Il ressort que l'extrait hydrométhanolique des feuilles et les fleurs de *Polianthes tuberosa* L. renferment plusieurs types des polyphénols. Les mêmes constituants ont été identifiés des deux extraits, tels que l'acide ascorbique, l'acide gallique, la rutine, l'acide caféique, l'acide syringique, la vanilline et l'acide salicylique, qui ont été identifiés selon leurs temps de rétention (Appendice B). Alors qu'au niveau d'extrait des bulbes de *P. tuberosa* L. la présence de l'acide ascorbique, la rutine, l'acide caféique et l'acide salicylique ont été mis en évidence. Les constituants communs identifiés au niveau des feuilles, des fleurs et des bulbes de *P. tuberosa* L. étaient : l'acide ascorbique, la rutine, l'acide caféique et l'acide salicylique. Il ressort que l'extrait des fleurs de *P. tuberosa* L. était plus riche en polyphénols que l'extrait des feuilles et des bulbes.

Ceci se concorde avec le dosage quantitatif des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés.

L'analyse par l'HPLC-DAD des fractions de l'extrait brut des feuilles de *P. tuberosa* (Figure 3.18-20) a montré qu'au niveau de la fraction de dichlorométhane; l'acide gallique, la rutine, l'acide caféique, l'acide syringique, la vanilline et l'acide salicylique ont été identifiés. La phase aqueuse a permis l'identification de l'acide ascorbique seul, alors que pour la fraction d'hexane aucun standard n'a été déterminé. Nous avons remarqué que, l'extrait brut des feuilles de la tubéreuse possède presque la même composition que celui de la fraction de dichlorométhane.

Les résultats de l'analyse qualitative des polyphénols se concordent avec ceux du dosage quantitatif par le Folin-Ciocalteu pour les différentes fractions.

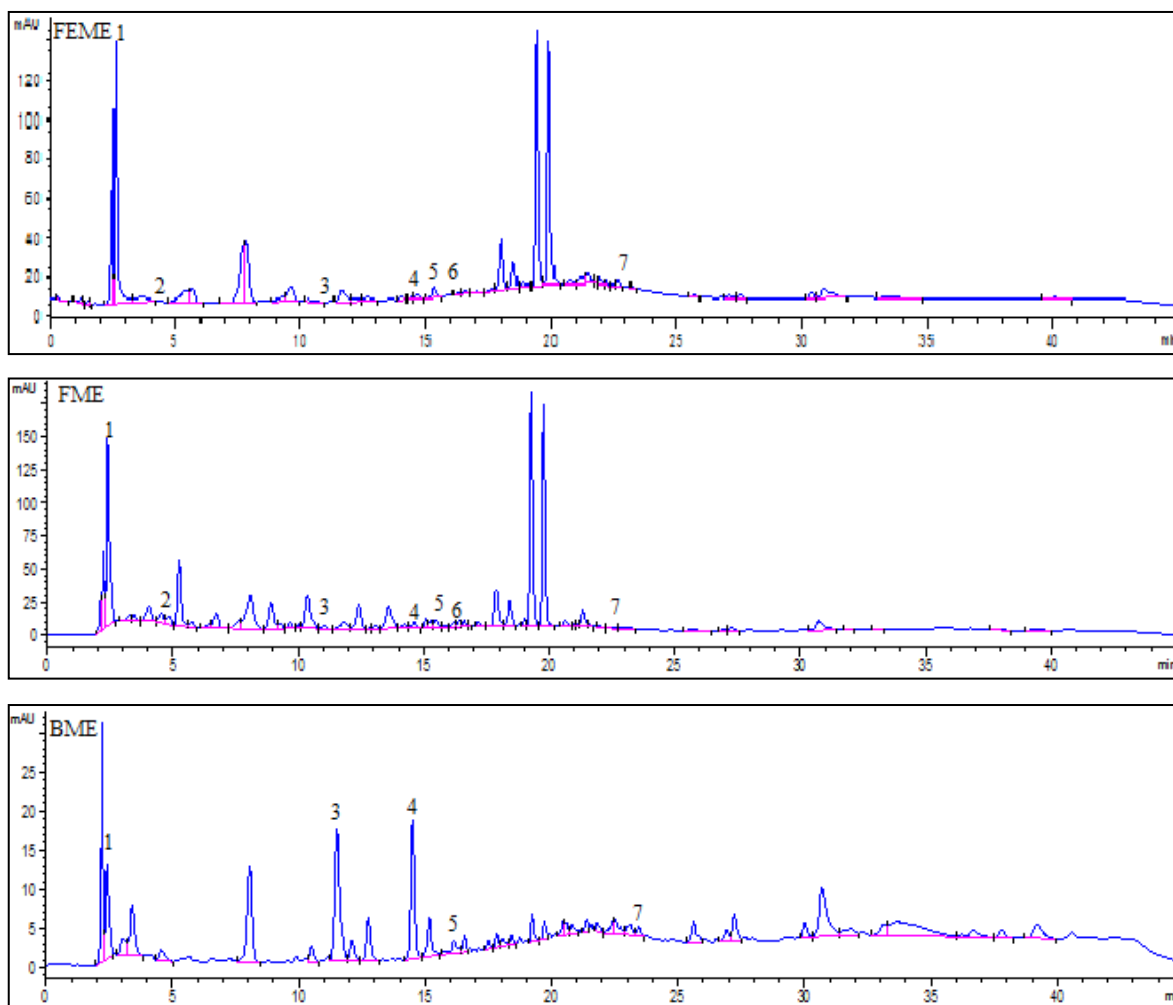


Figure 3.17 : Chromatogramme HPLC-DAD d'extrait hydrométhanolique des feuilles (FEME), des fleurs (FME) et les bulbes (BME).

1 : acide ascorbique, 2 : acide gallique, 3 : rutine, 4 : acide caféique, 5 : acide syringique, 6 : vanilline, 7 : acide salicylique.

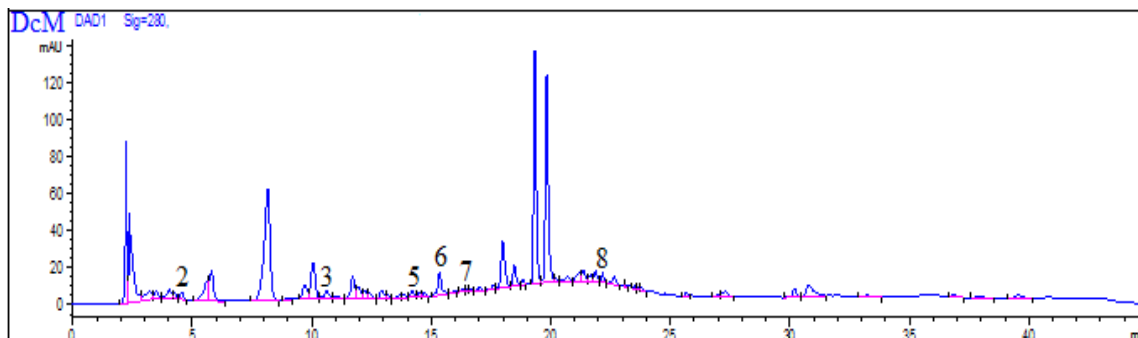


Figure 3.18 : Chromatogramme HPLC-DAD de fraction de dichlorométhane de l'extrait hydrométhanolique des feuilles.

2 : acide gallique, 3 : rutine, 5 : acide caféique, 6 : acide syringique, 7 : vanilline, 8 : acide salicylique.

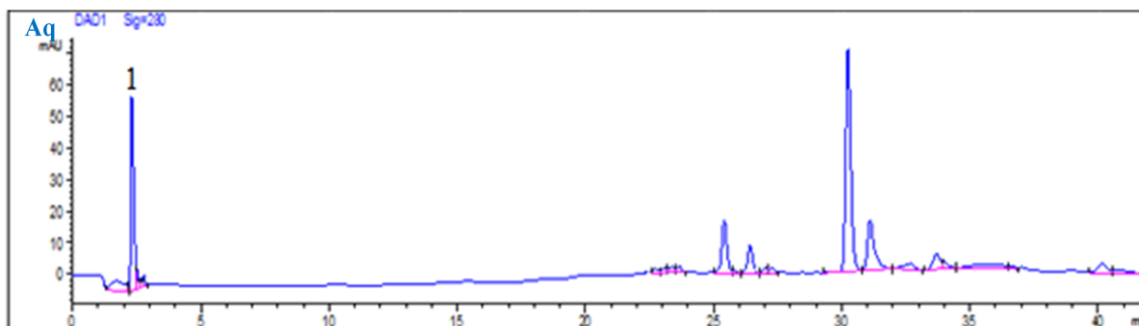


Figure 3.19 : Chromatogramme HPLC-DAD de la phase aqueuse d'extrait des feuilles de *P. tuberosa* L.

1: acide ascorbique.

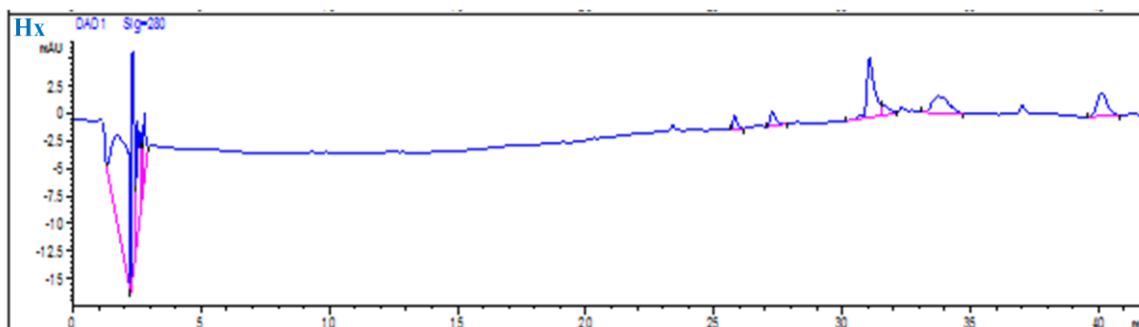
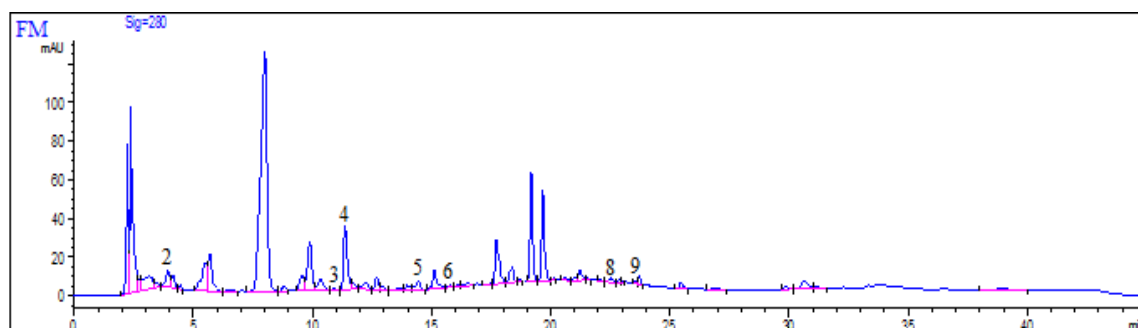


Figure 3.20 : Chromatogramme HPLC-DAD de la fraction d'hexane des feuilles de *P. tuberosa* L.

L'analyse chromatographique des feuilles (Figure 3.21) et des bulbes (Figure 3.22) de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants a révélé que ces derniers sont riches en polyphénols. Selon les chromatogrammes et d'une façon générale, il existe certains phénols en communs entre les feuilles et les bulbes,

c'est le cas de la rutine, l'acide caféique (mis à part les bulbes cultivés sous l'effet d'acide humique), l'acide salicylique et la quercétine (mis à part les feuilles des plants cultivés sous l'effet d'acide humique). Toutefois, l'application des bio-traitements a stimulé la biosynthèse de l'acide gallique chez les plants traités de *P. tuberosa* L., mais il existe une variabilité entre les bulbes et les feuilles selon le type de biostimulant appliqué.

Les feuilles des plants traités par le marc de café renfermaient l'acide gallique, la catéchine et l'acide syringique, comparés aux feuilles des témoins, dont une inhibition de la synthèse de l'acide ascorbique et la vanilline chez celles-là a été enregistrée. Concernant les extraits des bulbes, la présence de l'acide gallique chez les bulbes traités par rapport au témoin a été enregistrée. Pour les plants traités par l'hydrolat des plumes, la présence de l'acide syringique au niveau des feuilles et l'inhibition de la production de l'acide ascorbique et l'acide gallique au niveau des bulbes comparés aux plants témoins ont été enregistrés. Les grignons d'olive ont inhibé la synthèse de l'acide ascorbique au niveau des feuilles et des bulbes comparés aux témoins, mais il a stimulé la synthèse de l'acide gallique uniquement au niveau des feuilles par rapport au témoin. L'application de l'acide humique a également provoqué la biosynthèse de l'acide gallique au niveau des feuilles et des bulbes des plants traités, toutefois, il a inhibé la biosynthèse de la quercétine, la vanilline au niveau des feuilles et l'acide caféique au niveau des bulbes des plants traités comparés aux témoins. Ces résultats restent toujours préliminaires puisque certains constituants n'ont pas pu être identifiés par manque des étalons.



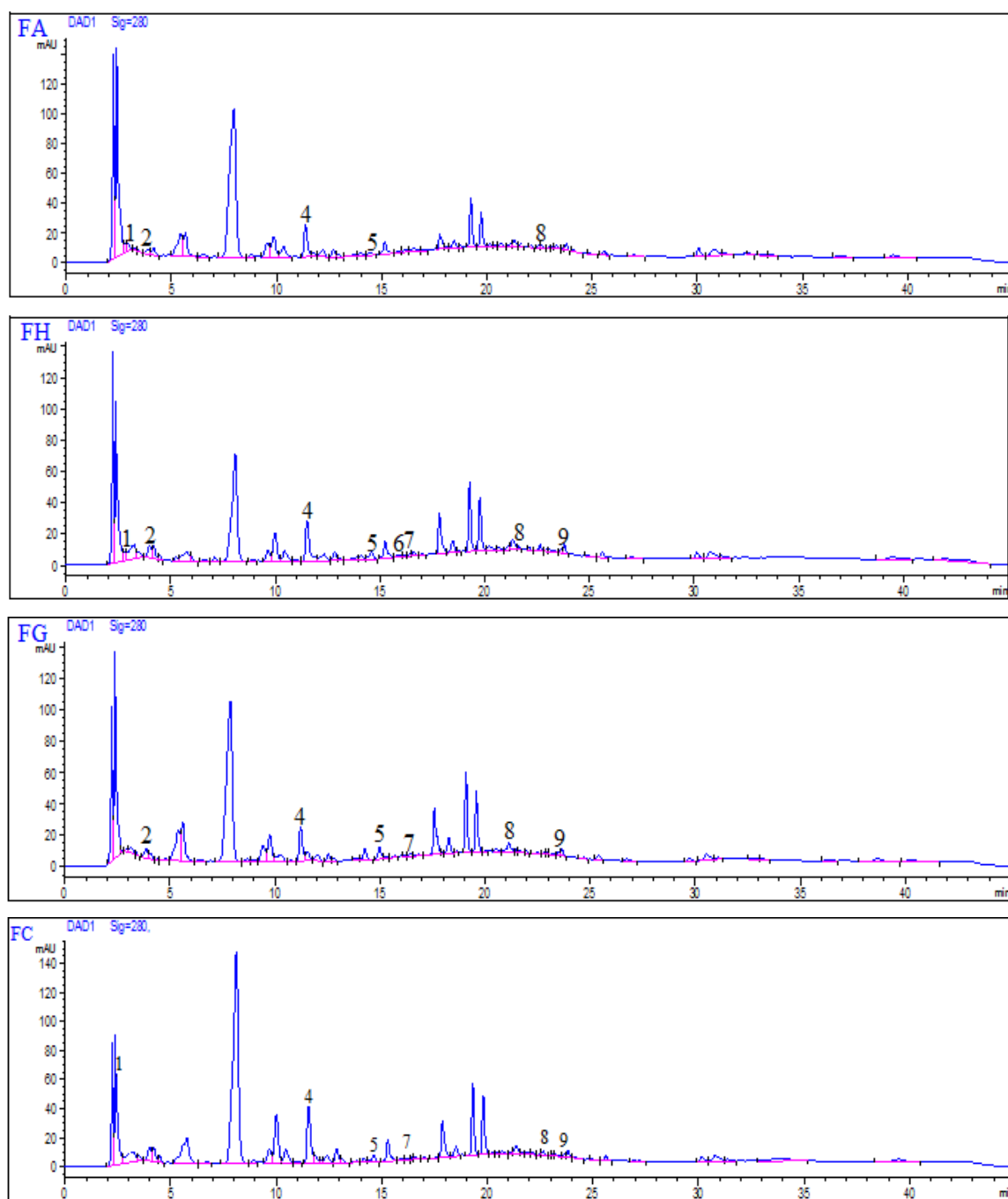


Figure 3.21 : Chromatogrammes d'HPLC-DAD des extraits des feuilles des plants de *Polianthes tuberosa* L. traités par les biostimulants.

Le marc de café (FM), dans les grignons d'olive (FG), dans l'hydrolat des plumes (FH), le témoin (FC) et dans l'acide humique (FA). 1 : acide ascorbique, 2 : acide gallique, 3 : catéchine, 4 : rutine, 5 : acide caféique, 6 : acide syringique, 7 : vanilline, 8 : acide salicylique, 9 : quercétine.

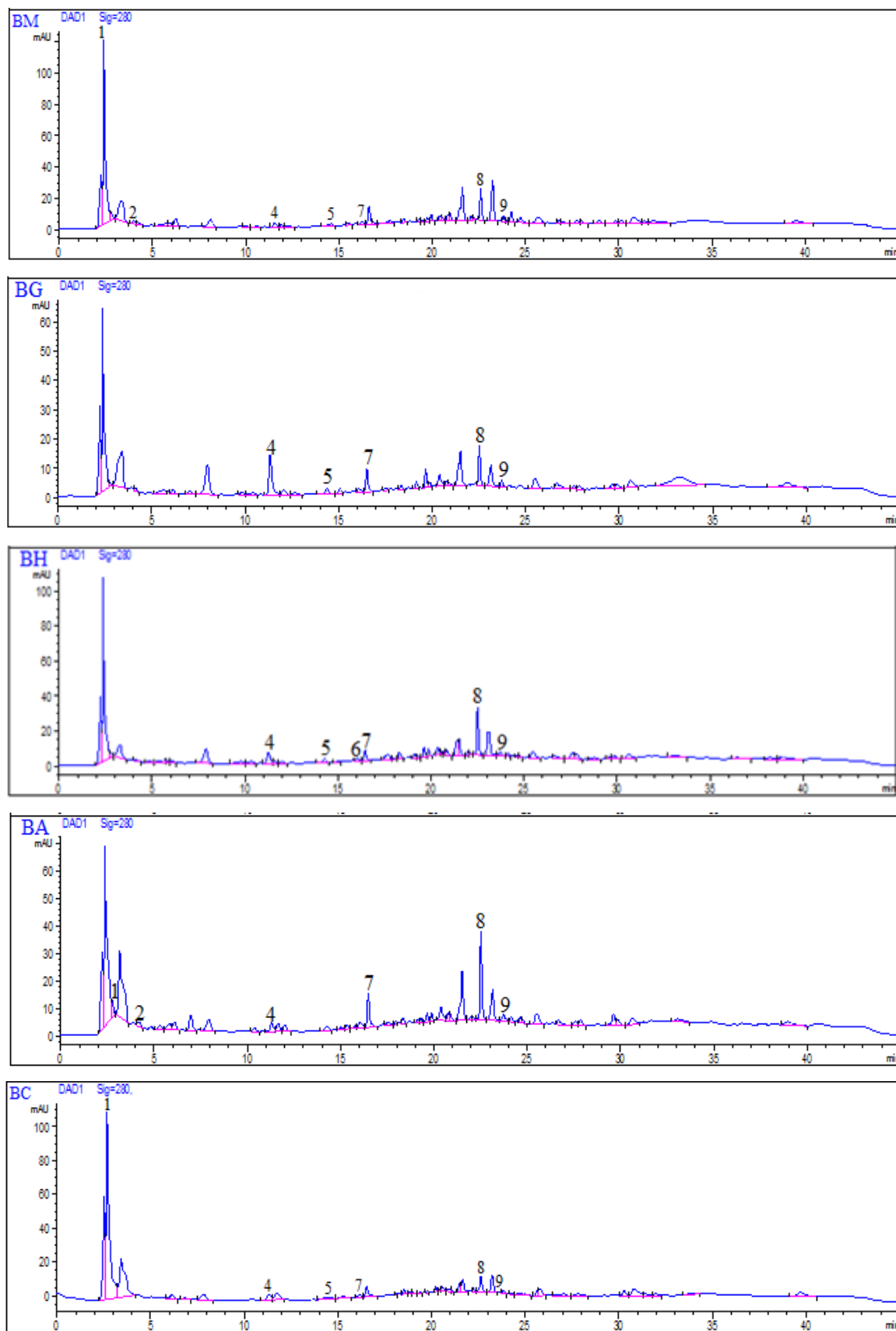


Figure 3.22 : Chromatogrammes d'HPLC-DAD des extraits des bulbes des plants de *Polianthes tuberosa* L. cultivés sous l'effet des biostimulants.

Le marc de café (BM), et le témoin (BC), dans l'acide humique (BA), dans les grignons d'olive (BG) et dans l'hydrolat des plumes (BH). 1 : acide ascorbique, 2 : acide gallique, 3 : catéchine, 4 : rutine, 5 : acide caféique, 6 : acide syringique, 7 : vanilline, 8 : acide salicylique, 9 : quercétine.

II. DISCUSSION

Cette étude a confirmé que les fleurs sont plus riches en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés, Nos résultats concordent avec ceux de Maiti *et al.* [11], où la teneur en polyphénols était plus élevée pour l'extrait méthanolique des fleurs (0.180 ± 0.020 mg EAG/mg MF), puis l'extrait éthanolique (0.140 ± 0.020 mg EAG/mg MF), l'extrait de dichlorométhane (0.110 ± 0.050 mg EAG/mg MF), extrait aqueux (0.094 ± 0.010 mg EAG/mg MF), l'extrait d'éthyle acétate (0.007 ± 0.010 mg EAG/mg MF) et l'extrait d'hexane (0.004 ± 0.002 mg EAG/mg MF) à faible teneur en polyphénols. Ces auteurs ont montré donc que les solvants les plus polaires permettent l'obtention des teneurs plus élevées en polyphénols, qui est liée à la nature polaire de ces composés et qui est confirmé par nos résultats. Une similarité a été enregistrée concernant nos résultats pour les bulbes, à ceux qui ont été rapportées par Rumi *et al.* [130], où l'extrait méthanolique des bulbes de la tubéreuse est plus riche en polyphénols de 113.49 ± 1.13 mg EAG/mg MS, suivi par la fraction d'exane 86.23 ± 0.96 mg EAG/mg MS, la fraction de chloroforme 58.18 ± 1.07 mg EAG/mg MS. Cette différence en teneur en polyphénols entre les organes, peut être expliquée par le fait que les fleurs sont la partie aérienne la plus exposée aux facteurs abiotiques, particulièrement les rayons UV, dont elles stimulent l'enzyme PAL de la biosynthèse des polyphénols [131].

Selon l'étude sur les biostimulants, l'application de marc de café et l'hydrolat des plumes a stimulé la biosynthèse des polyphénols aussi bien quantitativement que qualitativement. Gurav *et al.* [103] ont affirmé que la fertilité du sol lors d'un amendement en déchets organiques affecte la composition chimique des plantes cultivées, qui est justifié par l'augmentation en teneur des polyphénols, dont ces auteurs ont révélé que l'arrosage par l'hydrolat des plumes a augmenté la teneur en polyphénols et en flavonoïdes pour les bananiers. De même Colla *et al.* [123] ont rapporté que l'application d'hydrolat des protéines ça va stimuler l'activité enzymatique de phénylalanine ammonia lyase PAL, qui rentre dans le processus

de synthèse des phénylpropanoïdes lors de la biosynthèse des flavonoïdes. Concernant l'application du marc de café, Cruz et *al.* [104] ont démontré une corrélation directe entre l'application de marc de café et la concentration en polyphénols et flavonoïdes chez la laitue qui confirme nos résultats pour la tubéreuse.

Par ailleurs, concernant les analyses qualitatives des extraits de la tubéreuse. Rammamurthy et *al.* [17] ont isolé : 9,10 dehydrohecogénine-3-O-glucose-xylose-galactoside, kaempférol-3-O-xyloside, α -D-glucoside et les polianthosides B et C à partir des feuilles de *P. tuberosa*. Rokbeni et *al.* [132] dans leur travail sur d'autres plants d'Amaryllidacée, ils ont identifié la quercétine hexoside, l'isorhamnetine hexoside, la kaempférol pentoside-hexoside, l'acide ferulique et l'acide caféique dans les feuilles de *Pancratium maritimum*. Ces résultats sont en concordance avec nos où l'acide caféique a été aussi identifié chez les feuilles de *P. tuberosa*. Très peu de travaux sur l'analyse par HPLC-DAD des extraits phénoliques des organes de *P. tuberosa* L. ont été reportés. Selon Nikolova et Gevrenova [133] sur quatre d'autre plants d'Amaryllidacée : *Sternbergia colchiciflora* W. K., *Galanthus nivalis* L., *Galantus elwesii* A. K., *Leucojum aestivum* L., et *Pancratium maritimum* L. Les profils d'HPLC ont montré que les feuilles et les bulbes des plants contiennent l'acide férulique et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Par ailleurs, les bulbes de *Pancratium maritimum* contiennent l'acide syringique. Tous ces données confirment et supportent nos résultats pour la tubéreuse.

3. Activité antioxydante

3.1. Test de DPPH

3.1.1. Test de DPPH des alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa* L. témoin

L'activité antioxydante des alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa* s'avère faible (Figure 3.23), et elle est d'une manière dose dépendante. D'après nos résultats, les bulbilles ont un effet antiradicalaire légèrement supérieur à celui de l'effet des bulbes. A une concentration de 0.297 mg/mL, une inhibition de 63% a été enregistrée pour les bulbes et 67% d'inhibition de DPPH pour les bulbilles. L'activité antioxydante de chaque extrait est déterminée par la concentration minimale inhibitrice de 50% de DPPH dans le milieu réactionnel l'IC₅₀. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.24.

Les IC₅₀ des extraits des alcaloïdes des bulbes et des bulbilles sont similaires (0.23 mg/mL) et inférieures à celle de l'acide ascorbique (0.019 mg/mL) utilisé comme antioxydant de référence (différence significative p>0.05). Les extraits des alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa* présentaient une activité antioxydante modérée, qui peut être due à la présence de la lycorine [5] douée d'une activité antioxydante reportée en littérature [134,135]. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Adewusi et Steenkamp [136], qui ont affirmé que 0.125 mg/mL est la concentration majeure des extraits d'acétate d'éthyle des bulbes de *Crinum bulbispermum* et *Scadoxus puniceus* (plantes d'Amaryllidacée) possède une activité inférieure à 50% d'inhibition de DPPH. D'après l'étude de Castilhos et al. [137], l'effet antioxydant de montanine (alcaloïde de type d'Amaryllidacée) est faible (36%) à une concentration de 3.5 mg/mL, qui est aussi faible que celui des extraits des bulbes de *P. tuberosa* L. Selon Orhan et al. [138], 2 mg/mL d'extrait d'acétate d'éthyle des bulbes de *Sternbergia candida*, *Sternbergia lutea subsp. lutea* et *Sternbergia lutea subsp. sicula* ont présenté un effet antiradicalaire plus faible (moins de 13% d'inhibition) que celui des extraits des bulbes de *P. tuberosa*. D'une manière générale, les alcaloïdes des bulbes d'Amaryllidacée ont montré un faible effet, mais les alcaloïdes des bulbes de *P. tuberosa* possèdent un effet inhibiteur fort contre le DPPH et même à faible concentration.

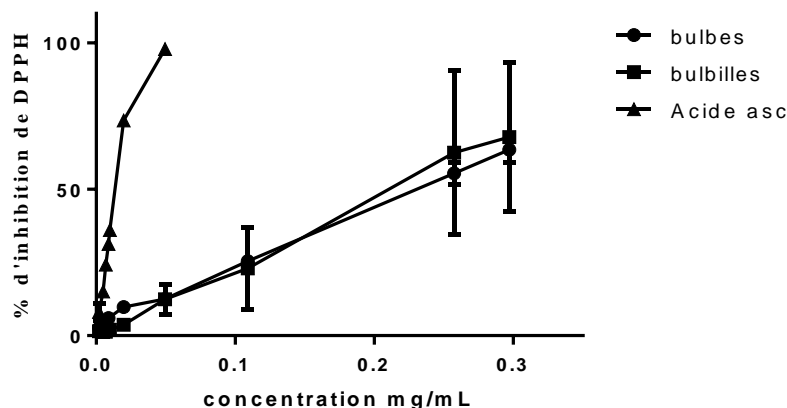


Figure 3.23 : Test de DPPH des alcaloïdes de bulbes, bulbilles de *P. tuberosa* et de l'acide ascorbique.

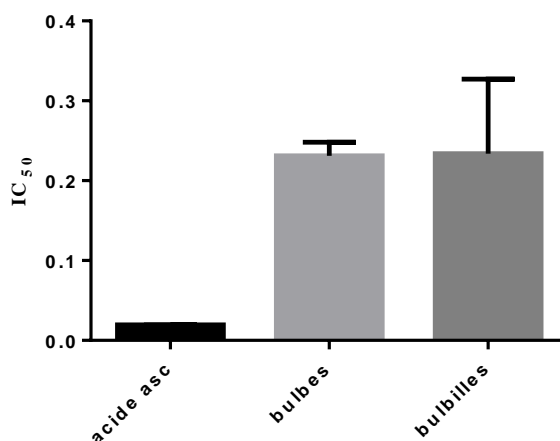


Figure 3.24 : Les IC₅₀ des alcaloïdes de bulbes, bulbilles de *P. tuberosa* L. et de l'acide ascorbique.

3.1.2. Test de DPPH des polyphénols de *P. tuberosa* L. témoin

L'activité anti-radicalaire de l'extrait brut des fleurs de *Polianthes tuberosa* L. est plus puissante contre le DPPH par un taux d'inhibition de 95% à une concentration de 1.96 mg/mL (Figures 3.25), comparé à celui de BHT 92% à une concentration de 0.2 mg/mL, suivi par l'extrait brut des bulbes et des feuilles avec un taux d'inhibition de 91% et 87% respectivement, à une concentration maximale 2 mg/mL. L'activité antioxydante de chaque extrait est déterminée par la concentration minimale inhibitrice de 50% (IC₅₀) de DPPH dans le milieu réactionnel (Figure 3.26). L'extrait des fleurs possède un puissant effet anti-radicalaire (IC₅₀= 0.06±0.01 mg/mL), dont la différence avec le BHT (IC₅₀=

0.009±0.001 mg/mL) est non significative ($p>0.05$), suivi par les feuilles ($IC_{50}=0.29\pm0.01$ mg/mL) et les bulbes ($IC_{50}=0.39\pm0.03$ mg/mL) qui ont un faible effet anti-radicalaire, dont la différence avec le BHT était hautement significative ($p<0.05$). Les fleurs sont la partie recommandée comme agent antiradicalaire.

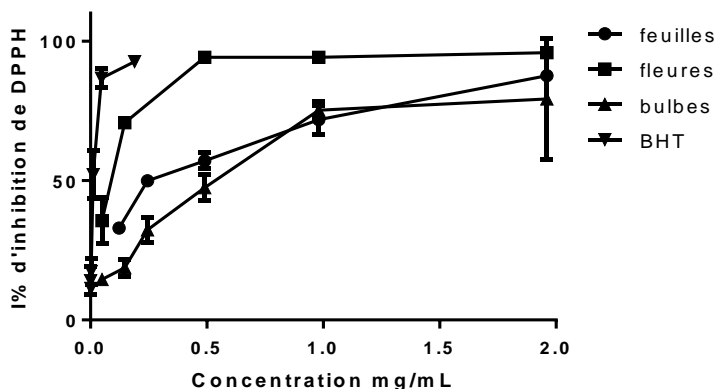


Figure 3.25: Inhibition de DPPH par les polyphénols extraits des feuilles, des fleurs et des bulbes de *P. tuberosa* L. et le BHT.

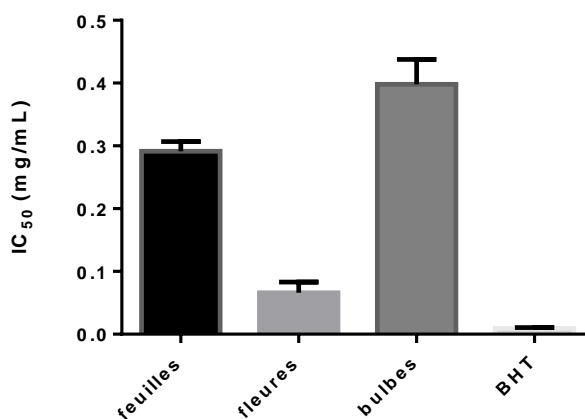


Figure 3.26 : Les IC_{50} des extraits bruts des feuilles, des bulbes et des fleurs de *P. tuberosa* et le BHT.

L'inhibition de DPPH par les fractions de l'extrait brut des feuilles a révélé que, la fraction de dichlorométhane a un effet anti-radicalaire important ($IC_{50}=0.23\pm0.03$ mg/mL). La différence est non significative comparée à l'acide ascorbique ($p>0.05$) ($IC_{50}=0.0125\pm0.0001$ mg/mL), suivie par la phase aqueuse ($IC_{50}=0.52\pm0.01$ mg/mL) et enfin, la fraction d'hexane à faible effet antioxydant ($IC_{50}=2.708\pm0.379$ mg/mL) où la différence est hautement significative comparée avec l'acide

ascorbique ($p < 0.05$) (Figure 3.27-28). Donc, les polyphénols extraits par le dichlorométhane ont l'air efficace comme antiradicalaire.

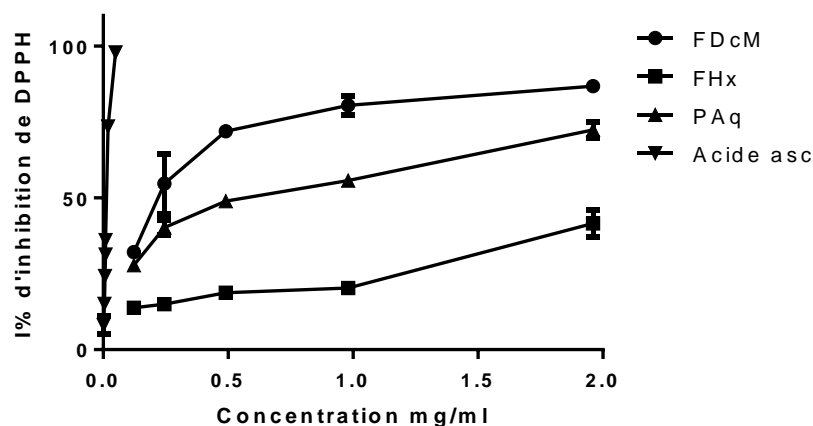


Figure 3.27 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par les fractions d'extraits brut des feuilles de *P. tuberosa* et l'acide ascorbique.

FDcM : fraction de dichlorométhane, FHx : fraction d'hexane, PAq : la phase aqueuse.

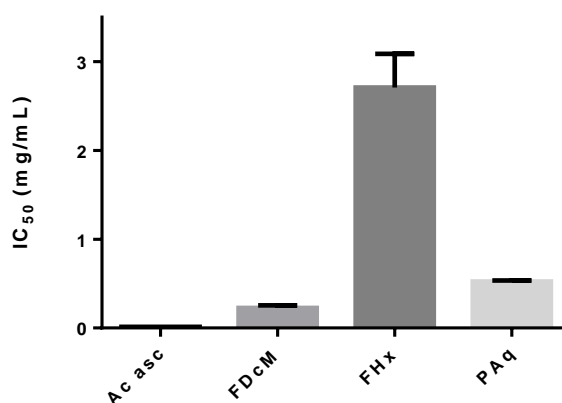


Figure 3.28 : Les IC₅₀ de DPPH par les fractions de l'extrait des feuilles de *P. tuberosa* L. et l'acide ascorbique

FDcM : fraction de dichlorométhane, FHx : fraction d'hexane, PAq : la phase aqueuse.

3.1.3. Test de DPPH des polyphénols de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants

La cinétique de l'inhibition du DPPH ainsi que les IC₅₀ des extraits des différentes parties de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants sont présentées dans les Figures 3.29, 3.30.

L'effet anti-radicalaire des feuilles de *P. tuberosa* L. cultivée dans les biostimulants est faible (Figure 3.29a). La différence était hautement significative ($p < 0.05$) comparée avec l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0.012 \pm 0.0001$ mg/mL). L'effet anti-radicalaire des feuilles de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet d'acide humique est mieux que les autres extraits ($IC_{50} = 0.1525 \pm 0.0007$ mg/mL) (Figure 3.30a), suivi par l'extrait des feuilles des plants cultivés sous l'effet du marc de café ($IC_{50} = 0.158 \pm 0.006$ mg/mL), les extraits des feuilles des plants témoins, ceux cultivés sous l'effet des grignons d'olives ($IC_{50} = 0.17 \pm 0.001$ mg/mL et 0.17 ± 0.02 mg/mL respectivement) et d'hydrolat des plumes ($IC_{50} = 0.19 \pm 0.01$ mg/mL). L'application des biostimulants a augmenté le pouvoir anti-radicalaire des feuilles de *P. tuberosa* L. comparé à celles des plants témoins.

L'effet scavenger des extraits des bulbes de *P. tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants s'avère moyen pour certains traitements, et faible pour d'autres (Figure 3.29b), la différence était non significative entre l'acide ascorbique et l'extrait des bulbes des plants traités par le marc de café ($p > 0.05$), mais elle est hautement significative pour les autres extraits ($p < 0.05$). L'extrait des bulbes des plants traités par le marc de café a un effet anti-radicalaire plus intéressant ($IC_{50} = 0.346 \pm 0.022$ mg/mL) (Figure 3.30b), par degré moindre par l'extrait des bulbes des plants cultivés sous l'effet des grignons d'olive ($IC_{50} = 0.47 \pm 0.009$ mg/mL), l'extrait des bulbes des plants témoins ($IC_{50} = 0.77 \pm 0.020$ mg/mL), et ceux traités par l'hydrolat des plumes et l'acide humique ($IC_{50} = 0.91 \pm 0.06$ mg/mL et $IC_{50} = 0.96 \pm 0.15$ mg/mL respectivement). Cependant, sauf l'effet du marc de café qui a montré un pouvoir anti-radicalaire similaire à celui de l'extrait des bulbes de *P. tuberosa* L. cultivés témoin.

Par ailleurs, les différents extraits des fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants n'ont pas révélé un effet anti-radicalaire contre le DPPH. La différence comparée avec le BHT était hautement significative ($p < 0.05$) (Figure 3.29c), l'extrait des fleurs traités par l'hydrolat des plumes ($IC_{50} = 0,13 \pm 0.013$ mg/mL) a présenté une activité anti-radicalaire plus importante que les autres extraits (Figure 3.30c), suivi par l'extrait des fleurs traités par le marc de café ($IC_{50} = 0.15 \pm 0.01$ mg/mL), celui des plants témoins ($IC_{50} = 0.17 \pm 0.014$ mg/mL) et celui des plants traités par les grignons d'olive ($IC_{50} = 0.19 \pm 0.006$ mg/mL). Par

contre, l'application des biostimulants a diminué le pouvoir antioxydant chez les fleurs comparés aux bulbes et feuilles des plants cultivées de *P. tuberosa* L.

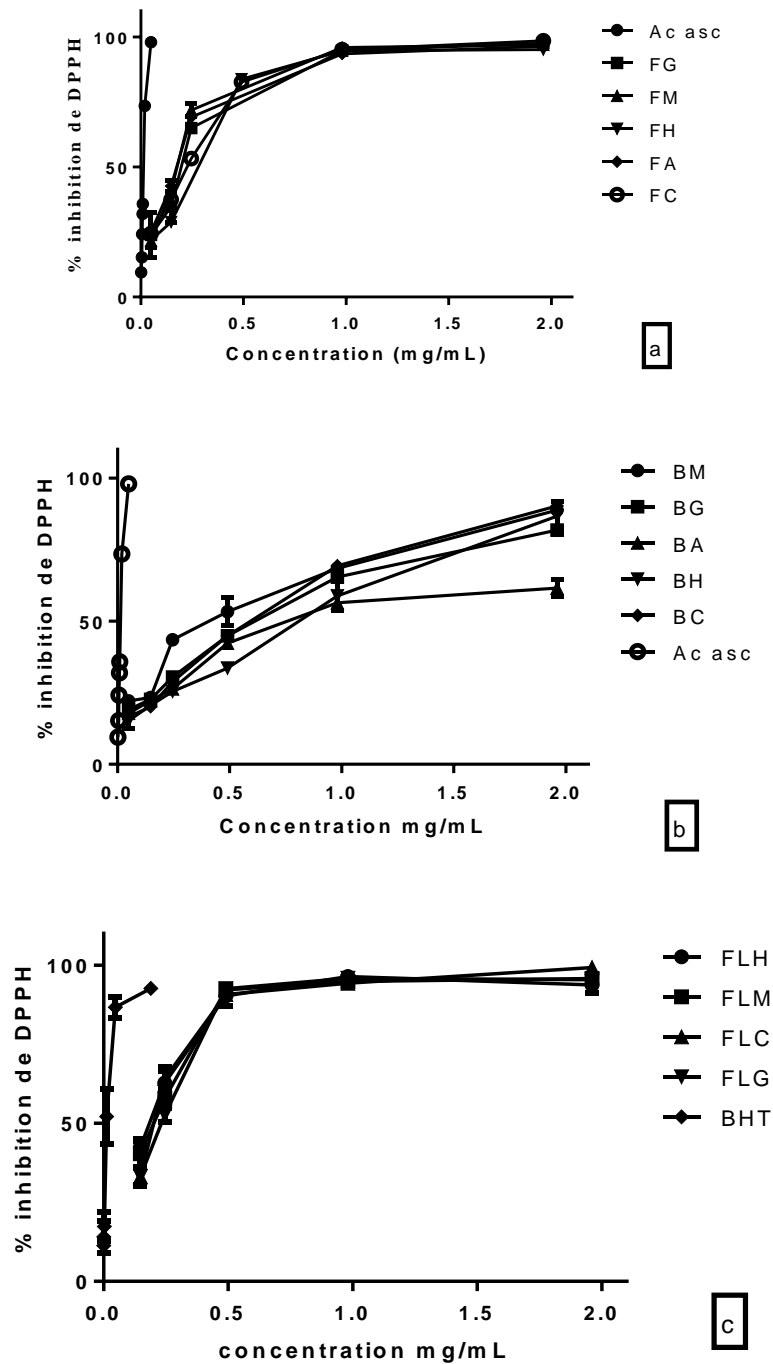


Figure 3.29: Test de DPPH des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'acide ascorbique.

FG/BG/FLG : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM/FLM : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH/FLH : feuilles, bulbes et

fleurs des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BG : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC/FLC : feuilles des plants de témoin.

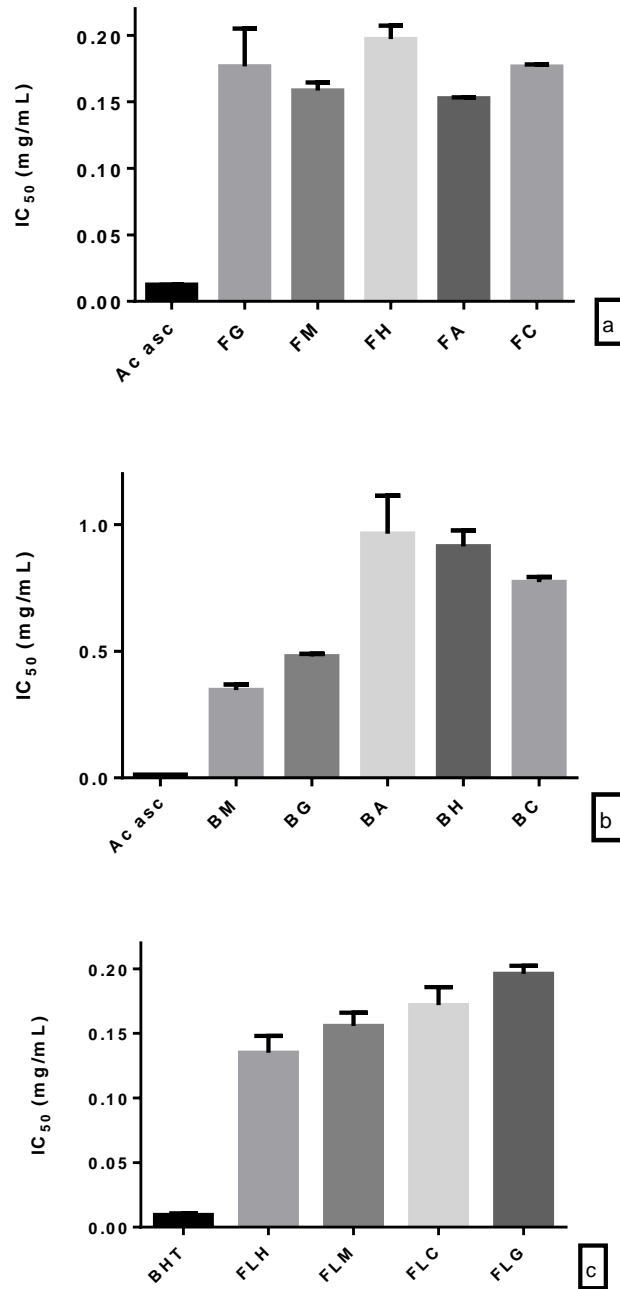


Figure 3.30 : Les IC_{50} du test de DPPH des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'acide ascorbique.

FG/BG/FLG : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM/FLM : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH/FLH : feuilles, bulbes et fleurs des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BG : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC/FLC : feuilles des plants de témoin.

3.2. Test de β -carotène

3.2.1. Test de β -carotène des polyphénols de *P. tuberosa* L. cultivée témoin

Le pouvoir protecteur contre le blanchissement de β -carotène par les extraits des polyphénols des feuilles, des bulbes et des fleurs de *Polianthes tuberosa* L. sont présentés dans la Figure 3.31. L'extrait des fleurs de *P. tuberosa* L. a montré un effet contre le blanchissement de β -carotène traduit par une diminution approximative à celle de BHT, suivi par l'extrait des bulbes qui représente une prévention contre le blanchissement de β -carotène plus ou moins stable. Cependant, l'extrait des feuilles a montré un faible effet protecteur contre le blanchissement de β -carotène. Le pourcentage d'inhibition après 48h d'incubation, a montré que l'extrait des fleurs possède un effet protecteur contre l'oxydation de β -carotène ($82.20 \pm 6,15$ %), où la différence avec le BHT ($100 \pm 0,3\%$) n'est pas significative ($p > 0,05$), suivi par l'extrait des bulbes de ($67.06 \pm 9.60\%$) et celui des feuilles (41 ± 6.19 %), où la différence avec de BHT est hautement significative ($p < 0,05$) (Figure 3.32).

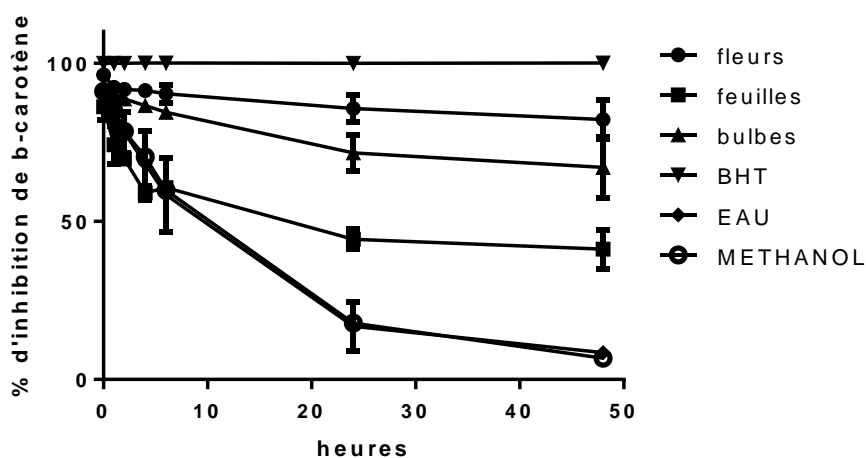


Figure 3.31 : Cinétique des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par l'extrait de fleurs, des feuilles et des bulbes de *P. tuberosa* L. BHT: témoin positif, eau, méthanol : contrôles négatifs

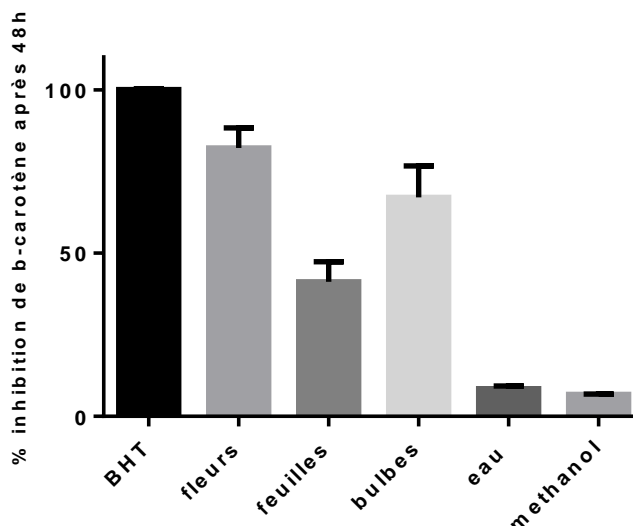


Figure 3.32 : Inhibition du blanchissement de β -carotène après 48 heures par les extraits de fleurs, des feuilles et des bulbes de *Polianthes tuberosa* L. cultivée témoin, BHT, l'eau et le méthanol.

L'inhibition de l'oxydation du β -carotène par les fractions de l'extrait brut des feuilles de *P. tuberosa* L. présentés dans la Figure 3.33, ont montré une diminution du chromophore de β -carotène en fonction du temps jusqu'à un seuil stable, jusqu'à 48h pour tous les extraits, ainsi que les contrôles (BHT, eau, méthanol), à l'exception de l'extrait de dichlorométhane, où son effet a diminué après 24h. Le pourcentage d'inhibition de blanchissement de β -carotène après 48h d'incubation, indique que la phase aqueuse ($37 \pm 2.3\%$), la fraction d'hexane ($31 \pm 3.15\%$) et la fraction de dichlorométhane ($29 \pm 4.8\%$) ont un faible effet protecteur, mais il était en général mieux que celui de méthanol ($15 \pm 0.98\%$) et l'eau de ($14 \pm 1.69\%$) (Figure 3.34). L'effet protecteur pour toutes les fractions était moins que le BHT et la différence était hautement significatif ($p < 0.05$). Ces résultats concordent ceux enregistrés pour le test de DPPH.

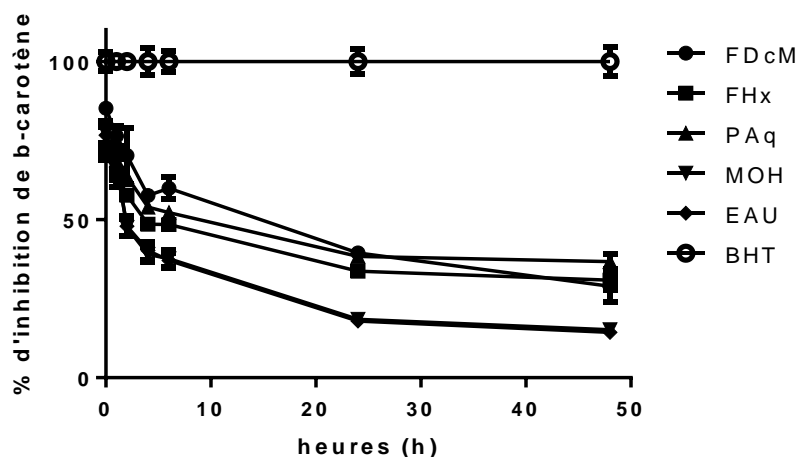


Figure 3.33 : Cinétique des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par l'extrait de fraction des feuilles de *P. tuberosa* L. cultivée témoin.

FHx : fraction d'hexane, FDcM : fraction de dichlorométhane, PAq : phase aqueuse. BHT: contrôle positif, eau, méthanol : contrôles négatifs

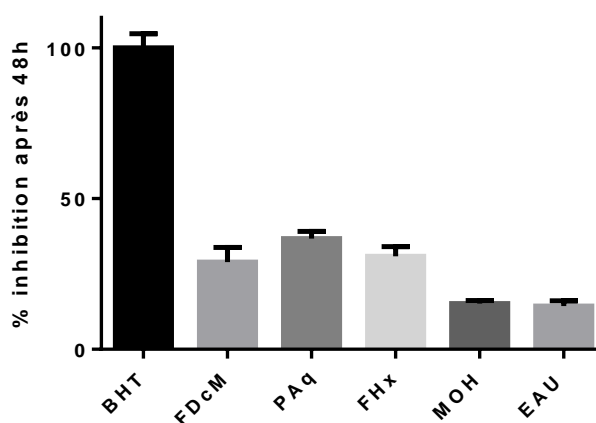


Figure 3.34 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène après 48 h par l'extrait de fraction des feuilles de *P. tuberosa* L.

FHx : fraction d'hexane, FDcM : fraction de dichlorométhane, PAq : phase aqueuse. BHT: contrôle positif, eau, méthanol : contrôles négatifs

3.2.2. Test de β -carotène des polyphénols de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants

Les résultats de test de β -carotène des extraits de feuilles et de bulbes de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants durant et après 48 heures sont présentés dans les Figures 3.35 et 3.36. L'effet protecteur contre le blanchissement de β -carotène par les extraits de feuilles de *P. tuberosa* s'avère important, selon la cinétique des extraits des feuilles (Figure 3.35a) qui a montré

une diminution durant les 24 heures, mais, une augmentation du pourcentage d'inhibition du blanchissement de β -carotène après le 24 heures jusqu'à 48 heures, et ceci pour tous les extraits de feuilles des plants traités par les biostimulants. L'extrait de feuilles des plants traitées par les grignons d'olive était le puissant protecteur contre le blanchissement de β -carotène ($96.57 \pm 0.05\%$), suivi par l'extrait des feuilles des plants témoins ($92.02 \pm 2.62\%$), celui des plants traités par le marc de café de ($90.95 \pm 2.24\%$), par l'acide humique ($83.98 \pm 9.09\%$) et par l'hydrolat des plumes ($74.25 \pm 17.45\%$) respectivement. Tous les extraits des feuilles de *P. tuberosa* L. cultivées sous l'effet des biostimulants ont un effet puissant contre le blanchissement de β -carotène, où la différence de ceux-ci n'était pas significative comparée au BHT (100% d'inhibition de blanchissement de β -carotène). Cependant, une différence significative a été enregistrée entre l'extrait des feuilles des plants traités par l'hydrolat des plumes et le BHT ($p=0.1$) (Figure 3.36a). Presque la même tendance a été enregistrée pour le test de DPPH, où l'extrait des feuilles des plants traités par l'hydrolat des plumes a montré le faible pouvoir antioxydant. L'application des biostimulants a donc amélioré l'effet protecteur contre le blanchissement de β -carotène comparé aux feuilles des plants cultivées sans biostimulants.

La cinétique d'inhibition de blanchissement de β -carotène par les extraits des bulbes de *P. tuberosa* L. sous l'effet des biostimulants était décroissante jusqu'à 24 heures d'incubation (Figure 3.35b), mais, une stabilité de la réaction a été enregistrée après 24 heures pour tous les extraits. Le pouvoir protecteur des extraits après 48 heures a montré que, l'extrait des bulbes des plants traités par les grignons d'olive possède le meilleur pouvoir protecteur contre le blanchissement de β -carotène ($82.6 \pm 3.75\%$), comparé à celui de BHT (100%) (Différence non significative $p < 0.05$), suivi par l'extrait des bulbes des plants témoins ($69.9 \pm 4.66\%$), celui des plants traités par le marc de café ($52.1 \pm 5.87\%$), par l'hydrolat des plumes ($49.3 \pm 9.06\%$) et par d'acide humique ($44.4 \pm 5.92\%$) respectivement, dont la différence avec le BHT était hautement significative ($p > 0.05$) (Figure 3.36b). L'effet protecteur contre le blanchissement de β -carotène a été amélioré en quelque sort par l'application de grignons d'olive. Mais cet effet était mieux chez les feuilles que chez les bulbes des plants cultivés sous l'effet des biostimulants.

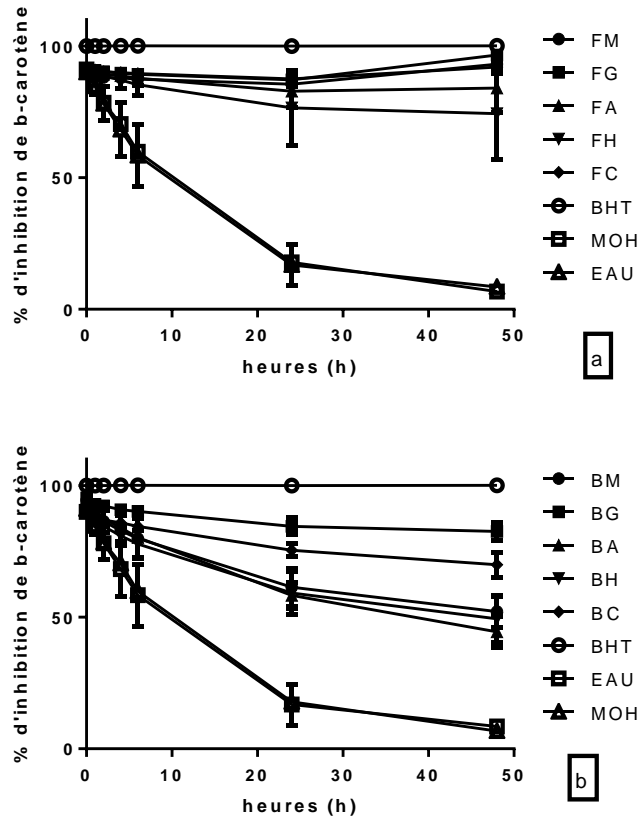
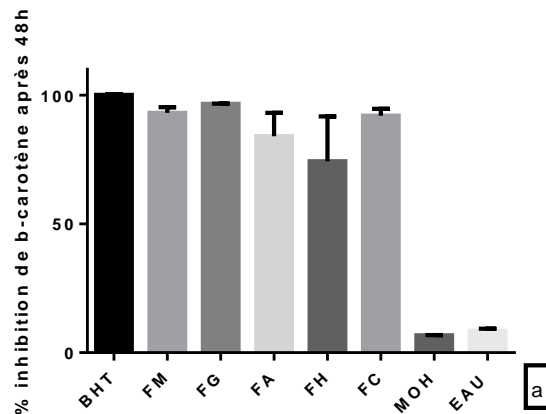


Figure 3.35 : Cinétique des pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β -carotène par les extraits des feuilles (a) et des bulbes (b) de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants, BHT: contrôle positif, eau, méthanol : contrôles négatifs. FG/BG : feuilles et bulbes des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM : feuilles et bulbes des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH : feuilles et bulbes des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BA : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC : feuilles et bulbes des plants de témoin.



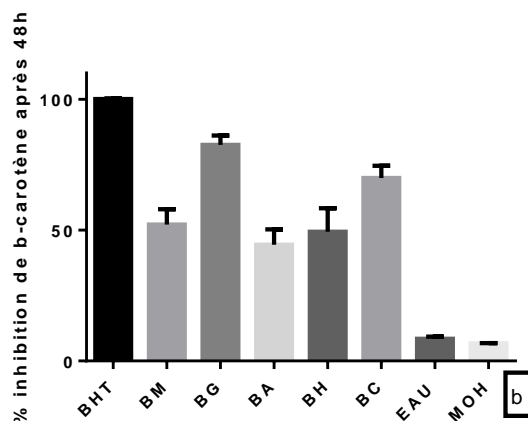


Figure 3.36 : Pourcentage d'inhibition de blanchissement de β -carotène après 48 heures par l'extrait des feuilles (a) et des bulbes (b) de *Polianthes tuberosa* L., cultivée sous l'effet des biostimulants, BHT, l'eau et le méthanol.

FG/BG : feuilles et bulbes des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM : feuilles et bulbes des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH : feuilles et bulbes des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BA : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC : feuilles et bulbes des plants de témoin.

3.3. Pouvoir chélateur

3.3.1. Pouvoir chélateur des polyphénols de *Polianthes tuberosa* L. témoin

L'effet chélateur des extraits de fleurs, de feuilles et de bulbes de *P. tuberosa* présenté dans la Figure 3.37, a fait ressortir la réponse de chélation du fer d'une manière dose dépendante. Le pouvoir chélateur d'un extrait est toujours fondé sur la concentration minimale efficace à piéger 50% de fer dans le milieu réactionnel (EC_{50}). En effet, l' EC_{50} d'EDTA, d'extraits de fleurs, de feuilles et de bulbes étaient de 0.0002 ± 0.0000 mg/mL, $0.0053 \pm 0,0008$ mg/mL, 0.019 ± 0.003 mg/mL et 0.0181 ± 0.0004 mg/mL respectivement. Une différence hautement significative a été démontrée entre le standard (EDTA) et les extraits étudiés ($p < 0.05$) (Figure 3.38). Le pouvoir chélateur d'extrait des fleurs est plus important que celui de l'extrait des bulbes et l'extrait des feuilles, ces résultats sont en concordance avec le test de DPPH et le test de β -carotène.

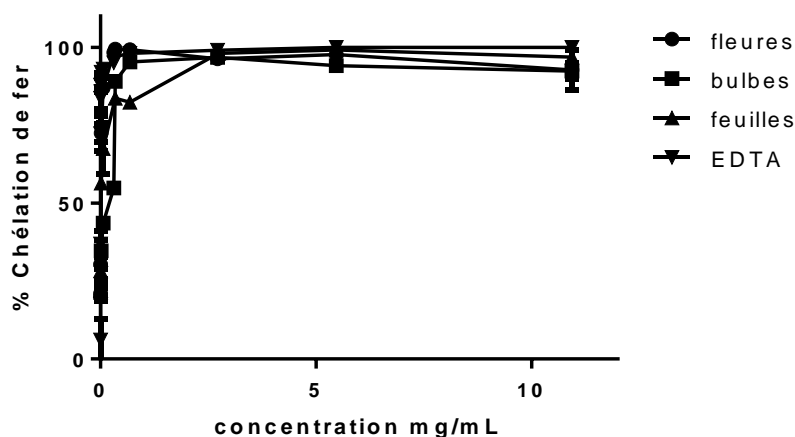


Figure 3.37: Chélation de fer en fonction des différentes concentrations des extraits des différentes parties de *Polianthes tuberosa* L., EDTA.

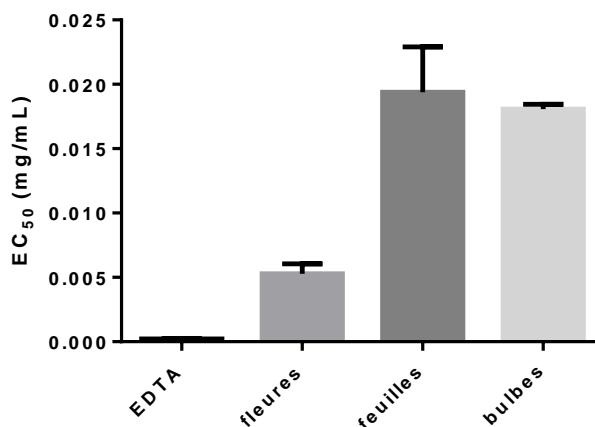


Figure 3.38: Les EC₅₀ de chélation de fer par l'EDTA, les extraits des différentes parties des plants de *Polianthes tuberosa* L.

Le pouvoir chélateur des fractions de l'extrait brut des feuilles de *Polianthes tuberosa* L évalué par le test de ferrozine (Figure 3.39), a montré que la fraction de dichlorométhane (EC₅₀= 0.029±0.002 mg/mL) a le meilleur pouvoir chélateur, suivi par la phase aqueuse (EC₅₀= 0.148±0.080 mg/mL) et la fraction d'hexane (EC₅₀= 3.3±0.2 mg/mL). Comparé au pouvoir chélateur de référence « EDTA » (EC₅₀= 0.0002±0.000 mg/mL), tous les extraits possèdent un faible effet chélateur, avec une différence non significative (p>0.05), mais une différence hautement significative a été révélée entre l'EDTA et la fraction d'hexane (p<0.05) (Figure 3.40).

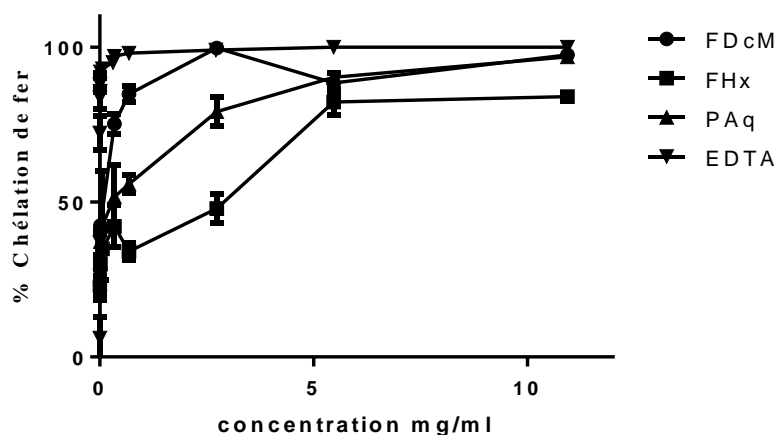


Figure 3.39: Pouvoir chélateur de fer des extraits des fractions des feuilles de *Polianthes tuberosa* L. et l'EDTA,

FHx : fraction d'hexane, FDcM : fraction de dichlorométhane, PAq : phase aqueuse.

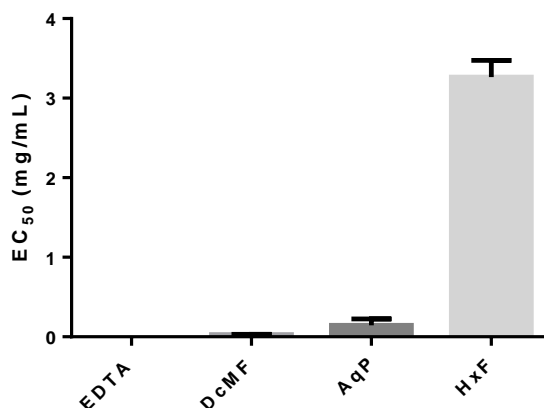


Figure 3.40: Les EC₅₀ de chélation de fer par l'EDTA et les extraits des fractions des feuilles de *Polianthes tuberosa* L.

FDcM : fraction de dichlorométhane, FHx : fraction d'hexane, PAq : phase aqueuse.

3.3.2. Pouvoir chélateur des polyphénols de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants

Les résultats de test de pouvoir chélateur des extraits de différentes parties de *P. tuberosa* L. traitée par les différents biostimulants et les EC₅₀ de chélation de fer par ces extraits sont présentés dans les Figures 3.41-42.

Le pouvoir chélateur de fer des extraits de feuilles de *P. tuberosa* L. (Figures 3.41a) était de manière dose dépendante. L'extrait des feuilles (Figure 3.41a) des plants traités par le marc de café a présenté une importante activité antioxydante (EC₅₀ = 0.003 ± 0.001 mg/mL), dont la différence avec l'EDTA était non significative

($p > 0.05$), suivi par celui des plants traités par l'acide humique, les grignons d'olive, ceux de témoins et l'extrait des feuilles des plants traités par l'hydrolat des plumes, où les concentrations minimales inhibitrices étaient 0.011 ± 0.001 mg/mL, 0.015 ± 0.004 mg/mL, 0.019 ± 0.0001 mg/mL et 0.045 ± 0.002 mg/mL respectivement, avec une différence hautement significative ($p > 0.05$) avec l'EDTA. (Figure 3.42a). De même l'application du marc de café a nettement amélioré le pouvoir chélateur comparé à celui des feuilles des plants cultivés témoin.

Par ailleurs, le pouvoir chélateur des extraits des bulbes de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants a été également d'une façon dose dépendante (Figure 3.41b). D'après les EC_{50} , l'extrait des bulbes des plants traités par les grignons d'olive a montré un pouvoir chélateur de fer très puissant ($EC_{50} = 0.066 \pm 0.002$ mg/mL), où la différence était non significative avec l'EDTA ($p > 0.05$), suivi par celui des plants traités par le marc de café ($EC_{50} = 0.101 \pm 0.013$ mg/mL), l'acide humique ($EC_{50} = 0.13 \pm 0.022$ mg/mL), une différence significative avec l'EDTA ($p > 0.05$) a été enregistré. Une différence hautement significative entre l'extrait des bulbes des plants témoin, celui des plants traités par l'hydrolat des plumes ($EC_{50} = 0.17 \pm 0.02$ mg/mL, $EC_{50} = 0.31 \pm 0.055$ mg/mL) respectivement par rapport l'EDTA ($EC_{50} = 0.0002 \pm 0.000$ mg/mL) ($p < 0.05$) (Figure 3.42b). L'application des grignons d'olive et le marc de café a donc amélioré le pouvoir chélateur de l'extrait des bulbes par rapport aux autres traitements et par comparaison aux bulbes cultivés témoin.

Le pouvoir chélateur des extraits de fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée sous l'effet des biostimulants était dose dépendante (Figure 3.41c). Selon les EC_{50} (Figure 3.42c) du pouvoir chélateur de chacun des extraits analysés et l'EDTA, l'extrait de fleurs des plants traités par le marc de café et par l'hydrolat des plumes ont révélé un important pouvoir chélateur de fer par rapport aux autres extraits ($EC_{50} = 0.0048 \pm 0.002$ mg/mL et 0.007 ± 0.003 mg/mL) respectivement, avec une différence non significatif de ceux-ci et l'EDTA ($EC_{50} = 0.0002 \pm 0.0000$ mg/mL), suivi par les extraits des fleurs des plants témoins et ceux traités par les grignons d'olive ($EC_{50} = 0.035 \pm 0.0045$ mg/mL, 0.044 ± 0.009 mg/mL) respectivement, dont la différence était hautement significative avec l'EDTA ($p < 0.05$). L'application du marc de café et de l'hydrolat des plumes a engendré un même pouvoir chélateur chez les fleurs de *P. tuberosa* L. cultivée témoin.

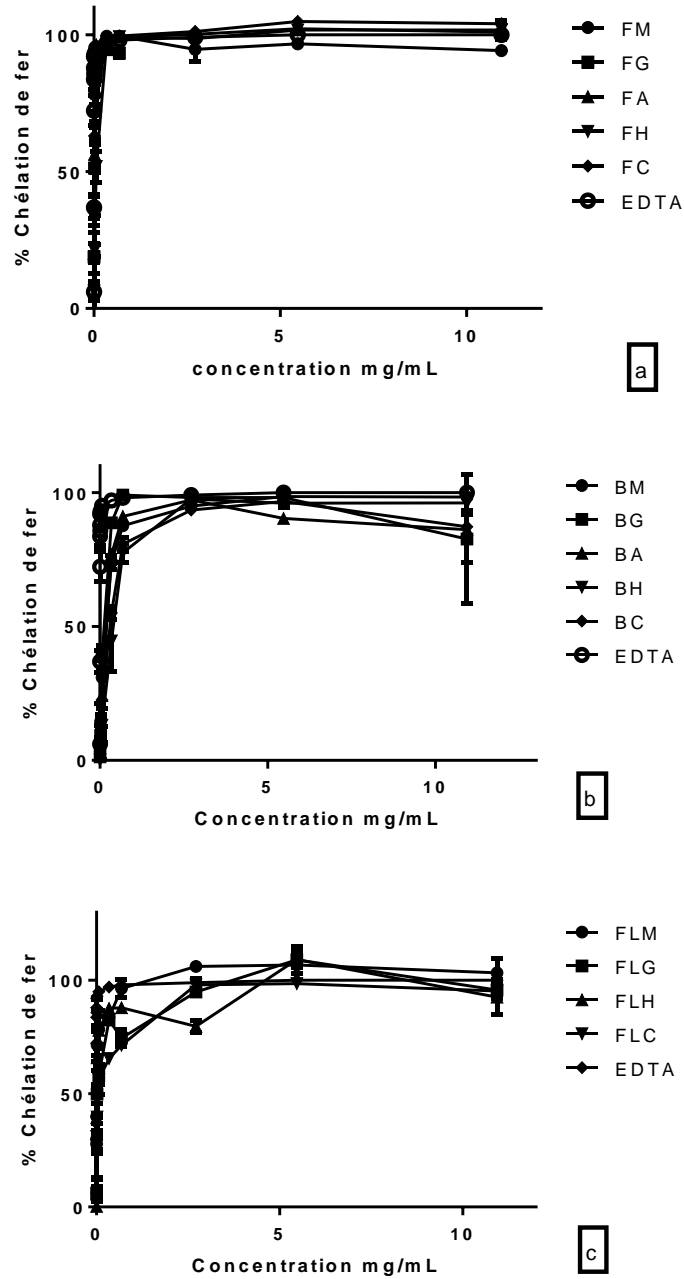


Figure 3.41: Pouvoir chélateur de fer des extraits des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de *Polygonatum tuberosum* L. cultivée sous l'effet des biostimulants et l'EDTA : chélateur de référence.

FG/BG/FLG : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM/FLM : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH/FLH : feuilles, bulbes et fleurs des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BG : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC/FLC : feuilles des plants de témoin.

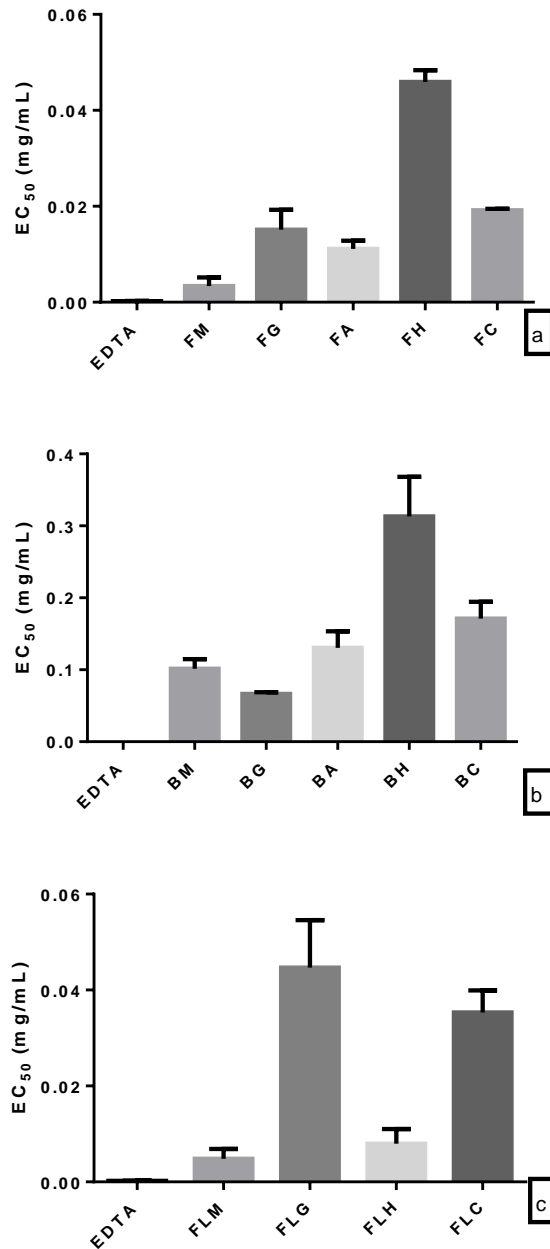


Figure 3.42: Les EC₅₀ de chélation de fer par l'EDTA, l'extrait des feuilles (a), des bulbes (b) et des fleurs (c) de *Polianthes tuberosa* L. traités par les biostimulants. FG/BG/FLG : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans les grignons d'olive, FM/BM/FLM : feuilles, bulbes et fleurs des plants cultivées dans le marc de café, FH/BH/FLH : feuilles, bulbes et fleurs des plants arrosées par l'hydrolat des plumes, FA/BG : feuilles et bulbes des plants traitées par l'acide humique, FC/BC/FLC : feuilles des plants de témoin.

II.DISCUSSION

Les extraits de fleurs de *P. tuberosa* L. ont tous montré un puissant pouvoir antioxydant selon tous les tests étudiés. L'application des biostimulants a diminué

en quelque sorte cette activité. Cependant, celui-là a été amélioré pour les extraits de fleurs des plants traités par le marc de café et d'hydrolat des plumes qui est justifié d'après Gurav et *al.* [103], l'amendement des plants par des apports organiques favorise l'accumulation des antioxydants dans les tissus des plants. D'autres travaux ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs des plants cultivés de *P. tuberosa* L. en Inde ont un important effet anti-radicalaire ($IC_{50} = 0.006$ mg/mL), suivi par l'extrait de dichlorométhane ($IC_{50}=0.015$ mg/mL) et en faible effet pour l'extrait d'hexane ($IC_{50}= 3.419$ mg/mL) [11]. Ces valeurs sont supérieures à nos résultats et cette différence peut être due au facteur géographique et climatique entre les deux régions.

L'extrait brut des feuilles de *P. tuberosa* L. et ses fractions possèdent une importante activité antioxydante présentée précisément par la fraction de dichlorométhane et la phase aqueuse selon les trois tests étudiés. Nos résultats coïncident avec ceux démontrés par Moussa et *al.* [139] où le pourcentage d'inhibition contre le DPPH de 50 µg/mL de l'extrait méthanolique des feuilles de *P. tuberosa* L. est de 12%. L'application des biostimulants a augmenté cette activité chez les feuilles des plants traités comparée à celle des plants témoins. Cependant, les extraits des bulbes possèdent en général, une faible activité antioxydante comparés aux fleurs et feuilles. Ceci se traduit par la faible teneur en polyphénols et par la possibilité d'un effet antagoniste entre le mélange de composés phénoliques contenus dans l'extrait brut des bulbes [132,139]. En plus, il a été justifié que la partie aérienne généralement présente une activité antioxydante plus importante que la partie bulbeuse des plants [132], comme réponse préventif contre les facteurs biotique et abiotique de stress oxydant. L'application des biostimulants a donc réduit l'activité antioxydante chez les bulbes mis à part pour les bulbes traités par les grignons d'olive, où l'activité était plus importante que des bulbes des plants témoins. Les valeurs enregistrées dans le cas de nos résultats sont inférieures à celles des travaux de Rumi et *al.* [130], où l'extrait méthanolique des bulbes de *P. tuberosa* L. a montré un pouvoir anti-radicalaire important $IC_{50}=0.0712$ mg/mL, suivi par la fraction d'hexane et de chloroforme $IC_{50}= 0.084$ et 0.094 mg/mL respectivement, et enfin la phase aqueuse ($IC_{50}= 0.112$ mg/mL).

En se base sur le profil qualitatif des extraits étudiés, la présence de l'acide caféique, l'acide gallique, la rutine, la vanilline et la quercétine surtout au niveau

de fleurs, dont ces phénols sont doués d'une activité antioxydante déjà reporté dans la littérature, confirme cette puissante activité dans les extraits des fleurs [140,141,142,143].

Les 2 principaux cibles lipidiques des radicaux libres (OH^\bullet surtout) sont les acides gras polyinsaturés présents dans les phospholipides et le cholestérol des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Les produits d'oxydation formés peuvent participer, en tant que seconds messagers, ils peuvent aussi et surtout se comporter comme des substances toxiques responsables de dysfonctionnements et d'altérations cellulaires et comme cancérigène [96]. La peroxydation lipidique est considérée comme normale quand elle reste contrôlée par des enzymes (la prostaglandine synthétase, la cyclooxygénase, la thromboxane synthétase). Elle devient pathologique quand son mécanisme est catalysé par les ions ferriques, elle peut se propager alors aux molécules voisines et donner naissance à des pontages entre les molécules qui peuvent jouer un rôle important dans différentes pathologies [90]. C'est pour ça l'élimination des ions ferrique peut inhiber l'initiation de la peroxydation lipidique. Par conséquent, les polyphénols présents dans les extraits pourraient récupérer les radicaux peroxydes en leur donnant d'un atome d'hydrogène avant qu'il ne puisse réagir avec l'acide linoléique et donc inhibé la peroxydation lipidique [144].

Par ailleurs, En présence de traces de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+), le H_2O_2 est converti par la réaction de Fenton en radical hydroxyle OH^\bullet et ion hydroxyle OH^- . Le fer peut également catalyser la transformation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en OH^\bullet en présence de H_2O_2 selon la réaction dite de Haber Weiss [90]. Ces radicaux libres d'oxygène actif peuvent à son tour perpétuer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique qui est impliqué dans diverses maladies chroniques. Les chélateurs des métaux spécialement les extraits de plants riches en polyphénols, réduisent la concentration des ions ferrique dans la réaction de Fenton et protège ainsi le système vivant de dommages oxydatifs issus des processus dépendantes des ions ferrique [144, 145], c'est le cas des polyphénols des fleurs, où ils présentent un effet chélateurs important par rapport aux feuilles et bulbes, où ceux-ci peuvent présenter un effet chélateur à des fortes concentrations.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIFS

Ce présent travail s'intéresse à la tubéreuse (*P. tuberosa* L.), une plante ornementale, d'intérêt économique. Il vise sa propagation, sa caractérisation phytochimique et biologique comme antioxydant. Vu qu'elle est délaissée en Algérie, et elle est cultivée que chez certaines pépinières. En effet, notre étude a été basée sur trois principales parties : la mise en place de la culture des bulbes de la plante étudiée en pots selon deux essais. L'étude phytochimique des extraits des plants issus des deux essais de culture et l'étude de leur activité antioxydante. Un premier essai de la culture en pots a été réalisé, en considérant deux conditions de culture : sous serre et en plein champ, et différents diamètres des bulbes, afin de sélectionner la condition et le diamètre de bulbe adéquat, pour une meilleure production de la tubéreuse. Les résultats du premier essai de la culture de tubéreuse ont montré que la culture sous serre en utilisant des bulbes de diamètre supérieur à 2cm a engendré à une bonne production de la tubéreuse. Le deuxième essai concerne la culture des deux groupes des bulbes (gros et petits bulbes) en pot sous serre, cette étape repose sur l'utilisation des biostimulants tels que : le marc de café, l'hydrolat des plumes, les grignons d'olive et l'acide humique. Les résultats de deuxième essai de la culture ont confirmé que l'application de l'hydrolat des plumes à 20% (v/v) par arrosage et l'incorporation de 10% (m/m) de marc de café sec, en utilisant toujours des bulbes de diamètre supérieur à 2 cm ont montré une bonne croissance végétative des plants cultivés, et surtout une induction florale importante.

L'étude phytochimique par le screening phytochimique des feuilles, fleurs et des bulbes de la tubéreuse, a mis en évidence la présence des tanins, des saponines, du mucilage, des glycosides, des flavonoïdes et des terpénoides. Par ailleurs, des autres extractions ont été complété cette étude telles que, l'extraction des alcaloïdes à partir des bulbes et des bulbilles de la tubéreuse, celle de l'absolu des fleurs, et des polyphénols des feuilles, des fleurs et des bulbes des plants cultivés témoin. Les résultats ont révélé une similarité concernant le rendement en alcaloïdes entre les bulbes et les bulbilles d'environ 0.035-0.055%. L'analyse chromatographique de l'absolu des fleurs a affirmé que l'extrait renferme l'isoeugénol comme constituant majeur (21.89%). Egalement, l'extrait des fleurs a

montré la plus importante teneur en polyphénols (32.4 mg EAG/g E). La teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés a nettement augmenté chez les extraits de fleurs issus des plants traités par arrosage à l'aide de 20% de l'hydrolat des plumes (94.16 mg EAG/g E, 3.055 mg EQ/g E, 5.488 mg EC/g E), et chez les extraits de toutes les parties des plants traités par l'incorporation de 10% de marc de café (13.30-68.34 mg EAG/g E, 0.275-3.685 mg EQ/g E, 1.18-3.964 mg EC/g E). Ces résultats ont été confirmés par l'HPLC-DAD, où les deux traitements ont stimulé la synthèse des polyphénols au niveau des feuilles et des bulbes, c'est le cas de la vanilline et de l'acide gallique.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH confirme que les extraits des alcaloïdes des bulbes et des bulbilles n'ont pas une forte activité antiradicalaire par rapport à l'acide ascorbique. En revanche, les polyphénols extraits des fleurs ont confirmé une activité antioxydante puissante comparée à celle des extraits issus des feuilles et des bulbes. De même, cette activité a été augmentée par l'application des biostimulants, chez les bulbes, les feuilles des plants traités par le marc de café et les grignons d'olive, aussi chez les fleurs des plants traités par le marc de café et l'hydrolat des plumes, ceci peut être expliqué par les teneurs en polyphénols ainsi leurs diversités dans les extraits étudiés.

Plusieurs portes s'ouvrent pour des études ultérieures sur la tubéreuse. Il est important de poursuivre les analyses chromatographiques des extraits des alcaloïdes des bulbes. D'autres études doivent être proposées comme l'essai de la culture en plein champ des bulbes en appliquant l'hydrolat des plumes et le marc de café, et en variant les doses et en modifiant les modes d'application. Des études requises pour dévoiler l'impact des biostimulants utilisés sur les hormones de croissance chez les plantes cultivées, et expliquer leur mécanisme d'action sur la croissance et la production des fleurs et des bulbes chez *P. tuberosa* L., aussi que, sur la biosynthèse des polyphénols. Il serait également intéressant d'identifier tous les polyphénols de tous les extraits étudiés en faisant appel à des méthodes d'analyse chromatographiques sophistiqués. Il serait souhaitable également d'étudier l'effet de l'application de l'hydrolat des plumes et du marc de café sur l'odeur et l'essence de la tubéreuse. Ainsi que, l'étude des autres activités biologiques.

APPENDICES A**LISTE DES ABBREVIATIONS**

°C :	Degrés Celsius
µL :	Microlitre
BHT:	hydroxytoluène butylé
CG-MS :	Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EC₅₀	Concentration efficace de balayage de 50% de Fer
EDTA :	Acide éthylène diamine tetraacétique
GLM :	Analyse de variance modèle linière globale
HCl :	Acide chlorhydrique
HPLC-DAD :	Chromatographie liquide à haute performance couplée à détecteur des rayons d'iode.
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50% de l'activité du DPPH
p:	Probabilité associée
pH :	Potentiel d'hydrogène
SD :	Standard de déviation
Φ	Diamètre équivalent

APPENDICE B

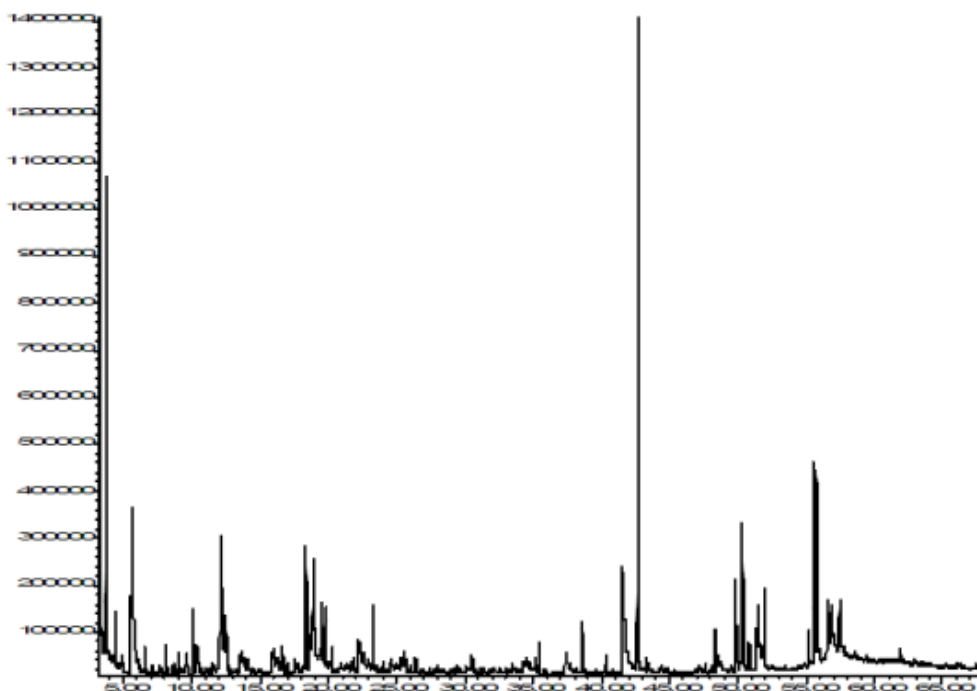


Figure 1 : Chromatogramme de CG-MS de l'absolu des fleurs sèches de *Polianthes tuberosa* L.

Acide gallique

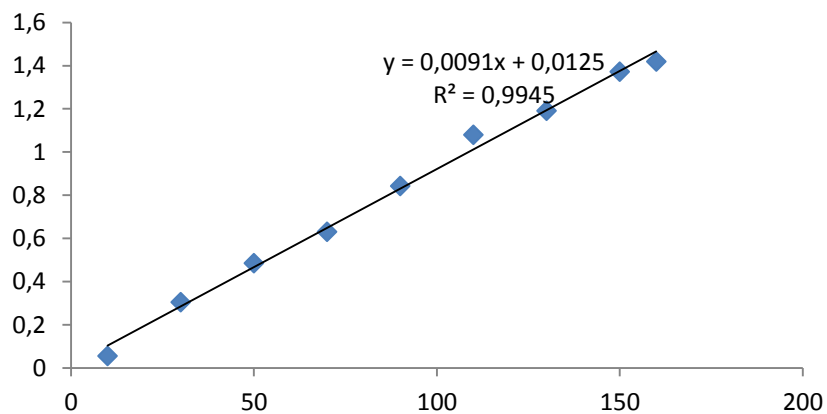


Figure 2 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Quercétine

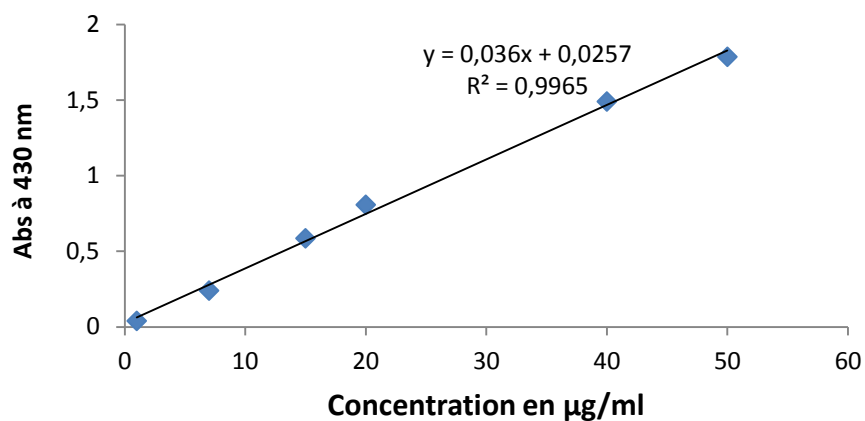


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Catéchine

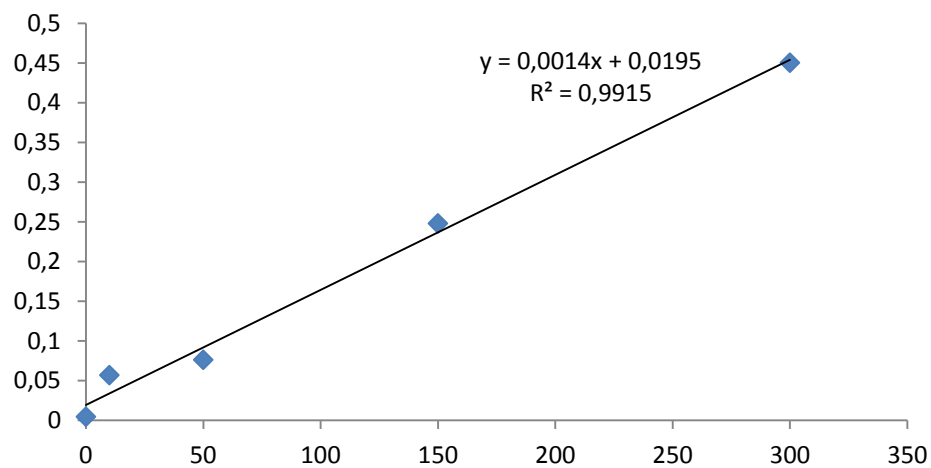
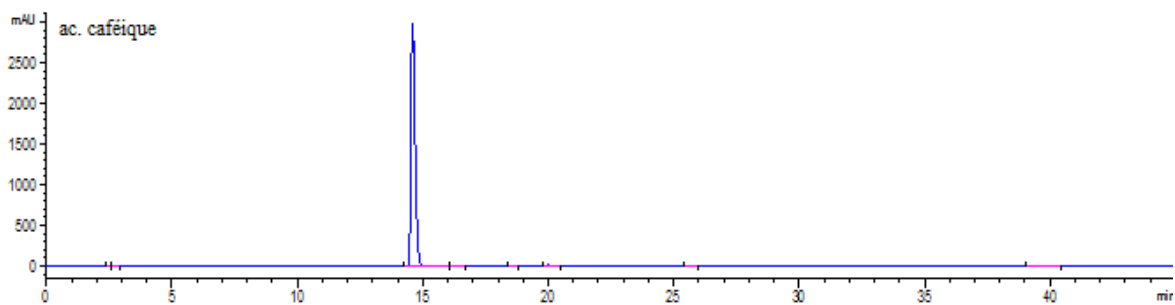
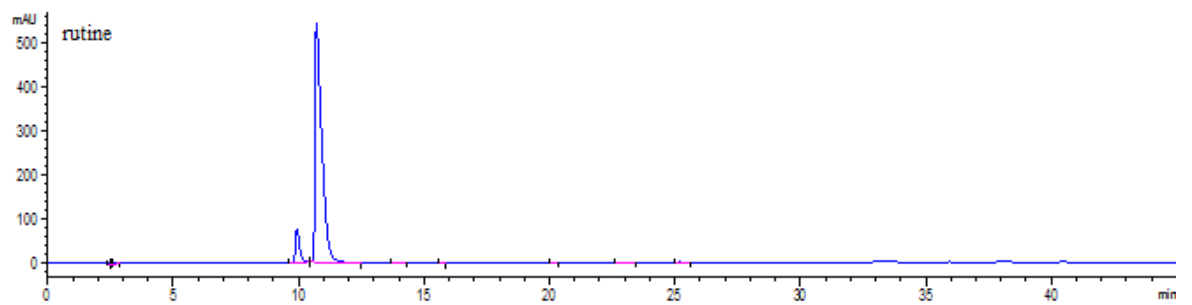
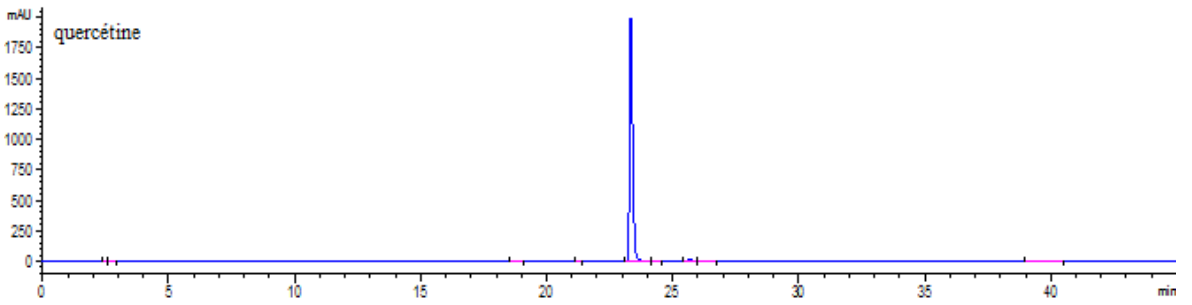
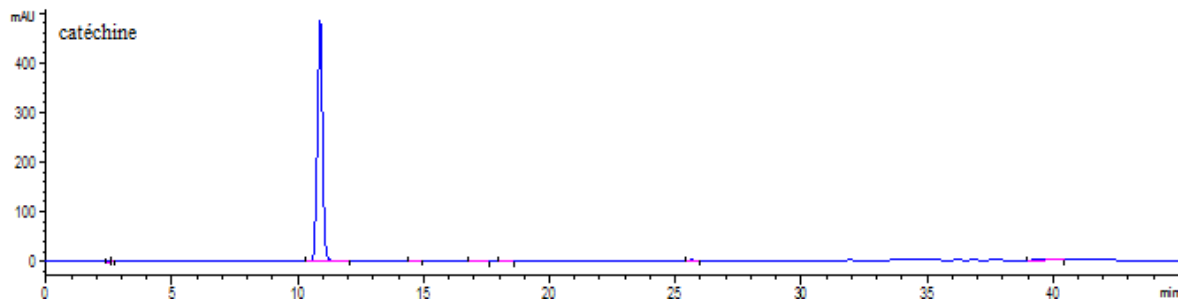
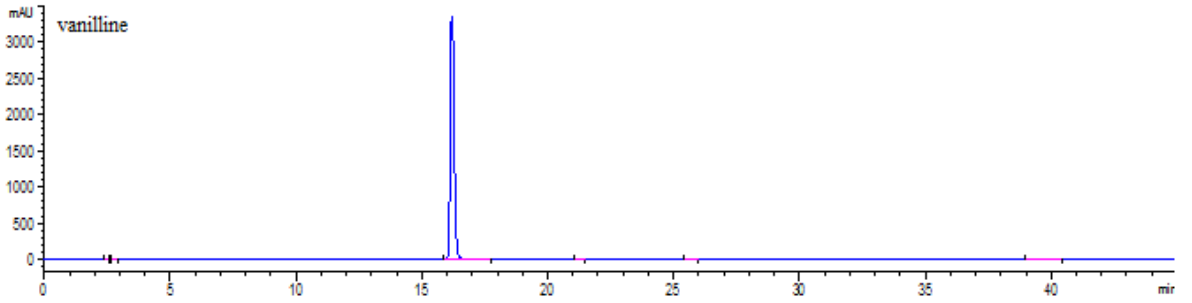
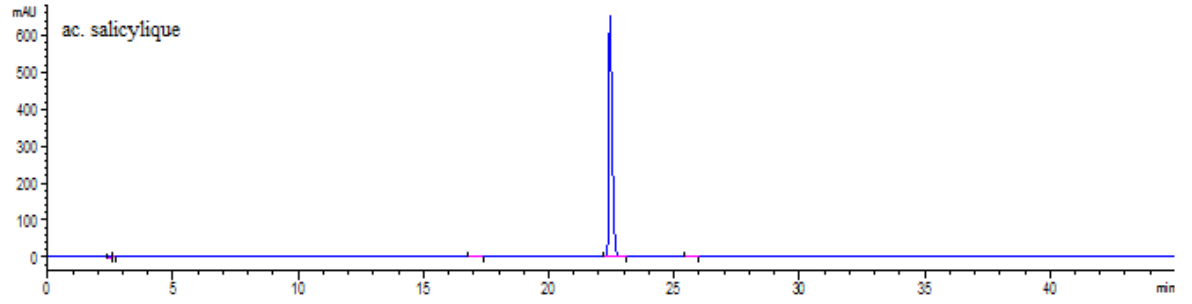
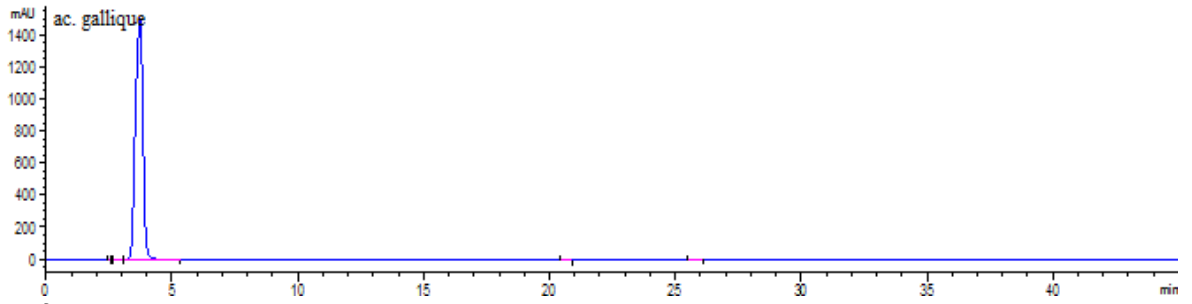


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine





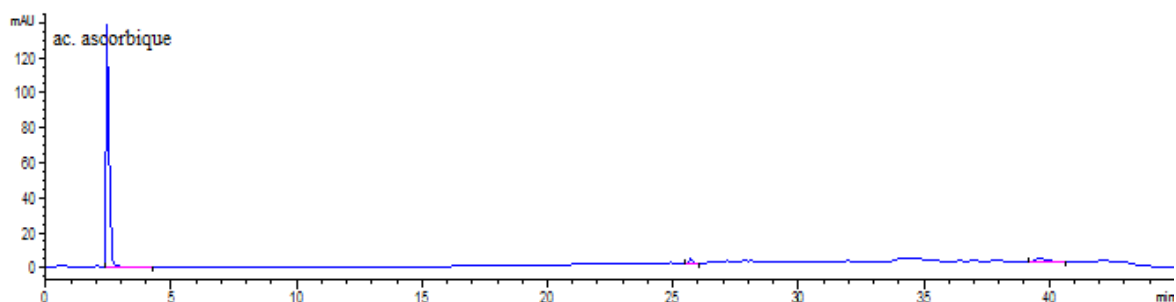


Figure 5 : Chromatogrammes d'HPLAC-DAD des standards des polyphénols.

Réactifs chimiques

Les solvants utilisés pour les expériences sont de grade analytique : méthanol, éthanol, hexane, dichlorométhane ont été fournis par Sigma-Aldrich, chloroforme de Fluka. Le méthanol HPLC est utilisé pour l'analyse par HPLC. L'acide hydrochlorique (HCl), l'acide formique et le sel de carbonate de sodium ont été fournis par Sigma-Aldrich, l'acide linoléique, acide gallique, acide ascorbique, la base d'ammoniaque (NH_3) de Prolabo.

Les réactifs Folin-Ciocalteu, trichlorure d'aluminium (AlCl_3), réactif de Dragendorff, 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) d'Aldrich chemistry. Autres produits chimiques : quercétine, rutine, catéchine, hydroxytoluène butylé (BHT), β -carotène, tween 40, 3-(2-pyridyl)-5,6bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (Ferrozine), Fer bichlorure tétrahydrate (FeCl_2), acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) fournissent par Fluka et Sigma.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Singh A. K. (2006)**. Flower crops cultivation and management. Ed. Jai Bharat Printing Press, India. 447 p.
2. **Wiar C. (2012)**. Medicinal plants of China, Korea, and Japan. Bioresources for tomorrow's drugs and cosmetics. Ed. CRC Press, USA. 421p.
3. **Barba-Gonzalez R., Rodríguez-Domínguez J. M., Castañeda-Saucedo M. C., Roríguez A., Van Tuyl J. M., Tapia-Campos E. (2012)**. Mexican geophytes I. the genus *Polianthes*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(6): 122-128.
4. **Lim T.K. (2014)**. Edible medicinal and non-medicinal plants. Ed. Springer Dordrecht Heidelberg, New York. 1077 p.
5. **Panigrahi J., Saiyad M. S. L. (2013)**. *In vitro* propagation of *Polianthes tuberosa* L. cultivars (Calcutta single). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 3 (3): 76-79.
6. **Gilly G. (1997)**. Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse. Botanique-Culture-Chimie-Production et marché. Ed. L'Harmattan, France. 372 p.
7. **Chandravadana M. V., Srinivas M., Murthy N. (1994)**. Indole in Tuberose (*Polianthes tuberosa*) varieties. *Journal of Essential Oil Research*, 6(6): 653-655.
8. **Singh K.P., Suneja P., Mohan J., Singh M.C. (2009)**. Gas chromatography evaluation of floral extract of two single and double type cultivars of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Progressive Horticuture*, 2(41): 145-147.
9. **Nidiry E. S. J., Babu C. S. B. (2005)**. Antifungal activity of tuberose Absolute and some of its constituents. *Phytotherapy Research*, 19: 447-449.
10. **Rakthaworn P., Dilokkunanant U., Sukkatta U., Vajrody S., Haruethaitanasan V., Pitpiangchan P., Punjee P. (2009)**. Extraction methods for tuberose oil and their chemical components. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43: 204-211.

11. **Maiti S., Moon U.R., Bera P., Samanta T., Mitra A. (2014).** The *in vitro* antioxidant capacities of *Polianthes tuberosa* L. flower extracts. *Acta. Physiol. Plant*, 36(10): 2597-2605.
12. **Ghosh P.K., Bhattacharjee P., Das S. (2014).** Antimicrobial activity of supercritical carbon dioxide extracts of tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn.) flowers against common pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(4): 1279-1289.
13. **Lahlou M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytothera. Res.*, 18: 435-448.
14. **Huang K.L., Miyajima I., Okubo H., Shen T.M., Huang T.S. (2001).** Flower colours and pigments in hybrid tuberose (*Polianthes*). *Scientia Horticulturae*, 88 : 235-241.
15. **Huang K.L., Miyajima I., Okubo H., Shen T.M., Huang T.S. (2002).** Breeding of colored tuberose (*Polianthes*) and cultural experiments in Taiwan. *Acta. Hort.*, 570: 367-371.
16. **Lobna S.T., Rawia A.E. (2011).** Stimulation of some bioregulators on flowering, chemical constituents, essential oil and phytohormones of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *New York Science Journal*, 4(5): 16-21.
17. **Rammamurthy J., Venkataraman S., Meera R., Prasad S., Christina A. J. M., Devi P. (2010).** Phytochemical investigation of *Polianthes tuberosa*. *Inter. J. Pharm.Tech. Res.*, 2(2): 1204-1206.
18. **Mimaki Y., Yokosuka A., Sashida Y. (2000).** Steroidal glycosides from aerial parts of *Polianthes tuberosa*. *J. Nat. Prod.*, 63: 1519-1523.
19. **Jin J. M., Zhang Y. J., Yang C. R. (2004).** Spirostanol and furostanol glycosides from the fresh tubers of *Polianthes tuberosa*. *J. Nat. Prod.*, 67: 5-9.
20. **Firdous S., Rashid A., Ahmad V. U., Mohammed Khan K., Usmani S. B. (1999).** A novel steroidal saponin from *Polianthes tuberosa* L. *Natural Product Letters.*, 2(14): 115-112.
21. **Khan K.M., Perveen S., Ayattllahi S.A.M., Saba N., Rashid A., Firdous S., Haider S.M., Ullah Z., Rahat S., Khan Z. (2002).** Isolation and structure elucidation of three glycosides and a long chain alcohol from *Polianthes tuberosa* L. *Natural Product Letters*, 4(16): 283-290.

22. **Mimaki Y., Yokosuka A., Sakuma C., Sakagami H., Sashida Y. (2002).** Spirostanol pentaglycosides from the underground parts of *Polianthes tuberosa*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1424-1428.
23. **Ramamoorthy J., Venkataraman S., Meera R., Chidambaranathan N., Devisree P.D. (2009).** Phyto-physico chemical investigation, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Polianthes tuberosa* Linn. *Research Journal of Pharmacy and Technology.*, 2(4): 738-742.
24. **Kiruthika K.A., Jaisheeba A.A., Sornaraj R. (2011).** Evaluation of antibacterial activity of some selected Angiosperm flower extract. *International Journal of ChemTech Research*, 3(4): 1945-1951.
24. **Lodhia M. H., Bhatt K. R., Thaker V. S. (2009).** Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. *Indian J Pharm Sci.*, 71 (2): 134-136.
25. **Padul M.V., Patil M.T., Chougale A.D., Zambare V.P., Patil R.M., Ghule R.B., Naikwade S.V., Garad A. S., Shaikh F.K., Gadge P.P., Shinde K.D., Dama L.B., Salve A.N. (2012).** *In vitro* screening of proteinase inhibitors (trypsin, chymotrypsin and *Helicoverpa* gut proteinase inhibitors) in different plant tissue extracts. *Trends in Biotechnology Research*, 1(1): 7-14.
26. **Singh K., Singh V. K., Singh D. K. (1999).** Effect of *Polianthes tuberosa* (Amaryllidaceae) on the production and biochemical parameters in the ovotestis of snail *Lymnaea acuminata* (Mollusca, Pulmonata). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 27(1): 32-37.
27. **Singh K., Singh D.K (2000).** Effect of different combinations of MGK-264 or piperonyl butoxide with plant-derived molluscicides on snail reproduction. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38: 182–190.
28. **Singh A., Singh D.K. (2004).** Effect of herbal molluscicides and their combinations on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46 : 470–477.
29. **Rawani A., Banerjee A., Chandra G. (2012).** Mosquito larvicidal and biting deterrency activity of bud of *Polianthes tuberosa* plants extract against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1: 200-204.

30. **Ahmad I., Ahmad T., Asif M., Saleem M., Akram A. (2009).** Effect of bulb size on growth, flowering and bulb production of tuberose. *Sarhad J. Agric.*, 3(25): 391-398.
31. **Hatamzadeh A., Tehranifar A., Akbari R. (2012).** Effect of planting depth, bulb size and their interactions on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12(11): 1452-1456.
32. **Asif M., Qasim M., Mustafa G. (2001).** Effect of Planting dates on growth, flowering and corm characteristics of tuberose (*Polianthes tuberosa*) cv. Single. *International Journal of Agriculture & Biology*, 4(3): 391-393.
33. **Padaganur V.G., Mokashi A.N., Patil V.S. (2005).** Effect of planting time on growth and yield of flowers in tuberose cv. Single. *Karnataka Journal of Agriculture Science*, 18(2):551-554.
34. **Amin R., Faridujjaman M., Jamal Uddin A.F.M. (2012).** Phosphorus levels on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Bangladesh Research Publications Journal*, 4(7): 324-330.
35. **Hussain M.A., Amin N.U., Ayub G., Sajid M. (2014).** Response of tuberose (*Polianthes tuberosa*) to potassium and planting depth. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 11(4): 106-110.
36. **Kumar S. et Singh R.P. (1998).** Effect of nitrogen, bulb size and plant density on growth, flowering and yield of tuberose (*Polianthes Tuberosa* L.). *Journal of Ornamental Horticulture*, 1(1): 6-10.
37. **Nair S.A., Attri B.L., Sharma T.V.R.S. (2000).** Effect of N and P on growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of Tropical Agriculture*, 38 (1):66-68.
38. **Kadu A.P., Kadu P.R., Sable A.S. (2009).** Effect of nitrogen, phosphorus and potassium on growth, flowering and bulb production in tuberose cv. Single. *Journal of Soils and Crops*, 19(2): 367-370.
39. **Bahadoran M., Salehi H., Eshghi S. (2011).** Growth and flowering of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) as affected by adding poultry litter to the culture medium. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2): 531-536.
40. **El-Sayed B.A. (2012).** Effect of potassium fertilization sources, bulb size and their interactions on growth and flowering of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(2): 250-255.

41. **Ikram Samia, Habib Umer, Khalid Nauman. (2012).** Effect of different potting media combinations on growth and vase life of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Pak. J. Agri. Sci.*, 49(2):121-125.
42. **Kabir A.K.M.R., Iman M.H, Mondal M.M.A., Chowdhury S.. (2011).** Response of Tuberose to integrated nutrient management. *Journal of Environmental Science & Natural Resources*, 4(2): 55-59.
43. **Padaganur V.G., Mokashi A.N., Patil V.S (2005).** Flowering flower quality and yield of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) as influenced by vermicompost, farmyard manure and fertilizers. *Karnataka J.Agric.Sci.*,18 (3):729-734.
44. **Bahadoran M., Salehi H., Eshghi S. (2012).** Growth and flowering of tuberose as affected by adding natural zeolite to the culture medium. *Journal of Plant Nutrition*, 35:1491–1496.
45. **Asil M. H., Roein Z., Abbasi J. (2011).** Response of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) to Gibberellic Acid and Benzyladenine. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 52(1):46-51.
46. **Pandhare K.S., Manisha D., Rathod N.G., Padgilwar T. (2009).** Effect of bioinoculants with reduced doses of inorganic fertilizers on flower quality and yield of tuberose. *Journal of Plant Disease Sciences*, 4(1): 84-87.
47. **Chaudhary S.V.S. (2010).** Biofertilizers and their application in floriculture-a review. *Annals of Hoorticulture*, 3(1): 29-33.
48. **Mahawer L.N., Bairwa H.L., Shukla A.K. (2010).** Response of biostimulants as preharvest management of tuberose cut spike (*Polianthes tuberosa*) cv.Phule Rajani. *Progressive Horticulture*, 42(1): 54-57.
49. **Eid R.A., Khalifa R.Kh.M., Shaaban S.H.A. (2010).** Effect of foliar application of zinc and benzyladenine on growth, yield and chemical constituents of tuberose plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(6): 732-743.
50. **Kashyap R., Chaudhary S., Dilta B., Sharma B., Gupta Y. (2014).** Integrated nutrient management in tuberose, *Polianthes tuberosa* L. *International Journal of Farm Sciences*, 4(1): 55-59.
51. **Koley S., Pal A.K. (2011).** Response of inorganic fertilizer & bio fertilizer on growth and flower yield of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cv. Prajwal in the plains of West Bengal. *Journal of Crop and Weed*, 7(2): 241-243.

52. **Bulgari R., Cocetta G., Trivellini A., Vernieri P., Ferrante A. (2015).** Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1): 1-17.
53. **Calvo P., Nelson L., Kloepper J.W. (2014).** Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383: 3-41.
54. **Nardi S., Pizzeghello D., Schiavon M., Ertani A. (2015).** Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 1 (73):18-23.
55. **Bhosale P. R., Gurav R.G., Jadhav J.P., Raut P.D. (2015).** Improvisation of pressmud by organic amendment and its effect on soil quality and growth of Chilli, *Capsicum annum*. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 3(87):849-857.
56. **Pasupuleti V.K., Braun S. (2010).** Protein Hydrolysates in Biotechnology. Ed. Springer, Netherlands, 229 p.
57. **Hussain I.S.A., Ganesh P.T., Subbarao S.B. (2015).** Bio Stimulant Activity of Protein Hydrolysate: Influence on Plant Growth and Yield. *Journal of Plant Science & Research*, 2(2): 1-6
58. **Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2017).** Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*, 247:1077-1084.
59. **Zhang L., Sun X. (2017).** Using cow dung and spent coffee grounds to enhance the two-stage co-composting of green waste. *Bioresource Technology*, 245:152-161.
60. **Yamane K., Kono M., Fukunaga T., Iwai K., Sekine R., Watanabe Y., Iijima M. (2014).** Field evaluation of coffee grounds application for crop growth enhancement, weed control, and soil improvement. *Plant Prod. Sci.*, 17(1): 93-102.
61. **Roig A., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26: 960–969.
62. **Assaf T.A., Turk M.A., Hameed K.M. (2009).** Impact of olive pomace wastes and fungicide treatment on indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 3(1):6-12.

63. **Winkelhausen E., Pospiech R., Laufenberg G. (2005).** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 1(24):41-46.
64. **Brunetti G., Plaza C., Senesi N. (2005).** Olive pomace amendment in mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *J. Agric. Food Chem.*, 53:6730-6737.
65. **Iserin P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparations, soins. Ed. LAROUSSE, France, 336 p.
66. **Purchon N. (2008).** La bible de l'aromathérapie. Ed. Marabout, Cameron, 413 p.
67. **Pereira Nunes X., Souza Silva F., Guedes da S., Almeida J.R., Tolentino de Lima J., Augusto de Araújo Ribeiro L., Quintans Júnior L.J., Barbosa Filho J.M. (2012).** Phytochemicals as Nutraceuticales-Global Approaches to their Role in Nutrition and Health, Ed. INTECH, China, 20 p.
68. **Aburjai T., Natsheh F. M. (2003).** Plants used in cosmetics. *Phytotherapy research*, 17: 987-1000.
69. **Seeruttun A. (2012).** L'industrie de la parfumerie. Ed. Financière de la Cité, Paris, 59p.
70. **Catier O., Roux D. (2007).** Botanique. Pharmacognosie. Phytothérapie. Ed. Wolters Kluwer, France, 141p.
71. **Buronzo A. M. (2008).** Grand guide des huiles essentielles santé, beauté, bien-être. Ed. HACHETTE Pratique, France, 254p.
72. **Voon H. C., Bhat R., Rusul G. (2012).** Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 34-55.
73. **Haagen-Smit A. J. (1949).** Essential oils: a brief survey of their chemistry and production in the United States. *Economic Botany*, 1(3): 71-83
74. **Edeas M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5; 264-270.
75. **Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, Ed. Presses polytechniques et universitaires Fomandes, Italie, 33 p.

76. **Kasote DM. (2013).** Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int. Food Res. J.*, 1: 27-34.
77. **Tsao R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2: 1231-1246.
78. **Stalikas C.D. (2010).** Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology, Ed. Humana Press, India, 610p.
79. **Dai J., Mumper R.J. (2010).** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
80. **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2010).** Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
81. **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
82. **Evans W.C. (2009).** Pharmacognosy. Ed. Saunders Elsevier, London, 571p.
83. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Ed. Lavoisier, France, 1143p.
84. **Bastida J., Berkov S., Torras L., Belén Pigni N., Andrade JP., Martínez V., Codina C., Viladomat F. (2011).** Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1: 65-100.
85. **Singh A., Desgagné-Penix I. (2014).** Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*, 1(3): 114-120
86. **Hanks G.R. (2002).** Narcissus and Daffodil. The genus Narcissus. Ed. Taylor and Francis, London, 419p.
87. **Çitoğlu G.S., Acikara Ö.B., Yılmaz B.S., Özbek H. (2012).** Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia*, 83: 81–87.
88. **Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006).** Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med.*, 4: 327-358.
89. **Bahorun T., Soobrattee M.A., Luximon-Ramma V., Aruoma O.I. (2006).** Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet J Med Update*, 1 : 25-41.
90. **Borg J., Beeber A. (2008).** Biochimie métabolique, Ed. Ellipses, France, 273 p.

91. **Moussard C. (2006).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. In: *Biochimie structural et métabolique*, Ed. De boeck, Bruxelles, 341 p.
92. **Kohen R., Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30: 620-650.
93. **Li A.N., Li S., Li H.B., Xu D.P, Xu X.R., Chen F. (2014).** Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods*, 6:319-330.
94. **Dzoyem J.P., Eloff J.N. (2015).** Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 160:194-201.
95. **Percival M. (1996).** Antioxidants. *Clin Nutr Insights* 31: 1-4.
96. **Kunwar A., Priyadarsini KI. (2011).** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci*, 2: 53-60.
97. **Prior R. L., Wu X., Schaich K (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53:4290-4302.
98. **Denys J.C. (2013).** Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. Ed. Springer, New York, 589p.
99. **Singh S., Singh R.P. (2008).** *In vitro* methods of assay of Antioxidants: an overview. *Food Reviews International*, 24:392–415.
100. **Badarinath A.V., Mallikarjuna K. RAo, Sudhana Chetty C.Madhu, Ramkanth S., Rajan T.V.S, Gnanaprakash K. (2010).** A review on *in vitro* antioxidant methods: comparisions, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research.*, 2(2): 1276-1285.
101. **Killi D., Kavdir Y. (2013).** Effects of olive solid waste and olive solid waste compost application on soil properties and growth of *Solanum lycopersicum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82 : 157-165.
102. **Wiradimadja R., Rusmana D., Widjastuti T., Mushawwir A. (2014).** Chicken slaughterhouse waste utilization (chicken feather meal treated) as a source of protein animal feed ingredients in broiler chickens. *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi*, 62: 120-124.

103. **Gurav R.G., Jadhav J.P. (2013).** A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environ Sci Pollut Res.*, 20(7) : 4532–4539.
104. **Cruz R., Baptista P., Cunha S., Pereira J.A., Casal S. (2012).** Carotenoids of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown on soil enriched with spent coffee grounds. *Molecules*, 17: 1535-1547.
105. **Bettoni M.M., Mogor Á.F., Pauletti V., Goicoechea (2014).** Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. *Scientia Horticulturae*, 180: 227–235.
106. **Ahsan M., Rehman S., Younis A., Riaz A., Tariq U., Waqa R. (2012).** Different strategies to create earliness and enhance quality of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cv. single. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(2): 84-88.
107. **Lopez S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. (2002).** Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, 71: 2521–2529.
108. **Bhuvaneswari S., Deepa S., Sriprya N., Prameela L., Udaya Prakash N.K. (2014).** Antioxidant activity and phytochemistry of various flowers from Tamil Nadu, India. *Intr. J. Res. Pharm. Sci.*, 5(1): 40-45.
109. **Cahlíková L., Valterová I., Macáková K., Opletal L. (2011).** Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(4): 575-580.
110. **Audigié Cl., Figarella J., Zonszain F. (1986).** Manipulations d'analyse biochimique. Ed. DOIN EDITEURS, France, 274p.
111. **Meziti A., Meziti H., Boudiaf K., Benboubetra M., Bouriche H. (2012).** Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of *Nigella Sativa* Seed Extracts *In Vitro* and *In Vivo*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 1(6): 24-32.
112. **Chaudhary V., Kumar M. (2017).** Effect of harvesting time of flowers on concrete and absolute recovery in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.): A comparative study of single and double Petalled cultivars. *International Journal of Chemical Studies*, 5(4): 1416-1420.

113. **Bouriche H., Karnouf N., Belhadj H., Dahamna S., Harzalah D., Senator A.. (2011).** Free radical, metal-chelating and antibacterial activities of methanolic extract of *Capparis Spinosa* buds. *Advances in Environmental Biology*, 5(2): 281-287.
114. **Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M.C., Bousselela H., Oued-Mokhtar S.M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 1-12.
115. **Djarmoni M., Boumerfeg S., Baghiani A., Boussoualim N., Zerargui F., Trabsa H., Belkhiri F., Khennouf S., Arrar L. (2012).** Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of *Peganum harmala* seed extracts. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 3: 1109-1119.
116. **Chaouche T.M., Haddouchi F., Ksouri R., Medini F., Atik-Bekara F. (2013).** *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie*, 11: 244-249.
117. **Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998).** Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799 :101–110.
118. **Tavallali V., Rahmati S., Bahmanzadegan A. (2017).** Antioxidant activity, polyphenolic contents and essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. as affected by zinc fertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14): 4883-4889.
119. **Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S., Arrar L. (2012).** Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of *Teucrium polium* L. Extracts. *Chinese Med.*, 3: 30-41.
120. **Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2007).** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L using a suitable extraction procedure, *Food Chem.*, 100: 584–589.
121. **Le H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.*, 102: 771-776.

122. **Mukesh Kumar D.J., Lavanya S., Priya P. (2012).** Production of Feather Protein Concentrate from Feathers by *In vitro* Enzymatic Treatment, its Biochemical Characterization and Antioxidant Nature. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11 (7): 881-886.
123. **Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., Roupheal Y. (2015).** Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196 : 28-38.
124. **Cruz R., Morais S., Mendes E., Pereira J.A., Baptista P., Casal S. (2014).** Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food Chemistry*, 148: 294–299.
125. **Cervera-Mata A., Pastoriza S., Rufián-Henares J.Á., Párraga J., Martín-García J.M., Delgado G. (2017).** Impact of spent coffee grounds as organic amendment on soil fertility and lettuce growth in two Mediterranean agricultural soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1: 1-15.
126. **Cruz R., Morais S., Mendes E., Pereira J.A., Baptista P., Casal S. (2014).** Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food Chem.*, 148: 294–299.
127. **Selim S.M., Matter F.M., Hassanain M.A., Youssef S.M. (2017).** Response of growth, flowering, concrete oil and its component of *Polianthes tuberosa* L. cv. double to phosphorus fertilizer and gibberellic acid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(9): 1639-1652
128. **Peña-Méndez E.M., Havel J., Patočka J. (2005).** Humic substances . compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedecine*, 3: 13-24.
129. **Ortiz J.E., Berkov S., Pigni N.B., Theoduloz C., Roitman G., Tapia A.1, Bastida J., Feresin G.E. (2012).** Wild argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules*, 17: 13473-13482.
130. **Rumi F, Kuddus M R, Chandra Das S. (2014).** Evaluation of antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, membrane stabilizing and thrombolytic activities of *Polianthes tuberosa* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 4(17): 2106-2115
131. **Snoussi M., Trabelsi N., Dehmeni A., Benzekri R., Bouslama L., Hajlaoui B., Al-sieni A., Papetti A. (2016).** Phytochemical analysis, antimicrobial and

- antioxidant activities of *Allium roseum* var. *odoratissimum* (Desf.) Coss extracts. *Industrial Crops and Products.*, 89:533–542.
132. **Rokbeni N., M'rabet Y., Cluzet S., Richard T., Krisa S., Boussaid M., Boulila A. (2016).** Determination of phenolic composition and antioxidant activities of *Pancratium maritimum* L. from Tunisia. *Industrial Crops and Products.*, 94 : 505-513
133. **Nikolova M., Gevrenova R. (2015).** Determination of phenolic acids in Amaryllidaceae species by high performance liquid chromatography. *Pharmaceutical Biology.*, 3(43): 289–291.
134. **Giordani R.B., Pagliosa L.B., Henriques A.T., Zuanazzi J.A.S. (2008).** Investigaç o do potencial antioxidante e anticolinester sico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). *Quim. Nova.*, 31: 2042-2046.
135. **Ilavenil S., Kaleeswaran B., Ravikumar S. (2010).** Antioxidant and Hepatoprotective activity of lycorine against Carbon tetrachloride-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Der. Pharma. Chemica.*, 2:267-272.
136. **Adewusi E.A., Steenkamp V. (2011).** *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific J. Trop. Med.*, 1:829-835.
137. **Castilhos T.S., Giordani R.B., Henriques A.T., Menezes F.S., Zuanazzi J. .S. (2007).** Avaliaç o *in vitro* das atividades antiinflamat ria, antioxidante e antimicrobiana do alcal ide montanina. *Brazilian J Pharm.*, 17:209-214.
138. **Orhan I.E., Yilmaz B.S., Altun M.L., Saltan G., Sener B. (2011).** Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Appraisal of the Bulb Extracts of Five *Sternbergia* Species. *Rec. Nat. Prod.*, 5:193-201.
139. **Moussa A.M., Emam A.M., Diab Y.M., Mahmoud M.E., Mahmoud A.S. (2011).** Evaluation of antioxidant potential of 124 Egyptian plants with emphasis on the action of *Punica granatum* leaf extract on rats. *International Food Research Journal*, 18: 535-542.
140. **Singh J.P., Kaur A., Singh N., Nim L., Shevkani K., Kaur H., Arora D.S. (2016).** *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. *LWT - Food Sci. Technol*, 65: 1025-1030.
141. **Cikman O., Soylemez O., Ozkan O.F., Kiraz H.A., Sayar I., Ademoglu S., Taysi S., Karaayvaz M. (2015).** Antioxidant activity of syringic acid prevents

oxidative stress in l-arginine-induced acute pancreatitis: an experimental study on rats. *Int Surg.*, 100:891–896.

142. **Shakeel F, Haq N, Raish M, Siddiqui N.A., Alanazi F.K., Alsarra I.A. (2016).** Antioxidant and cytotoxic effects of vanillin via eucalyptus oil containing self-nanoemulsifying drug delivery system. *J. Mol. Liq.*, 218:233–239.
143. **Ganeshpurkar A, Saluja AK. (2017).** The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm. J.*, 25(2):149–164.
144. **Beevi S.S, Narasu M.L., Gowda B.B. (2010).** Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Foods Hum Nutr*, 65: 8-17.
145. **Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C., Abdelly C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2083–2091.