



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلم  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Microbiologie**

قسم : الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes**

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Screening phytochimique des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv.  
et évaluation de leur activité antibactérienne**

---

**Présenté par :** Bouziane Sara Nihel

**Le :** 13/06/2024

Madani Amani

**Jury d'évaluation :**

**Présidente :** BENSARI Souheir (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrante :** OUELBANI Rayene (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examinatrice :** MERIANE Ilhem (MAA- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire 2023 - 2024**

# ***Remerciements***

## Remerciement

---

Nous remercions **ALLAH** le Tout-Puissant pour Sa guidance, Sa force, la santé et la volonté qu'Il nous a accordées, et qui nous ont permis d'entamer et d'achever ce mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **Mme Ouelbani Rayene** pour son aide et son encadrement précieux. Ce travail n'aurait jamais atteint une telle richesse sans son accompagnement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité tout au long de la préparation de ce mémoire. Son aide et ses encouragements ont été inestimables.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants, membres du personnel de l'université qui ont été gentils et bienveillants avec nous et qui nous ont permis ainsi d'atteindre le niveau scientifique nécessaire pour la réalisation de ce travail, sans oublier les ingénieurs du laboratoire de biochimie au CRBt, ainsi, nos remerciements les plus profonds se dirigent vers monsieur Bensouici, de nous avoir donné l'opportunité de manipuler au sein de ce laboratoire en sa qualité de directeur de recherche.

# Dédicaces

## Dédicaces

---

Je dédie ce travail à mes chers parents et à **ma famille**, dont l'amour et le soutien ont été la source de ma force et de ma détermination.

**À maman**, qui est tout pour moi et signifie le monde entier. Ton amour et tes encouragements constants m'ont donné la force d'avancer. Tu es ma lumière et ma plus grande inspiration.

**À mon père**, dont l'amour et les innombrables sacrifices m'ont permis d'avancer dans la vie, je dois ce succès et cette avancée.

**À mes sœurs, Mouna, Maya et Rayane**, pour leur tendresse infinie et leur compréhension. Vos encouragements, vos sourires et votre présence ont illuminé les moments les plus sombres et m'ont donné la force de persévérer.

**À mes frères, Nassim et Yasser**, pour leur camaraderie, leur soutien constant et leur humour.

**À mes neveux, Bibers, Amir, les jumeaux Djoud et Djawed, Kinan et Tamim, et surtout à mon petit neveu Kamil, ainsi qu'à ma nièce Ayla**, pour les éclats de rire et les moments de pur bonheur que vous m'avez apportés. Vous êtes la joie de ma vie.

**À mes amis, Attef, Nada, Badidou, Fedoua, Dounia, Dina, Kawther, Israa et Kawter**, pour leur amitié sincère, leur soutien indéfectible et leur présence à chaque étape de ce voyage. Vous avez enrichi ma vie et rendu ce parcours mémorable.

**Amani**

## Dédicaces

---

Du profond de mon cœur. Je dédie ce travail à tous qui me sont chers.

À **mes chers parents**, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect. Mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés. Le fruit de vos innombrables sacrifices

A ma grande soeur **Nedjla** qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études

À mon adorable petite soeur **Racha** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

À **mon fiancé** ma source de motivation, mon refuge dans les moments de doute .Avec toi à mes côtés, chaque défi devient une opportunité et chaque victoire devient une célébration. Merci pour ton amour infini et ton soutien inconditionnel.

A tous les membres de **ma grande famille, mes cousines et mes amis**

À mon petit ange **Racim**

À mon encadrante **Mme Ouelbani Rayene**

Sans oublier mon binôme **Amani** pour son soutien moral sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

À tout ce qui ont participé à ma réussite et a tous qui m'aiment.

**Sara Nihel**

# Liste des figures

<b>Fig 1.</b> photo in situ de l'espèce <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm & Viv.....	3
<b>Fig 2. a.</b> Anatomie de la tige d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	4
<b>b.</b> anatomie des feuilles d' <i>Asphodelus microcarpus</i> .....	4
<b>Fig 3.</b> Composants fondamentaux de l'acide cinnamique (a) et Acide benzoïque (b) .....	8
<b>Fig 4.</b> La structure d'une molécule de coumarine.....	9
<b>Fig 5.</b> La structure de base d'un flavonoïde.....	9
<b>Fig 6.</b> Structure chimique de : a- tanins condensés et b- gallotanin .....	11
<b>Fig 7.</b> Structure d'un isoprène .....	12
<b>Fig8.</b> Structure de saponines.....	13
<b>Fig 9.</b> Les différentes façons dont les gènes de résistance (R) sont acquis.....	17
<b>Fig 10.</b> Méthode de microdilution.....	19
<b>Fig 11.</b> Méthode de diffusion sur disque.....	20
<b>Fig 12.</b> Lieu de récolte des rhizomes de la plante <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv....	23
<b>Fig 13.</b> Schéma d'extraction de la plante <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv.....	25
<b>Fig 14.</b> Ampoule à décanter contenant les deux phases (aqueuse et organique).....	26
<b>Fig 15.</b> Plaques de silice pour CCM.....	28
<b>Fig 16.</b> Plaques CCM préparées.....	28
<b>Fig 17.</b> Cuve de chromatographie.....	29
<b>Fig 18.</b> Schéma de la préparation des dilutions d'acide gallique.....	32
<b>Fig 19.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	32
<b>Fig 20.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	33
<b>Fig 21.</b> Hotte microbiologique.....	35
<b>Fig 22.</b> Préparation des boîtes de Pétri.....	35
<b>Fig 23.</b> Ensemencement complet en surface pour extraits de plante et antibiotiques.....	36
<b>Fig 24.</b> Schéma de la préparation de la CMI.....	37
<b>Fig 25.</b> Chromatogrammes des trois extraits dans le spectre visible avant révélation dans le système toluène /CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10). a. AcOEt, b. Ether de pétrole MeOH.....	40
<b>Fig 26.</b> Chromatogrammes des trois extraits sous UV 365 nm avant révélation dans le système toluène /CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10). a. AcOEt, b. Ether de pétrole MeOH.....	41
<b>Fig 27.</b> a. Chromatogramme avant chauffage révélé avec KOH éthanolique (10%) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (30/60/10)./b. Chromatogramme avant chauffage révélé avec le révélateur KOH éthanolique (10%) sous UV 365nm dans le	



système toluène /CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10). Ac : AcOEt, E : éther de pétrole, M : MeOH .....	41
<b>Fig 28.</b> a. Chromatogramme après chauffage révélé avec KOH méthanolique (10%) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10). /b. Chromatogramme après chauffage révélé avec le révélateur KOH méthanolique (10%) sous UV 365 nm dans le système toluène /CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10). Ac : AcOEt, E : éther de pétrole, M : MeOH .....	42
<b>Fig 29.</b> a. Chromatogramme révélé avec AlCl <sub>3</sub> éthanolique (2%) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme révélé avec AlCl <sub>3</sub> éthanolique (2%) sous UV-365nm dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH (20/70/10).....	42
<b>Fig 30.</b> Chromatogramme avant chauffage révélé par ethanol/acide sulfurique (9/1) (v/v) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme après chauffage révélé par éthanol/acide sulfurique (9/1) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10).....	43
<b>Fig 31.</b> Chromatogramme révélé par FeCl <sub>3</sub> éthanolique (1%) en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10).....	43
<b>Fig 32.</b> Chromatogramme après chauffage révélé par le réactif de Dragendorff en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10).....	44
<b>Fig 33.</b> a. Chromatogramme lors de l'ajout de Folin-Ciocalteu révélé en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme révélé par NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10).....	45
<b>Fig 34.</b> a. Chromatogramme avec chauffage révélé par la vanilline sulfurique dans le spectre visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme avec chauffage révélé par la vanilline sulfurique en visible dans le système toluène/CHCl <sub>3</sub> /MeOH : (20/65/15). M : MeOH, Ac : AcOEt, E : Ether de pétrole....	45
<b>Fig 35.</b> Teneur en polyphénols des différents extraits .....	46
<b>Fig 36.</b> Teneur en flavonoïdes des différents extraits.....	47
<b>Fig 37.</b> Activité antibactérienne des extraits AcOEt et MeOH contre <i>Escherichia coli</i> .....	49
<b>Fig 38.</b> Activité antibactérienne des extraits AcOEt et MeOH contre <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	50

# Liste des tableaux

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.</b> Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action.....	16
<b>Tableau 2.</b> Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM.....	28
<b>Tableau 3.</b> Métabolites révélés par KOH.....	30
<b>Tableau 4.</b> Détection des phytoconstituants par différents révélateurs.....	38
<b>Tableau 5.</b> Activité antibactérienne des extraits de l'espèce <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv. à différentes concentrations et celle des antibiotiques utilisés contre les diverses souches bactériennes, exprimée en termes de diamètre d'inhibition.....	48
<b>Tableau.6.</b> Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de la plante <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. & Viv. vis-à-vis de diverses souches bactériennes.....	52

# Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl<sub>3</sub> : Chloride d'Aluminium

*B. subtilis* : *Bacillus subtilis*

C : Concentration Molaire

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH<sub>3</sub>-COOK : Acétate de Potassium

CHCl<sub>3</sub> : Chloroforme

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

D : Dilution

Da : Dalton

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMSO : Diméthylesulfoxyde

DT2 : diabète de type 2

*E. coli* : *Escherichia coli*

E. test : Epsilometer test

ESI : Électrospray Ionization

FCR : Folin-Ciocalteu

FeCl<sub>3</sub> : Chloride de Fer

H<sub>3</sub>PM012040 : Acide Phosphomolybdique

H<sub>3</sub>PW12040 : Acide Phosphotungstique

HCl : Chlorure d'Hydrogène

KOH : Hydroxyde de Potassium

La CMB : concentration minimale bactéricide

LC : Chromatographie liquide

LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

Le HT : tanins hydrolysables

MeOH : Méthanol

MH : Mueller Hinton

MosO<sub>23</sub> : Molybdène

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

MS : Spectrométrie de masse

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sulfate de Sodium

NaCO<sub>3</sub>:Carbonate de Sodium

NaNO<sub>2</sub> : Nitrite de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NH<sub>3</sub> : Ammoniac

NH<sub>4+</sub>:Ammonium

nm Nanomètre

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

Rf : Rapport frontal

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SD : Standard Deviation (Écart Type)

SM : Solution Mère

UFC : Unités Formant Colonies

UV : Ultra-Violet

V : Volume

WsO<sub>23</sub>: Oxyde de Tungstène

# **Table des matières**

# Table des matières

---

## Remerciement

## Dédicaces

## Liste des tableaux, des figures et des abréviations

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

## Partie théorique

### Chapitre 01 : Description de la plante

I-Nomenclature .....	2
II- Distribution géographique .....	2
III- Description botanique .....	2
III-1-description morphologique .....	2
III-2- Description anatomique .....	3
IV-Composition chimique .....	4
V-Utilisation .....	4
V-1-utilisation de la vie quotidienne .....	4
V-2-Utilisation médicinale .....	5
VI-Etude antérieure .....	5

### Chapitre 02 : les métabolites secondaires

I-généralité sur les métabolites secondaires.....	7
I-1- les composés phénoliques .....	7
I-1-1- Les phénols simples (C6) .....	7
I-1-2-Les phénols complexes .....	9
I-2- Terpènes .....	11
I-3-Quinones .....	13

### Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes

I- Généralités .....	15
II- Les antibiotiques .....	15
II-1- Définition .....	15
II-2- Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action.....	15
II-3- La résistance bactérienne aux antibiotiques .....	17
III-les méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	18
III-1-Methodes de dilution .....	18
III-1-1- la Concentration Minimale inhibitrice (CMI) .....	18
III-1-2- Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	19
III-2- les méthodes de diffusion .....	20
III-3- Test de bioautographie sur CCM .....	20
III-4- E.test .....	21

## Partie expérimentale

### Matériel et méthodes

I- Extraction et screening phytochimique .....	22
II- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	31
II-1- Dosage des polyphénols .....	30
II.2 Dosage des flavonoïdes.....	33
III- Activité antibactérienne .....	34
III-1- Matériel et équipement .....	34
III-2- Méthode de diffusion sur milieu gélosé .....	34
III-3- Antibiogramme .....	37
IV- Concentration Minimale Inhibitrice sur milieu liquide .....	37
IV-1- Préparation du bouillon nutritif .....	37
IV-2- Mode opératoire .....	37

### Résultats et discussion



## **Table des matières**

---

I- Screening phytochimique sur plaque CCM .....	38
II- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes .....	46
II-1- Teneur en polyphénols totaux .....	46
II-2- La teneur en flavonoïdes .....	47
III- Activité antibactérienne .....	48
III-1- Antibiogramme .....	51
III-2- Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide .....	51
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	57
<b>Références bibliographiques</b> .....	58
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

# **Introduction**

## **Générale**

# Introduction Générale

---

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65 à 80% de la population mondiale dans les pays en développement manque d'accès à la médecine moderne à cause de la pauvreté et dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Malgré les avancées significatives en chimie organique de synthèse au cours du vingtième siècle, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés trouvent leurs origines, qu'elles soient immédiates ou dérivées, dans les plantes. (Newman et al., 2000 ; Calixto, 2005).

Les constituants bioactifs essentiels des plantes médicinales incluent les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, les anthraquinones et les composés phénoliques. Ces substances jouent un rôle crucial dans les propriétés thérapeutiques des plantes et sont largement étudiées pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. (Liu et al., 2011).

Dans ce contexte, le présent travail vise à la valorisation phytochimique de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. appartenant à la famille des Asphodelaceae rencontré au niveau du bassin méditerranéen notamment en Algérie, pour ce faire ce travail vise à faire un screening de différents métabolites secondaires et à déterminer ses propriétés antibactériennes.

Pour cela, nous avons structuré notre travail comme suit :

La première partie a été consacrée à des généralités et données bibliographiques. Le premier chapitre abordera une description portant sur l'étude bibliographique de l'espèce *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. (Asphodelaceae). Le deuxième chapitre sera consacré aux métabolites secondaires et leurs rôles biologiques. Cependant Le troisième chapitre comprend des généralités sur l'activité antibactérienne

Quant à La deuxième partie, elle comprend la partie pratique de nos travaux repartie entre la partie matériel et méthodes et la présentation et la discussion des résultats de l'étude phytochimique et antibactérienne de la plante en considération.

# **Partie théorique**

**Chapitre 01 :**

**Description de la**

**plante**

## I-Nomenclature

Le terme "*Asphodelus*" provient du mot grec "*Asphodelos*" qui signifie le fer de lance ou une pique son nom précis *Microcarpus* désigne les fruits à petites tailles.

- **Nom commun** : *Asphodèle* désigné par les anglophones 'Branched Asphodel'
- **Nom latin** : *Asphodelus microcarpus*
- **Famille** : *Asphodelaceae* (Alain et al.,2010)
- **Synonyme** : *Asphodelus ramosus* L
- **Nom vernaculaire** : berwag, îgri, îmegri, blîluz, âbliluz (Natacha, 2006 ; Hosni et al.,2020).

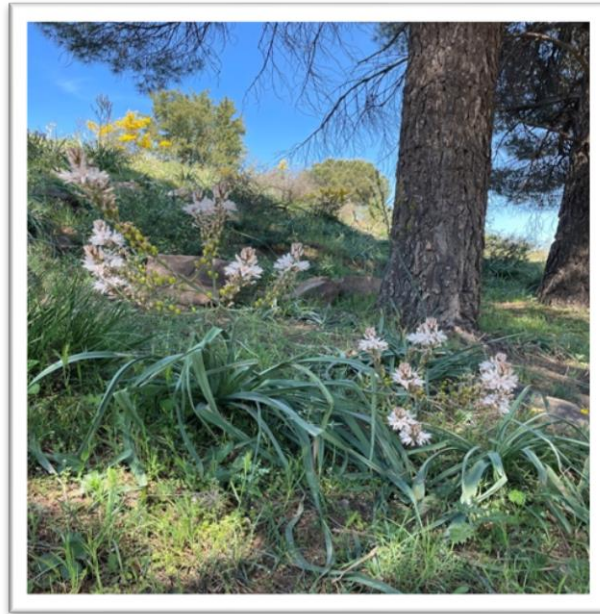
## II- Distribution géographique

Cette espèce se développe dans les régions sableuses et rocailleuses autour du bassin méditerranéen, dans des régions peu irriguées et moyennement arrosées, principalement dans les forêts du Nord de l'Afrique, en Tunisie, en Algérie, en Syrie et sur les côtes de l'Asie-Mineure (Mersina, Adalia, Smyrne, Constantinople) (Gay, 1857 ; Hosni et al.,2020).

## III- Description botanique

### III-1-description morphologique

La plante *Asphodelus microcarpus* salzm & Viv se caractérise par des fleurs qui peuvent être blanches ou de couleur carnée, et mesurent jusqu'à 15 mm de longueur maximum. Les tépales ont une forme carénée, avec une carène de couleur verte ou pourpre. Les capsules, de forme oblongue, ovoïde ou subglobuleuse, ont une longueur comprise entre 6 et 14 mm. Leurs valves sont distinctement ridées transversalement lorsqu'elles sont sèches (Quezel, 1962 ).



**Figure 1.** Photo in situ de l'espèce *Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv.

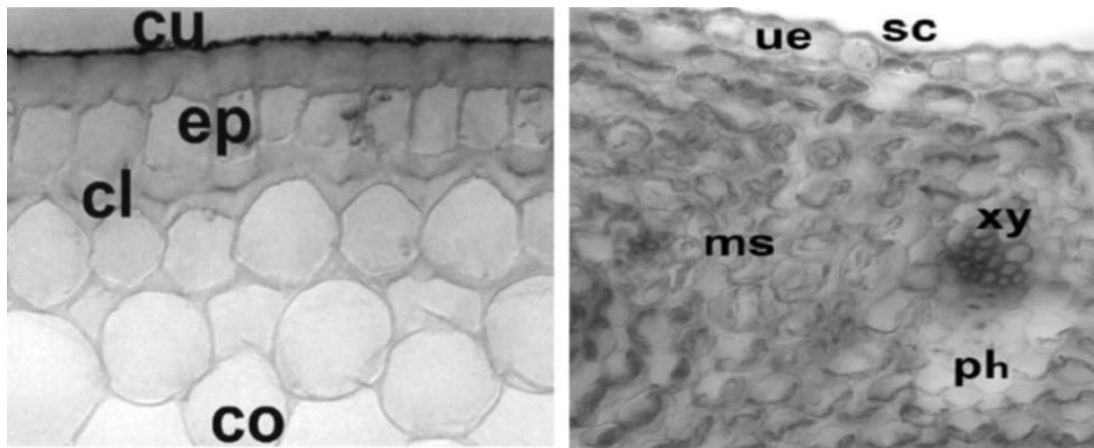
### **III-2- Description anatomique**

#### **➤ la tige**

L'épiderme d'*Asphodelus microcarpus* est une cuticule de 9,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avec des cellules ovariennes ou sphénoïdes, le cortex contient du collenchyme monocouche et des cellules parenchymateuses sphénoïdes, et les ensembles vasculaires varient, dont le xylème et le phloème (Majeed, 2014).

#### **➤ Les feuilles**

La feuille possédait des deux côtés un épiderme monocouche, l'épiderme supérieur étant plus épaisse. Celles épidermiques orbiculaires, mésophylle unifacial, composé de 10 à 12 couches de cellules de parenchyme ronde. L'ensemble des faisceaux vasculaires était placé sur une rangée, le xylème étant situé à la surface supérieure et le phloème à l'épiderme inférieur. La feuille avait une forme amphistomatique et était de type stomate anomocytique. (Majeed, 2014)



**Figure 2.** A-Anatomie de la tige d'*Asphodelus microcarpus* : cu :cuticule, ep : epiderme, cl : collenchyme, co :cortex

B-anatomie des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* : stoma cell,ue : upper epidermis, xy :xylem, ms :mesophyll, ph :phloem

#### **IV-Composition chimique**

Le tubercule de la racine de l'Asphodèle contient des alcaloïdes (choline, Stachydrin) et des anthraquinones (principalement de l'Asphodeline). En outre, la graine est riche en stérols. (FOURNIER P, 1947).

En analysant les sucres libres, on a pu constater la présence de raffinose, de saccharose, de glucose et de fructose, Les éléments présents dans le mucilage sont le glucose, le galactose et l'arabinose. La présence d'acides gras oléique, linoléique, linoléinique, myristique, palmitique, stéarique, arachidique, béhénique et lignocérique a été identifiée par des analyses chromatographiques en couche mince et gaz-liquide (Hammouda et al., 1970).

#### **V-Utilisation**

##### **V-1-utilisation de la vie quotidienne**

La racine tubéreuse riche en amidon était autrefois utilisée pour la panification. Les tiges séchées de cette plante sont employées comme fourrage pour le bétail et comme matériau pour la fabrication d'objets. De plus, les feuilles fraîches étaient traditionnellement utilisées pour repousser les moustiques. En Turquie et en Égypte, la poudre de ses tubercules,



contenant naturellement de la gomme, est respectivement utilisée par les relieurs et les cordonniers comme substitut de la colle. (Hammouda et al., 1970 ; Natacha, 2006).

## **V-2-Utilisation médicinale**

En Algérie, différentes parties de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. sont utilisées à des fins médicinales, en effet la poudre des parties aériennes est employée pour traiter les problèmes de peau, tandis que la décoction des fruits est utilisée pour les affections rénales, le rhumatisme, les douleurs buccales et les maux de dents, ainsi que pour les affections respiratoires. En Jordanie, les rhizomes de la plante sont utilisés en décoction comme carminatif et pour traiter la jaunisse, tandis que des cataplasmes de rhizomes sont utilisés pour favoriser la cicatrisation. En Syrie, malgré la toxicité de la plante, le jus d'*Asphodelus microcarpus* est utilisé pour traiter le lichen cutané et possède des propriétés médicinales potentielles tels que des effets anticancéreux, antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux, antifongiques et antibactériens (Dioguardi et al., 2019 ; Ouasti et al., 2023).

## **VI-Etude Antérieure**

El-Ghaly et al., (2017) ont examiné les propriétés phytochimiques et biologiques des feuilles d'*Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv., mettant en lumière les composés chimiques présents tels les alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des saponines, des terpénoïdes et leurs éventuelles influences sur diverses activités biologiques, Di Petrillo et al., (2016) ont étudié les caractéristiques inhibitrices et antioxydantes des métabolites contenus dans les extraits d'*Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv., tels que des flavonoïdes, des polyphénols, des tanins, des acides phénoliques, Abosedera et al. (2022) ont découvert les composants d'*Asphodelus microcarpus* tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpénoïdes, des polyphénols et leur capacité à affecter les cellules du mélanome A375, ce qui suggère qu'*Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv. pourrait être un potentiel agent anticancéreux contre ce type de cancer, Dans leur recherche de 2019, Alhage et Elbitar ont réalisé une étude *in vitro* sur les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits bruts de trois plantes médicinales libanaises y compris l'espèce qu'*Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv., et on mis en évidence certains composés, tels que des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des terpénoïdes, démontrant ainsi leur potentiel en tant que sources d'antioxydants et d'agents antimicrobiens. En Turquie, Peksel et al., (2011) ont étudié le potentiel antioxydant et antifongique contre trois espèces à savoir: *Candida albicans*, *Aspergillus* spp , *Fusarium* spp. de la plante *Asphodelus aestivus* Brot. Selon Ghoneim et al., (2014), les

asphodosides A-E, qui sont des métabolites isolés de *l'Asphodelus microcarpus* Salzm & Viv., et qui ont été identifiés et caractérisés puis testés pour leur activité anti-MRSA montrant leur potentiel pour combattre les infections causées par les souches résistantes de *Staphylococcus aureus*. Selon Khalfaoui et al., (2021) une analyse phytochimique réalisée sur des extraits organiques de *l'Asphodelus tenuifolius* (Cav.) d'Algérie parmi ceux-ci, on peut s'attendre à trouver des flavonoïdes, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des polyphénols, des acides phénoliques, des saponines, des stéroïdes, caractérisés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode électrospray ionisation (LC-ESI/MS), démontrant les effets antioxydants, antibactériens, antifongiques, antiviraux et pharmacologiques *in silico* des extraits organiques que contient cette plante. Kitaz, (2017) a effectué une comparaison entre les niveaux de phénols totaux, de flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de racines *d'Asphodelus microcarpus* qui pousse en Syrie. Enfin l'étude de Alkayali et al., (2016), examinant l'efficacité antibactérienne des extraits *d'Asphodelus microcarpus* tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les tanins, les saponines contre des isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline, suggérant ainsi leur potentiel pour traiter les infections causées par le MRSA.

***Chapitre 02 :***  
***Les métabolites***  
***secondaires***

# Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire

---

## I-généralité sur les métabolites secondaire

Les métaboliques secondaires se trouvent dans les plantes, contrairement aux métabolites primaires comme les protéines, les glucides et les lipides. Ces substances varient d'une espèce à une autre et sont liées aux interactions des plantes avec les organismes vivants. Ils jouent un rôle crucial dans l'évolution des plantes, impliquant des interactions avec des parasites, des agents pathogènes, des prédateurs, des pollinisateurs et des disséminateurs, conduisant à une diversification significative des composés. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs groupes : composés phénoliques, terpènes et composés azotés, en particulier alcaloïdes, qui présentent chacun une grande diversité de composés et une gamme d'activités dans la biologie humaine (Krief, 2003).

### I-1- composés phénolique

Les composés phénoliques ont un cycle aromatique, avec un ou plusieurs substituants hydroxyle, et peuvent varier de molécules phénoliques simples à des composés hautement polymérisés. En dépit de cette variété structurelle, ce groupe de composés est couramment désigné sous le nom de polyphénols (Balasundram et al., 2006).

#### I-1-1- phénols simples (C6)

##### ➤ *Acides phénoliques*

Il s'agit de composés organiques ayant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Deux sous-classes sont représentées : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Achat, 2013).

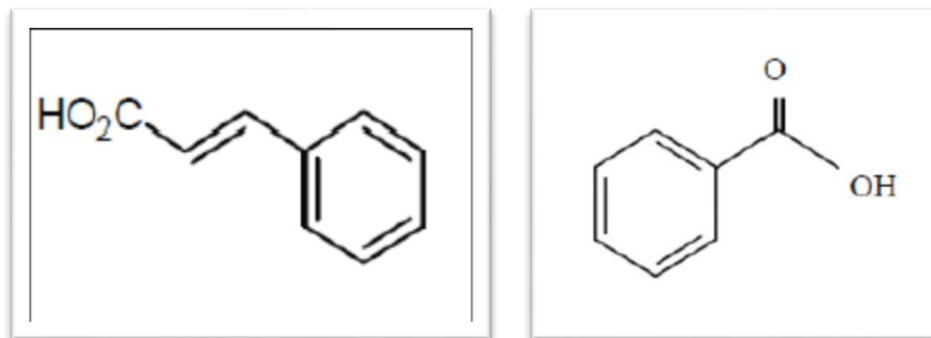
##### ➤ *L'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)*

On retrouve ces acides à la fois sous forme libre et combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides. Cette catégorie est présente dans de nombreuses plantes et aliments. Les deux dérivés les plus courants de l'acide hydroxybenzoïque sont l'acide vanillique et l'acide gallique.

##### ➤ *L'acide hydroxycinnamique (C6-C3)*

Ces substances ont une répartition extrêmement étendue. Souvent estérifiés, ils peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols (acide quinique). Cette catégorie est principalement constituée d'acide caféique.

## Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire

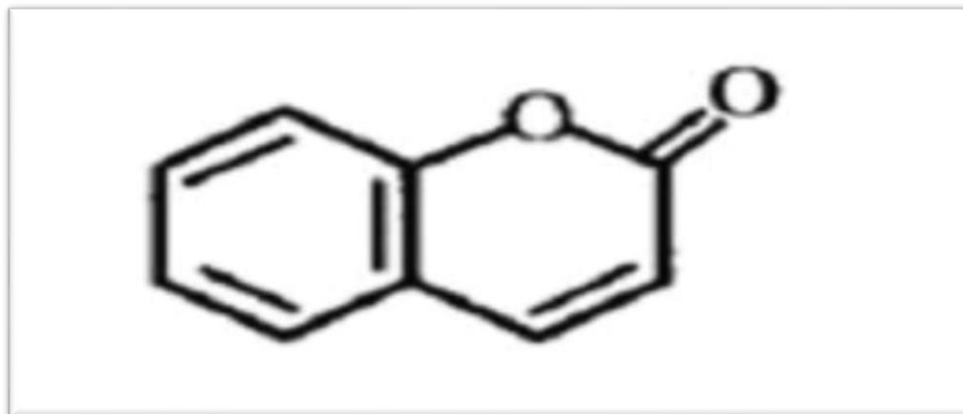


**Figure 3.** Composants fondamentaux de A-l'acide cinnamique B- Acide benzoïque (GORHAM, 1977).

### ➤ *Coumarines*

Les coumarines sont des structures hétérocycliques oxygénées basées sur le benzo-2-pyrone. Pour la première fois, Vogel les a isolés en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. De nos jours, on peut identifier près de 1000 composés coumariniques dans plus de 800 espèces de plantes. (François, 2010). Par cyclisation interne de la chaîne latérale, les coumarines sont dérivées des acides hydroxycinnamiques., elles jouent un rôle biologique. Elles peuvent être rencontrées dans la nature soit à l'état simple, soit en substitution par des sucres. Ces substances sont à l'origine de l'arôme distinctif du foin, Les coumarines, lors de leur hydroxylation en position 7, peuvent être méthylées ou liées dans une liaison hétérosidique. Chez certaines espèces végétales, la prénylation de l'azote benzénique entraîne la formation de furano et de pyranocoumarines, qui sont des agents phototoxiques. Le bergaptène 7 est employé en raison de ses caractéristiques photodynamiques pour traiter le psoriasis, tandis que certaines coumarines sont employées dans les produits solaires (Krief, 2003).

## Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire

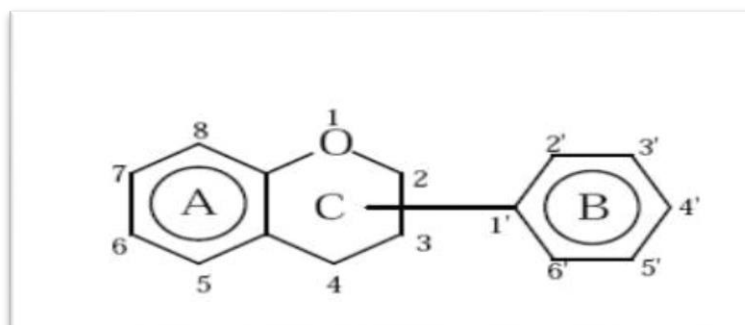


**Figure 4.** Structure de base d'une coumarine (COWAN, 1999).

### I-1-2- Les phénols complexes

#### ➤ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des éléments de faible poids moléculaire, composés de quinze atomes de carbone, disposés en C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>. La structure se constitue principalement de deux cycles aromatiques A et B, reliés par un pont à 3 carbones, habituellement sous la forme d'un hétérocycle C. Le cycle aromatique A provient de la voie acétate/malonate, tandis que le cycle B provient de la voie shikimate de la phénylalanine. Les différentes formes de substitution du cycle C conduisent aux classes principales de flavonoïdes, à savoir les flavonols, les flavones, les flavanones et les flavanols (Balasundram et al., 2006).



**Figure5.** Structure de base d'un flavonoïde (Pengelly, 2004).

Les flavonoïdes jouent un rôle crucial dans la physiologie des plantes et leurs interactions avec l'environnement. Leur contribution à la coloration des plantes et à l'attraction des pollinisateurs est essentielle pour assurer la pollinisation et la protection contre les

## **Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire**

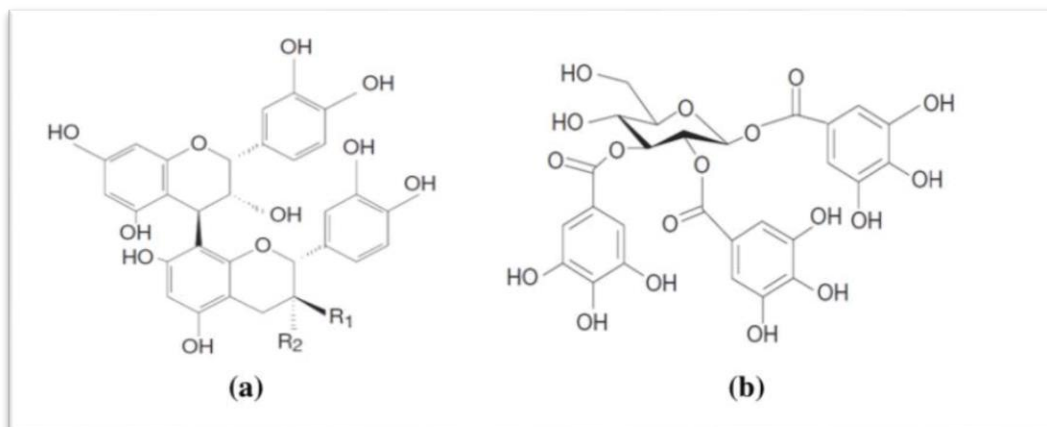
---

insectes grâce à leur odeur désagréable. De plus, ils régulent la croissance et le développement des plantes en interagissant avec diverses hormones de croissance, tout en produisant des phytoalexines pour combattre les infections parasitaires ou bactériennes. Sur le plan thérapeutique, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs puissants effets antioxydants, inhibant la production de radicaux libres par l'enzyme. Leur potentiel comme anti-viraux, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreux, soulignant leur importance croissante dans la recherche et dans la médecine contemporaine (Marfak, 2003).

### ➤ **Tanins**

Les tanins sont des composés végétaux secondaires solubles dans l'eau, appartenant aux composés phénoliques avec une masse moléculaire variant entre 300 et 3000 Da. Ils sont capables de précipiter des alcaloïdes, des glycérols et d'autres protéines. Des recherches récentes ont identifié des tanins plus volumineux avec des masses moléculaires atteignant jusqu'à 2 000 Da, étendant ainsi la diversité de ces composés. Les tanins sont classés en hydrolysables (HT) contenant des galliques et des hexahydroxydiphényles, et en condensés, formés d'oligomères et de polymères. Ils sont présents dans diverses parties végétales comme les épis, l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les galles. Ils jouent un rôle crucial dans la protection des plantes contre les microbes, les insectes et l'activité animale. Les tanins possèdent des propriétés bénéfiques pour le traitement des inflammations cutanées, des lésions superficielles, et pour potentiellement prévenir les maladies chroniques. Bien que leurs effets biologiques aient été largement étudiés *in vitro* et chez l'animal, les données cliniques chez l'homme restent limitées (Sieniawska, 2017). En médecine, les plantes riches en tanins sont utilisées pour leur capacité à se lier aux protéines, offrant des effets antidiarrhéiques et vasoconstricteurs, ainsi qu'une réduction de la perte de fluides. De plus, ils sont utilisés en application externe pour favoriser la cicatrisation des blessures superficielles et des brûlures, et sont couramment employés comme agents astringents et hémostatiques dans le traitement des dermatoses (Krief, 2003).

## Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire



**Figure 6.** Structure chimique de a- tanins Condensés et b- gallotannin (Achat, 2013).

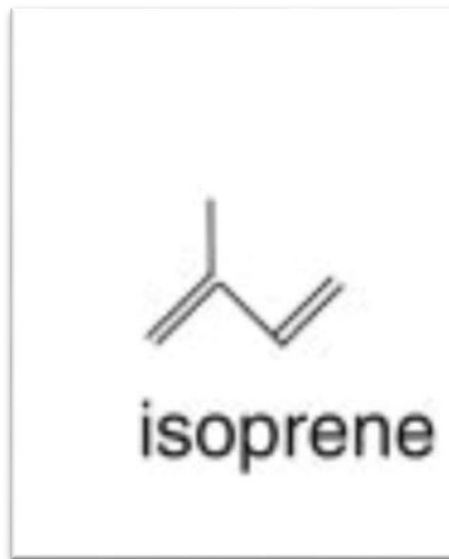
### I-2- Terpènes

C'est une grande catégorie de métabolites secondaires. Les terpénoïdes sont des hydrocarbures naturels leur unité de base isoprène est composée de cinq atomes de carbone (Figure 7). Elles sont présentes dans toutes sortes de plantes et dans certains insectes et organismes marins, aromatisant les plantes et les fleurs. Le terme « terpène » est dérivé du terme térébenthine, un composé oléorésine de conifère. On classifie les terpénoïdes en fonction du nombre d'unités isoprène présentes dans le noyau parent. Il est difficile de classer leurs profils d'activité biologique en raison de leur diversité. L'artémisinine, un endoperoxyde de sesquiterpènes, est cependant un médicament antipaludique puissant à haute activité. Les effets biologiques/pharmacologiques/thérapeutiques de certains diterpénoïdes sont bien connus, tels que les ginkgolides, les gibbérellines, les esters de phorbol et le paclitaxel. Les acides ginsénoïdes, bétulinique, brusatol et boswellique sont des triterpénoïdes biologiquement actifs. Les caractéristiques intéressantes et les activités biologiques variées de nombreux autres terpénoïdes rendent difficile la proposition d'un traitement complet pour tous les groupes (Mabou, 2021). Ces éléments bioactifs ont une activité hypoglycémiant bien connue. Un triterpénoïde saponine présente un effet similaire à celui de l'insuline, ce qui entraîne une activité hypoglycémiant, en particulier dans le dt2 in vitro. (Roni, 2017).



## Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire

---



**Figure 7.** Structure d'un isoprene (sharkey, 2001).

### ➤ Saponines

Les saponines sont des substances bioorganiques naturelles qui possèdent au moins une liaison glycosidique (liaison C-O-sucre) en C-3 entre un aglycone et une chaîne de sucre. La molécule de saponine se décompose en deux parties, un aglycone et un fragment de sucre. Le poids moléculaire des saponines solides amorphes isolées est élevé et la partie non saccharidique est composée de 27 à 30 atomes de carbone. Les activités antioedémateuses, antiphlogistiques, veinotoniques, expectorantes et broncholytiques sont les principales utilisations thérapeutiques des médicaments à base de saponine. Plusieurs revues ont signalé le développement de nouvelles techniques chromatographiques et spectroscopiques et de nouveaux systèmes de tests biologiques ont permis d'accroître considérablement le nombre de saponines végétales biologiquement actives bien définies (Lacaille, 2000 ; Aziz et al., 2020).

## Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire

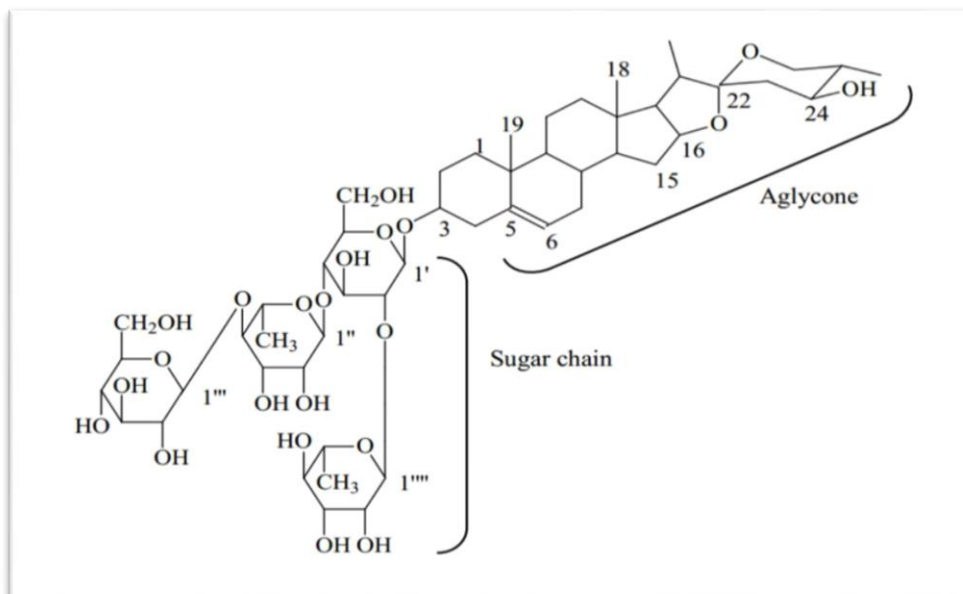


Figure 8. Structure de saponines (Moghimpour, 2014).

### I-3-Quinones

Les quinones sont obtenues par oxydation de dérivés aromatiques avec un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique(para-quinones)ou1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Krief, 2003).

La dione peut être associée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphthalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone).De nombreuses naphtoquinones, telles que la juglone 24, possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques, ce qui permet, par exemple, à certains bois tropicaux de faire face aux attaques des micro-organismes. On décrit des activités antiprotozoaires et antivirales. De plus, certaines quinones présentent une forte capacité d'allergène, ce qui peut entraîner des dermatites et des réactions prurigineuses. (Krief, 2003).

#### ➤ Anthrone, anthranol et dérivés anthracéniques

L'antrone, aussi appelé 9,10-dihydro-9-anthracénone selon la nomenclature IUPAC, est un composé organique représenté par la formule chimique  $C_{14}H_{10}O$  (Blohm, 1997). Les dérivés d'antrone, similaires aux anthraquinones mais avec un groupe alcène substitué, montrent également une forte activité antitumorale in vitro (Roma, 2020). l'anthranol aussi appelé anthracen-9-ol utilisés pour traiter ou prévenir les troubles cutanés ou pour les soins

## **Chapitre 02 : Les Metabolites Secondaire**

---

courants de la peau (National Center for Biotechnology Information, 2024). Les dérivés anthracénique aussi appelé anthracène. L'exposition à l'anthracène peut avoir des effets toxiques sur les organismes vivants (National Center for Biotechnology Information, 2024).

***Chapitre 03 :***  
***Evaluation***  
***de l'activité***  
***antibactérienne***

# **Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes**

---

## **I-Généralités**

Tout au long de sa vie, l'humain est exposé à des micro-organismes qui envahissent progressivement son organisme. Pour lutter contre ces micro-organismes, diverses stratégies sont employées, notamment les obstacles anatomiques, les mécanismes de résistance naturels et l'immunité acquise. L'antibiothérapie est principalement utilisée pour traiter les infections bactériennes, mais une utilisation excessive peut conduire à la sélection de souches multirésistantes (Kaufmann, 1997 ; Billing, 1998 ; Cowan, 1999).

## **II- Les antibiotiques**

### **II-1- Définition**

Les antibiotiques représentent des substances synthétisées par des microorganismes ou par synthèse chimique qui ont une activité bactériostatique ou bactéricide à faible dose. (Mammeri, 2013).

### **II-2- Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action**

Il y a plus de 15 catégories d'antibiotiques qui, grâce à leur grande diversité chimique et structurale, ont un impact sur les bactéries à différents degrés, (Tableau 1) (Poli, 2018).

## Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes

Tableau1. Les principales classes d'antibiotiques et leurs modes d'action

Classe	Organisme d'origine	Mode d'action	Exemple
<b>Origine naturelle</b>			
<b>β-lactames de 1ère génération</b>	<i>Penicillium notatum</i>	Inhibiton de la synthèse du peptidoglycane via blocage des transpeptidases	Pénicilline
<b>β-lactames de 2ème génération</b>	<i>Penicillium verisimilum</i>		Céphalosporine
<b>Macrolides</b>	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Fixation sur l'ARN 23 S de la sous-unité ribosomique 50 S : blocage de l'élongation peptidique pendant la traduction	Erythromycine
<b>Phénylpropanoïdes</b>	<i>Streptomyces venezuelae</i>		Chloramphénicol
<b>Tétracyclines</b>	<i>Streptomyces</i>	Fixation sur la sous-unité ribosomique 30 S : blocage de la traduction	Tétracycline
<b>Aminoglycosides</b>	<i>Streptomyces ou Micromonospora</i>	Fixation sur la sous-unité ribosomique 30 S : blocage en partie de la traduction + erreurs de lecture	Streptomycine
<b>Origine synthétique</b>			
<b>Sulfamides</b>		Inhibition de la synthèse de l'acide folique entraînant une diminution de laproduction de base des bacteries	Sulfaméthoxazole
<b>Quinolones et fluoroquinolones</b>		Inhibition de la Gyrase bactérienne	Ciprofloxacine

## Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes

### II-3- La résistance bactérienne aux antibiotiques

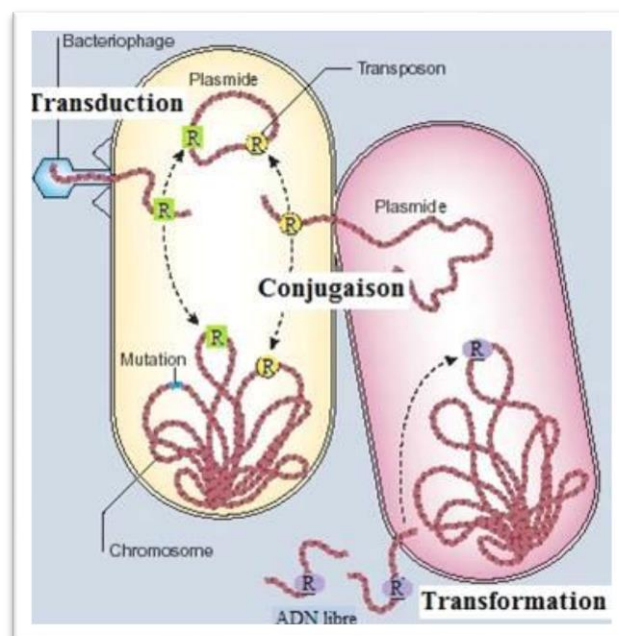
Il existe de nombreux et divers mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques (Poli, 2018).

#### ➤ La résistance innée

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Prenons l'exemple des  $\beta$ -lactames qui empêchent la production du peptidoglycane, qui est le principal constituant de la paroi bactérienne, en l'absence de cet élément constitutif, les bactéries du genre *Mycoplasma sp* sont naturellement résistantes à cette classe d'antibiotiques. Les bactéries ont également la capacité de synthétiser des substances antimicrobiennes telles que la  $\beta$ -lactamase L2 de *Stenotrophomonas maltophilia*.

#### ➤ La résistance acquise

La résistance acquise se produit lorsque seules quelques souches d'une même espèce deviennent résistantes à un antibiotique auquel elles sont initialement sensibles. Le transfert de gène ou la mutation peuvent entraîner l'acquisition de cette résistance.



**Figure 9.** Les différentes façons dont les gènes de résistance (R) sont acquis

# Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes

## III-les méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

### III-1-Méthodes de dilution

#### III-1-1-La concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI correspond à la concentration minimale d'un agent antibactérien, mesurée en mg/L ( $\mu\text{g/mL}$ ), qui dans des conditions in vitro strictement contrôlées, empêche entièrement la croissance visible de la souche test d'un organisme (Kowalska, 2021).

Plusieurs approches sont utilisées :

#### ➤ Test de macrodilution

Le principe fondamental de ce test est identique à celui de l'essai de microdilution de bouillon. Cependant, le test est réalisé dans un tube de test. Au cours du test de macrodilution, un groupe de tubes à essai est utilisé. On prépare différentes quantités d'extrait de plante avec le même volume. Le test des micro-organismes de concentrations standards est effectué sur les tubes. Une fois l'incubation terminée, les tubes sont analysés afin de repérer les variations de turbidité comme signe de croissance (Das et al., 2010).

#### ➤ Test de microdilution

La technique de microdilution sur des plaques de microtitration ou en bouillons est pratique pour évaluer la concentration maximale inhibitrice (CMI) d'un grand nombre d'échantillons. On obtient un mélange de l'extrait dans un solvant DMSO, puis on le dilue dans les plaques de micro-titration avant de transférer un volume équivalent à la solution mère dans la plaque. Il est conseillé d'utiliser les bouillons Mueller Hinton pour les micro-organismes peu exigeants. En général, la taille de l'inoculum est de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Certains chercheurs font appel à une culture microbienne avec une densité optique allant de 0,4 à 620 nm, ou à un bouillon McFarland de 0,5 turbidité ajusté sur une période de 12 heures. On ajoute un volume équivalent de culture microbienne aux puits et on les incube à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. Une fois incubées, les plaques sont analysées afin de repérer les variations de turbidité comme signe de croissance. Le puits initial qui semble évident est perçu comme la CMI de l'extrait (Das et al., 2010).



## Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes



Figure 10. Microdilution methode (Balouiri, 2016).

### ➤ La dilution sur gélose

La dilution de la gélose consiste à incorporer dans un milieu gélosé (milieu gélose fondu) des concentrations désirées de l'agent antimicrobien, généralement en utilisant des dilutions en série au double, puis à inoculer un microbien spécifique dans un inoculum sur la surface de la plaque de gélose. La concentration la plus basse d'agent antimicrobien qui inhibe totalement la croissance est enregistrée au point final CMI, dans des conditions d'incubation adéquates. Ce procédé est approprié pour évaluer la sensibilité aux antibactériens et aux antifongiques. (Balouiri, 2016).

### III-1-2-Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La CMB, ou concentration minimale bactéricide, correspond à la concentration de l'antimicrobien qui laisse au moins 0,01% de germes survivants. Cette méthode consiste à diluer le tube témoin jusqu'à une concentration de  $10^{-4}$ , ce qui a permis d'observer une survie de 0,01%. Ensuite, cette dilution a été appliquée en strie sur une gélose Mueller Hinton et incubée à 37°C pendant 24 heures. Les colonies obtenues à partir de la strie de la dilution  $10^{-4}$  ont été comparées à celles de chaque tube expérimental, également repiqué par une strie de 5 cm. Ainsi, le tube expérimental initial présentant un nombre de colonies sur sa strie inférieur ou égal à celui de la dilution  $10^{-4}$  a été déterminé comme la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ( La Maroh et al., 2008).

## Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes

### III-2-Les méthodes de diffusion

#### ➤ La méthode de diffusion sur disque

En 1940, la technique de diffusion sur disque de gélose a été mise au point afin de tester l'efficacité antimicrobienne des extraits de plantes. L'objectif est d'utiliser des disques de papier stérilisés de 6 mm, remplis de l'extrait végétal désiré, puis déposés sur une surface d'un milieu gélose approprié, comme Mueller Hinton, gélose trypton soja ou Gélose nutritionnelle. Le standard d'inoculum est de  $1 \times 10^8$  UFC/ml de bactéries, ce qui correspond à la norme de turbidité de 0,5 McFarland. Le délai de séchage du disque de papier imprimé peut varier, les chercheurs le séchant pendant 2 heures à une nuit dans une chambre à flux laminaire. Ensuite, les plaques sont placées en incubation à une température de 37°C (bactéries) et 25°C (champignons) pendant 24 heures et 48 heures. Une fois l'incubation terminée, on mesure le diamètre de la zone au millimètre près où l'on observe une diminution significative de 80% de la croissance (Das et al., 2010).

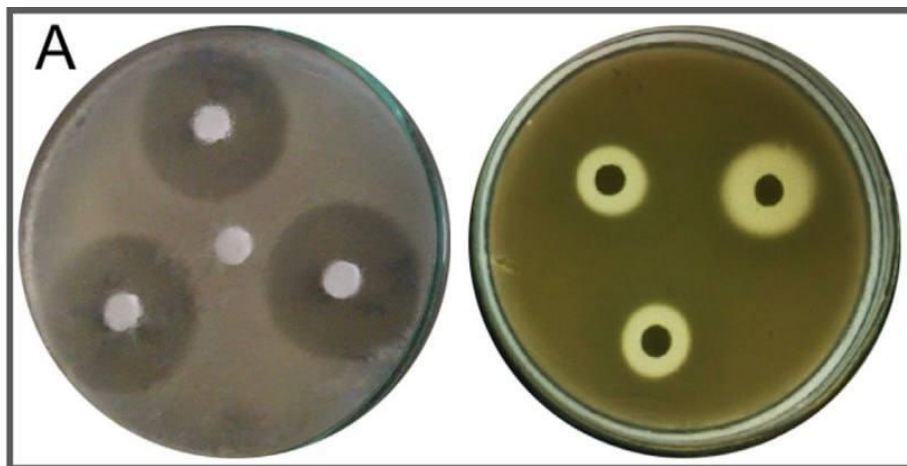


Figure 11. La méthode de diffusion sur disque ( Balouiri,2016).

### III-3- Test de bioautographie sur CCM

La bioautographie est un moyen très pratique de tester les plantes, les sels de tétrazolium sont convertis par les déshydrogénases des micro-organismes vivants en formazan, un composé intensément coloré. Ces sels sont pulvérisés sur le bioautogramme, qui est ensuite réincubé à 25°C pendant 24 heures ou à 37°C pendant 3 à 4 heures. Les zones de croissance bactérienne apparaissent sous forme de zones blanches sur un fond violet dans la chromatographie sur couche mince (CCM). Cette méthode permet de visualiser et d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits testés (Das et al., 2010).

## **Chapitre 03 : évaluation de l'activité anti bactériennes**

---

### **III-4 E.test**

Le test est basé sur la capacité à générer un gradient de concentration de l'agent antimicrobien testé dans le milieu gélose. Les Etests (BioMérieux) jouent un rôle commercial dans cette méthode. Au cours de l'opération, une bandelette remplie d'un gradient de concentration croissant de l'agent antimicrobien d'une extrémité à l'autre est placée sur la surface de la gélose, qui a été préalablement inoculée avec le micro-organisme testé (Balouiri, 2016).

# ***Partie expérimentale***

# ***Matériel et méthodes***

# Matériel et méthodes

---

## I- Extraction et screening phytochimique

### I-1- Matériel et équipement

Pendant la réalisation de la partie chimique nous avons eu recours aux équipements suivants :

- Ampoule à décanter.
- Erlen Meyer.
- Balance de précision.
- Agitateur magnétique.
- Evaporateur rotatif.
- Plaques CCM (Machery Nagel).
- Cuve CCM.
- Lampe UV (254 nm et 365 nm).
- Hotte chimique.
- Ultrason.
- Microplaques
- Lecteur de microplaques (Perkin Elmer Multimode Plate Reader EnSpire).

### I-2- Réactifs

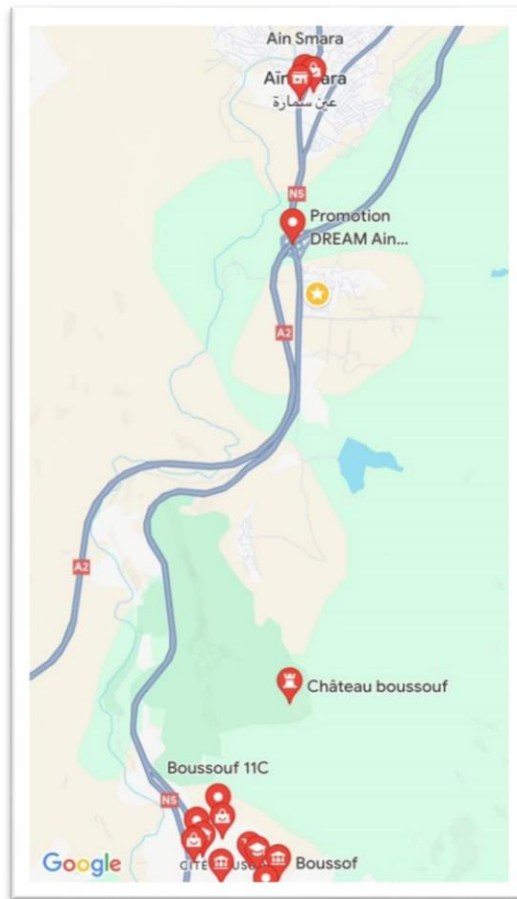
L'hydroxyde de potassium (KOH), le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), le chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), la vanilline, l'éthanol, l'acide acétique glacial, le nitrate de bismuth basique, l'acide sulfurique, l'acétate de potassium ( $\text{CH}_3\text{-COOK}$ ) et le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) proviennent de VWR chemicals, le Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium ( $\text{NaCO}_3$ ), l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), la quercétine, l'acide gallique et le diméthylesulfoxyde (DMSO) proviennent de Sigma Aldrich. Nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ), Hydroxyde de sodium (NaOH), Chlorure d'hydrogène (HCl)

### I-3- Matériel végétal

#### A/ Collecte

Les rhizomes de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. ont été récoltés entre la cité Boussouf et la commune d'Ain Smara à la wilaya de Constantine.

## Matériel et méthodes



**Figure 12.** Lieu de récolte des rhizomes de la plante *Asphodelus microcarpus*. Salzm. & Viv.

### B/ Séchage et broyage

Les rhizomes et les racines ont été séchés dans un endroit sec à l'abri de la lumière, suffisamment aéré, et à une température modérée de 25°C, puis placés dans un mortier et broyés par le pilon avec l'ajout d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène.

### I-4- Mode opératoire

#### I-4-1- Extraction solide-liquide

C'est un processus où la matière voulue est déplacée d'une substance solide vers un liquide, appelé solvant.

250g de poudre de la partie sous terraine (rhizomes-racines) de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. macérés dans une solution éthanol/eau distillée (2L x 3, 70:30, v/v à température ambiante pendant 3 jours, après le macérât a été filtré, puis évaporé sous

## **Matériel et méthodes**

---

vide pour offrir un résidu sec que nous avons pesé pour déterminer la quantité finale d'extrait brut en grammes ainsi que le rendement et conservé dans un flacon à l'abri de la lumière.

### **I-4-2- Extraction liquide-liquide**

C'est un procédé où les composants sont transférés entre deux phases liquides immiscibles, généralement une phase aqueuse et une phase organique, pour séparer les substances cibles.

L'extrait brut de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. (62g) a été dissout dans 300mL d'H<sub>2</sub>O jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Nous avons ensuite versé la solution dans une ampoule à décantation.

Pour réaliser l'affrontement (décantation), des solvants de polarité croissante ont été utilisés, allant d'un solvant moins polaire à un solvant plus polaire à savoir : éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol, selon le schéma d'extraction suivant :



## Matériel et méthodes

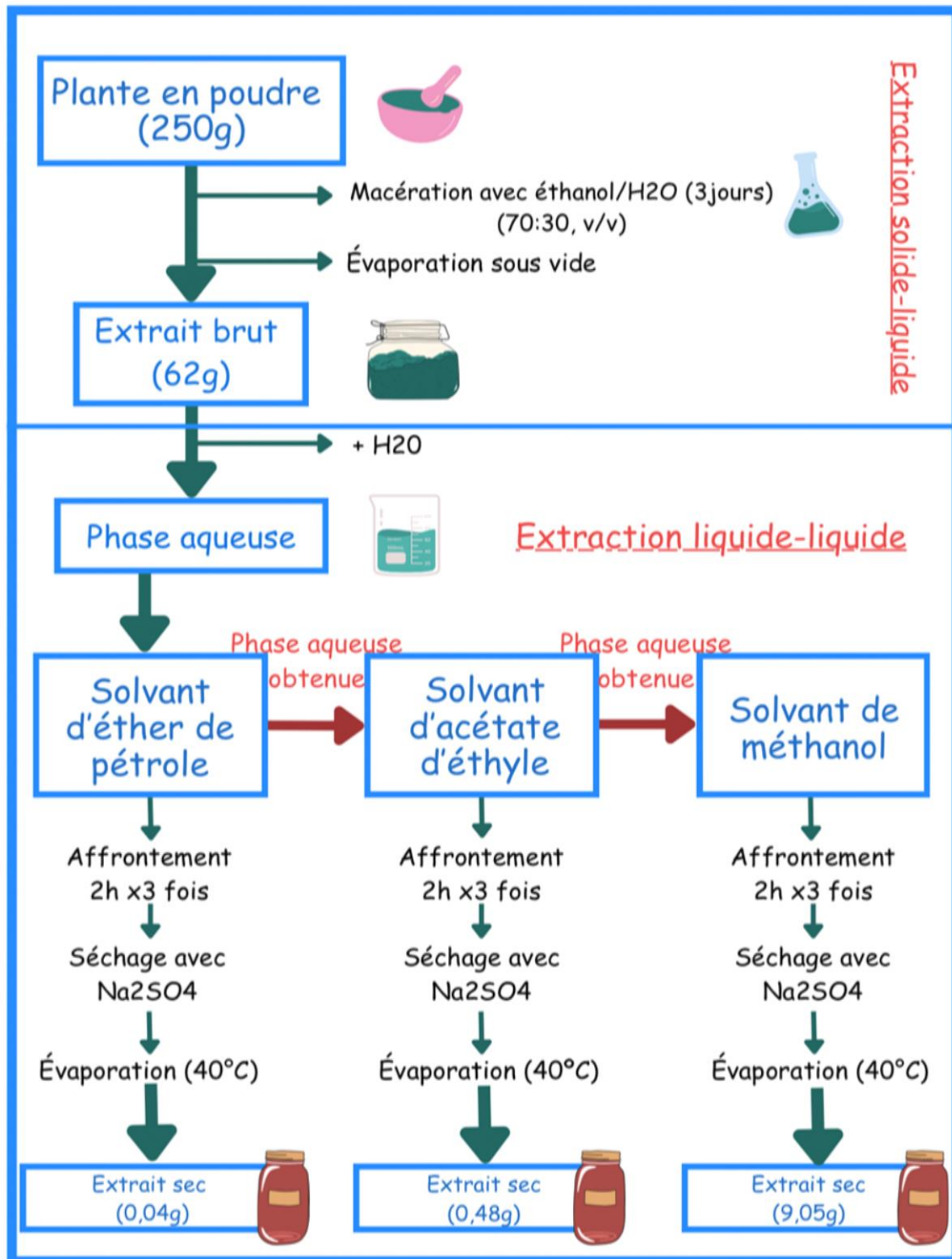


Figure 13. Schéma d'extraction de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv.

## Matériel et méthodes

### • Principe

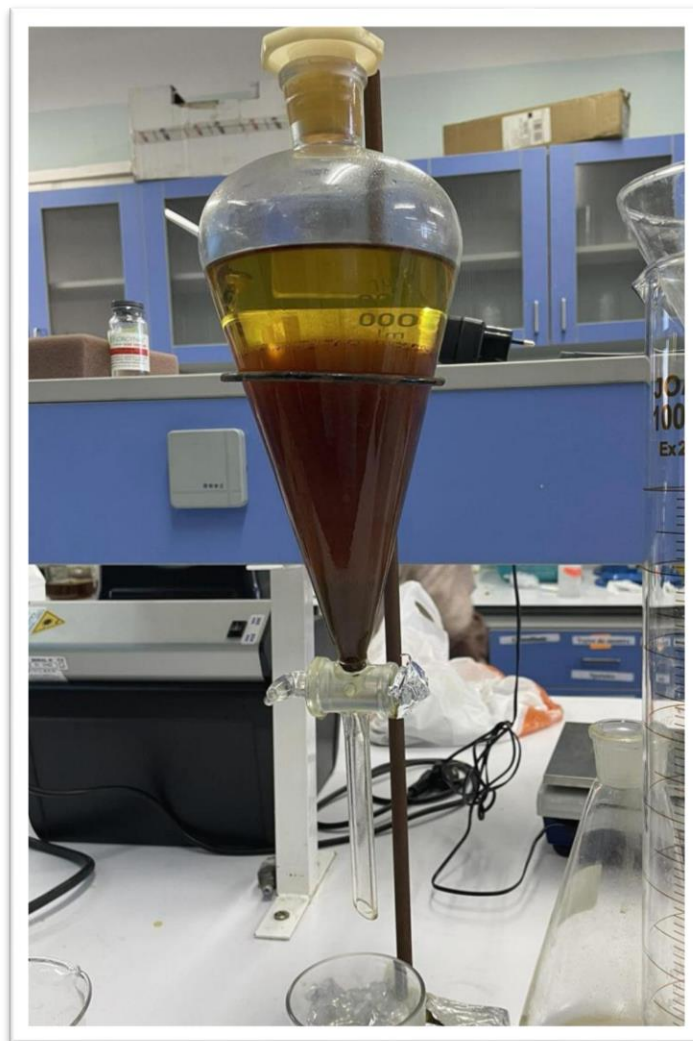
Chaque métabolite se dissout dans le solvant qui lui convient le mieux en fonction de sa polarité.

• 300 mL de solvant sont ajoutés à 300 mL de solution aqueuse dans une ampoule à décanter.

• L'ampoule est fermée, agitée vigoureusement et dégazée trois fois.

• Le mélange repose deux heures, formant une phase aqueuse qui se trouve en bas de l'ampoule et une phase organique contenant l'éther de pétrole qui se trouve au-dessus de la phase aqueuse.

• La phase organique est récupérée, traitée au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour éliminer l'eau résiduelle, puis transférée pour évaporation.



**Figure 14.** Ampoule à décanter contenant les deux phases (aqueuse et organique).

# **Matériel et méthodes**

---

## **I-5- Rendement**

Le poids de l'extrait sec est obtenu en calculant la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids initial du ballon vide.

## **I-6- Screening phytochimique**

### **I-6-1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés permettant d'étudier la complexité d'un mélange. Dans notre étude, elle a été employée pour observer la séparation des métabolites secondaires présents dans les phases de la plante étudiée.

#### **• Principe**

La chromatographie sur couche mince utilise l'adsorption et la polarité. Un mélange est déposé sur une phase stationnaire, puis un solvant (phase mobile) se déplace par capillarité. Les composés migrent à différentes hauteurs selon leur affinité pour chaque phase, ce qui permet de les caractériser par leur rapport frontal ( $R_f$ ) (Abedini, 2013).

### **I-6-2- Mode opératoire**

#### **A/ Préparation de la phase stationnaire**

Les plaques pré-étalées de gel de silice sont découpées aux dimensions voulues (10 cm de hauteur). Nous avons tracé légèrement une ligne de dépôt à environ 1 cm du bord inférieur de chaque plaque.

## Matériel et méthodes

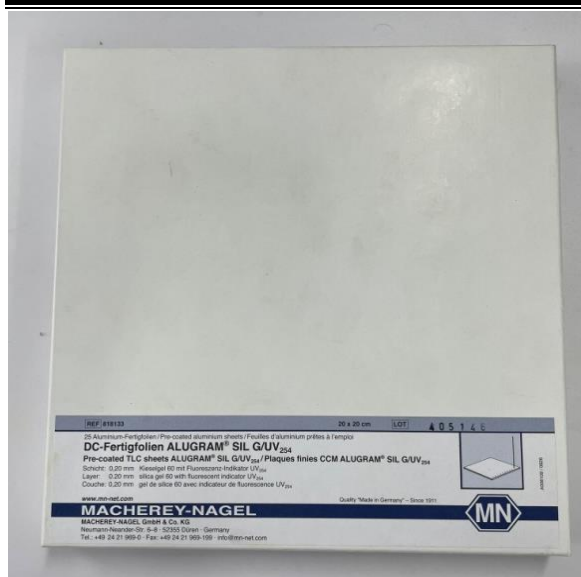


Figure 15. Plaques de silice pour CCM



Figure 16. Plaques CCM préparées

### B/ Préparation de la phase mobile

Pour préparer le système d'éluion, nous avons suivi les étapes suivantes :

Sous une hotte à flux laminaire, nous avons mesuré 4 mL de toluène dans une éprouvette graduée, ajouté 14 mL de chloroforme, puis 2 mL de méthanol pour obtenir 20 mL de phase mobile, versé ensuite dans la cuve et agité pour homogénéiser le mélange.

Tableau 2 : les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM.

	Eluants	Proportions
Les systèmes solvant (éluants) essayés	Toluène/Chloroforme/Méthanol	(20/70/10) (v/v/v)
	Chloroforme/Acétate d'éthyle/Méthanol	(60/30/10) (v/v/v)
	Toluène/Chloroforme/Méthanol	(20/65/15) (v/v/v)
L'éluant choisi	Toluène/ Chloroforme/Méthanol	(20/70/10) (v/v/v)

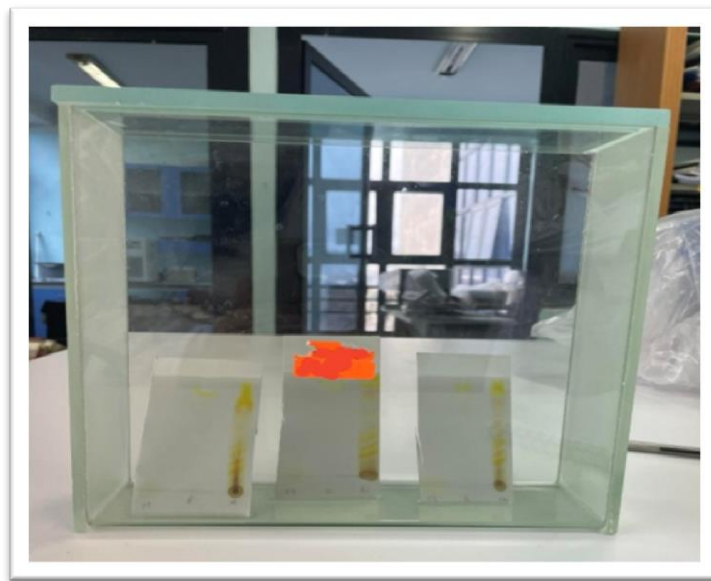
Nous avons opté pour le système Toluène/ Chloroforme/Méthanol (20/70/10) (v/v/v), en raison de la bonne séparation obtenue.

## Matériel et méthodes

### I-6-3- Développement du chromatogramme

L'éluant a été versé dans une cuve à chromatographie et cette dernière a été couverte pour éviter l'évaporation des solvants.

À l'aide de pipettes Pasteur, nous avons déposé une petite quantité de chaque extrait sec (éther de pétrole, AcOEt, MeOH) sur la ligne de dépôt des plaques. Les plaques ont été placées dans la cuve à chromatographie et laissées se développer jusqu'à ce que le solvant atteigne 1 cm du bord supérieur. Les plaques ont ensuite été retirées, les fronts de solvant marqués au crayon, puis laissées sécher à l'air.



**Figure17.** Cuve de chromatographie.

### I-6-4- Révélateurs chimiques des différentes classes de métabolites

La révélation s'effectue en utilisant des révélateurs chimiques sur la plaque chromatographique. Les résultats peuvent être observés à l'œil nu, sous une lampe UV, ou les deux.

Les spots qui apparaissent ont été encerclés et les rapports frontaux (Rf) ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par le spot}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

Distance parcourue par le spot : Distance de la ligne de dépôt jusqu'au centre de spot.

## Matériel et méthodes

- **La mise en évidence des quinones libres, anthrones et anthranols, coumarines et dérivés anthracéniques**

Pulvériser les plaques avec la solution de KOH a 10%

**Tableau 3.** Métabolites révélés par KOH (Wagner et Bladt, 1996).

Métabolites souhaités	Couleur attendue	Dans le visible/ Sous UV-365nm
Quinones libres	Rougeâtres	Visible
Anthrones et anthranols	Fluorescentes en jaune	Sous UV-365nm
Coumarines	Intensification de la couleur	Visible
Dérivés anthracéniques	Rouge/fluorescentes en rouge	Visible/ Sous UV-365nm

- **La mise en évidence des flavonoïdes**

Pulvérisation des plaques d'une solution de  $AlCl_3$  a 1 % jusqu'à apparition de spots jaunes en visible, bleus, bruns et jaune-verts sous UV-365nm (Merck, 1980).

- **La mise en évidence des tannins et des composés phénoliques**

Pulvériser les plaques d'une solution de  $FeCl_3$  a 2 %. Apparition dans le visible d'une couleur grise, brune et brune verdâtre pour les tanins, rouge, bleu et vert pour les composés phénoliques (Dohou et *al.*, 2003).

- **La mise en évidence des saponines**

Pulvérisation des plaques d'une solution d'acide sulfurique éthanolique à 10 % suivie d'un chauffage jusqu'à ce que des spots noirs apparaissent dans le visible (Sharma *et al.*, 2012).

- **La mise en évidences des alcaloïdes**

Pulvérisation des plaques par le réactif de Dragendorff, suivie d'un chauffage jusqu'à ce qu'une couleur brune ou orange-brunâtre apparaisse dans le visible (Lagnika, 2005) (voir annexes).

- **La mise en évidences des acides phénoliques**

Vaporiser le réactif de Folin sur les plaques, et laisser sécher pendant 2 minutes à l'air libre. Ensuite, la tremper dans une solution de  $NH_4^+$  jusqu'à ce que le fond jaune se décolore. Noter les spots (Wagner et Bladt, 1996).

## **Matériel et méthodes**

---

- **La mise en évidence des terpènes et des lignanes**

Préparation d'une solution de vanilline et d'acide sulfurique et pulvérisation des plaques suivie d'un chauffage jusqu'à ce qu'une couleur violette apparaisse dans le visible pour les terpènes), rougeâtre en visible et sous UV à 365 nm pour les lignanes (Wagner et Blatt, 1996) (voir annexes).

## **II- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes**

### **II-1- Dosage des polyphénols**

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits est effectuée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, selon une méthode de dosage sur microplaques. Ce réactif est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) qui réagit lors de l'oxydation des phénols, générant un mélange d'oxyde de tungstène (WsO<sub>23</sub>) et de molybdène (MosO<sub>23</sub>) et donnant une coloration bleue. L'intensité de cette coloration est directement liée à la concentration de phénols totaux et présente une absorption maximale autour de 750-765 nm, selon la méthode décrite par Muller et al., (2010) ainsi que par Hadouchi et al., (2016).

#### **✓ Procédure**

1mg de chaque extrait (Éther de pétrole, Acétate d'éthyle et Méthanol) est mesuré avec précision et placé dans des tubes Eppendorf. Ensuite, 1mL d'éthanol est ajouté à chaque tube contenant l'extrait.

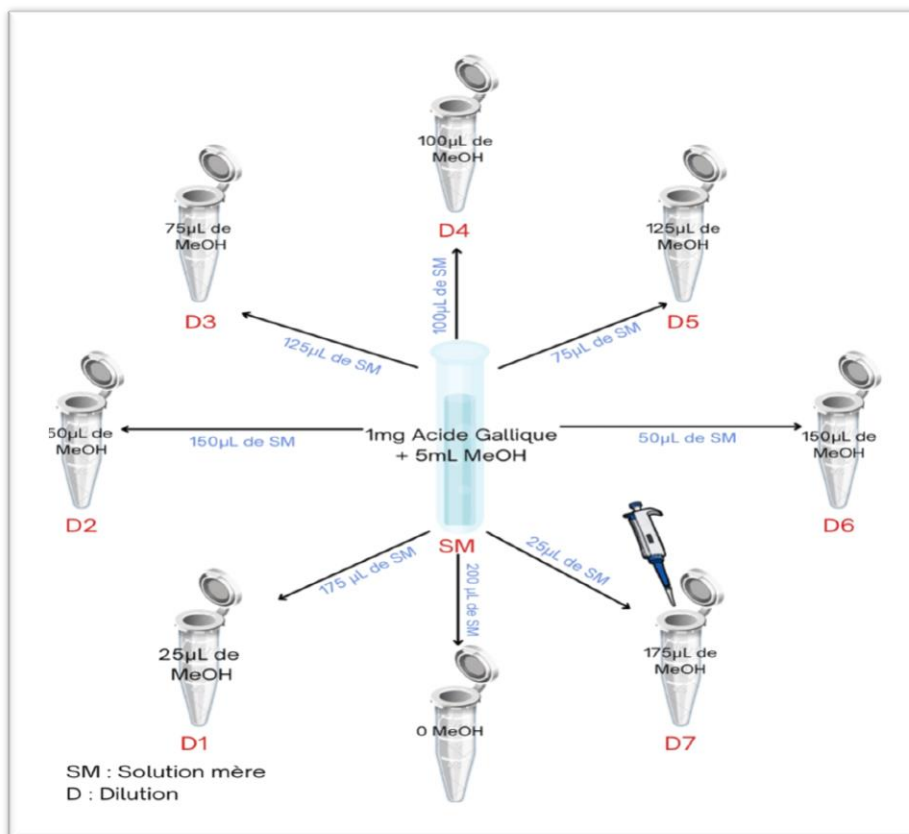
- **Préparation de l'extrait**

Dans un puits d'une microplaque, 20 µL d'extrait ont été ajoutés à un mélange de 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) et 75 µL de NaCO<sub>3</sub>. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque extrait, suivies d'une incubation de 2 heures à l'obscurité. Ensuite, la lecture a été effectuée par un lecteur de microplaques à 765nm.

- **Préparation de la courbe d'étalonnage d'acide gallique**

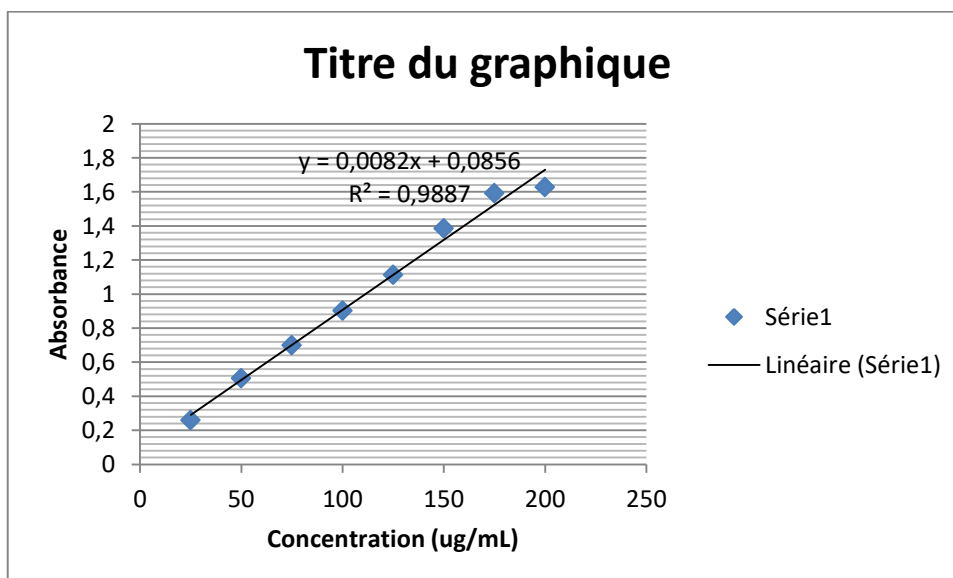
Les concentrations de la gamme d'étalonnage basée sur l'acide gallique vont de 25 µg/mL à 200 µg/mL, le processus de dilution est illustré dans la figure :

## Matériel et méthodes



**Figure 18.** Schéma de la préparation des dilutions d'acide gallique.

La figure ci-dessous présente la courbe d'étalonnage obtenue à partir des dilutions préparées pour l'acide gallique :



**Figure 19.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



## Matériel et méthodes

- Dans une microplaque à 96 puits, 20  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont déposés (trois répétitions pour chaque dilution), suivis de l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de FCR et de 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCO}_3$ . La microplaque est incubée pendant 2 heures et est lue à 765 nm.

### II.2 Dosage des flavonoïdes

Pour évaluer la concentration de flavonoïdes dans les extraits, nous avons utilisé une méthode qui repose sur la formation d'un complexe entre  $\text{Al}^{+3}$  et les flavonoïdes. Cette méthode décrite par Topçu et al., (2007) a été adaptée avec quelques ajustements pour être réalisée dans des microplaques à 96 puits.

#### Procédure

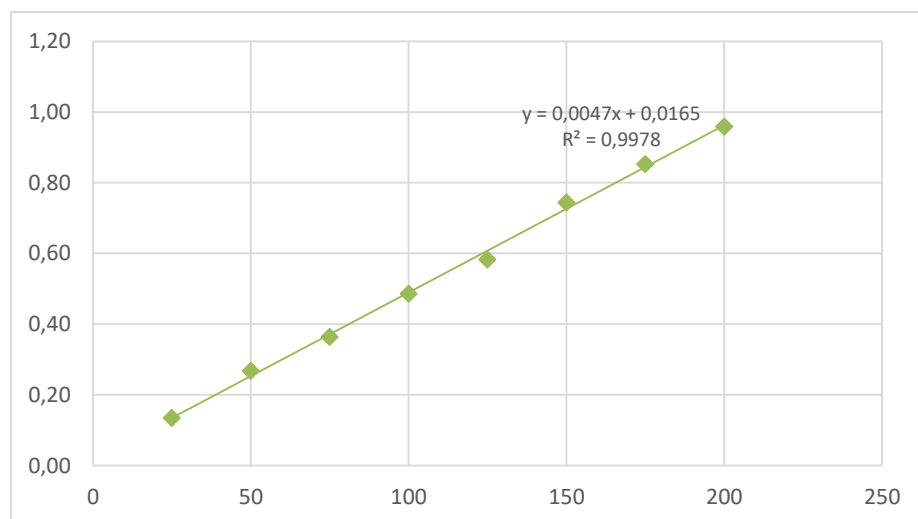
- **Préparation de l'extrait**

Trois répétitions ont été effectuées pour chaque extrait, ce qui correspond à trois puits dans la microplaque. Dans chaque puits, 50  $\mu\text{L}$  de l'extrait sont mélangés avec 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  (à 5%), 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  (à 10%), et 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$ . Ensuite, la microplaque est incubée à l'obscurité pendant 40 minutes et la lecture à 415 nm.

- **Préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine**

Une solution mère de quercétine a été préparée avec une concentration de 0,2 mg/ml, à partir de laquelle une série de dilutions a été préparée (même principe que dans la préparation des dilutions de l'acide gallique) (Figure 18).

La courbe d'étalonnage établie avec ces dilutions de quercétine est illustrée ci-dessous :



**Figure 20.** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

## Matériel et méthodes

---

- 50 uL de chaque dilution sont transférés dans une microplaque à laquelle est ajouté 20µL de NaNO<sub>2</sub> (à 5%), 20µL de AlCl<sub>3</sub> (à 10%) et 100 µL de NaOH, incubé pendant 40 min et lecture à 415 nm.

### III- Activité antibactérienne

#### III-1- Matériel et équipement

- Hotte microbiologique.
- Bain Marie.
- Etuve.
- Bec Bunsen.
- Gélose Mueller Hinton.
- Boîtes de Pétri.
- Micropipettes.
- Embouts bleus et jaunes.
- Tubes Eppendorf.
- Ecouvillons.
- Micro-filtres.
- Disques stériles (6mm).
- Pincés stériles.
- Souches bactériennes *Escherichia coli* NCTC10538, *Bacillus subtilis* subesp. *spizizenii* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB8626 et *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

#### III-2- Méthode de diffusion sur milieu gélosé

##### III-2-1- Mode opératoire

- **Stérilisation du matériel**

Le matériel nécessaire pour l'activité bactérienne, y compris les disques en papier Whatman, les embouts jaunes et bleus, ainsi que les tubes Eppendorf et tubes à essai, est stérilisé en autoclave à 121°C pendant 60 minutes.

- Les étapes suivantes sont réalisées sous une hotte microbiologique et devant un bec Bunsen afin de prévenir toute contamination :

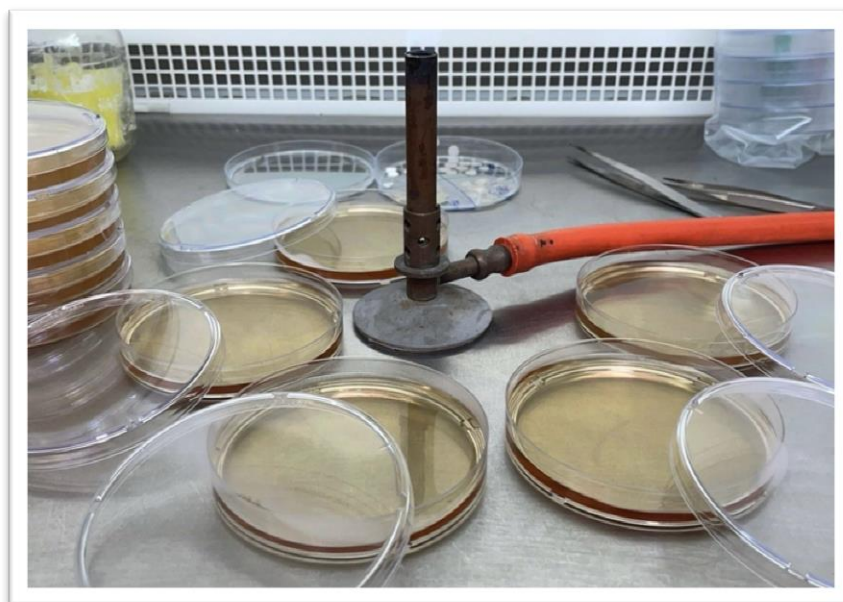
## Matériel et méthodes



**Figure 21.** Hotte microbiologique.

- **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture est préparé en faisant bouillir la gélose Muller Hinton jusqu'à sa dissolution complète dans un bain-marie à 95°C. Ensuite, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri stériles et laissé à refroidir pour qu'il solidifie.



**Figure22.** Préparation des boîtes de Pétri.

## Matériel et méthodes

- **Préparation des extraits et séries de dilutions**

. Une série de dilutions est réalisée à partir d'une solution mère allant de 200 mg/ml, 150 mg/ml et 100 mg/ml jusqu'à 1/64 dans du DMSO. Ces solutions sont ensuite filtrées à travers des microfiltres de 0,22  $\mu\text{m}$ .

- **Préparation et standardisation de l'inoculum**

Les quatre souches bactériennes sont mises en culture dans du bouillon nutritif et incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'inoculum est préparé à partir de cette suspension dans de l'eau physiologique stérile pour atteindre une densité équivalente à 0,5 McFarland.

- **Ensemencement et dépôt des disques**

Pour l'ensemencement, les suspensions bactériennes sont étalées à la surface de la gélose M.H. par écouvillonnage. Ensuite, les disques imbibés de différentes concentrations d'extraits et de DMSO (contrôle négatif) sont déposés à l'aide d'une pince stérile, délicatement sur la surface de la gélose inoculée. Les boîtes de Petri sont ensuite placées au réfrigérateur (4°C) pour favoriser une meilleure diffusion pendant 30 minutes. Cette étape est répétée trois fois pour chaque extrait et chaque souche bactérienne.



**Figure 23.** Ensemencement complet en surface pour extraits de plante et antibiotiques.

## Matériel et méthodes

- **Incubation et lecture**

Enfin, les boîtes de Petri sont incubées pendant 24 à 48 heures à 37°C. Après l'incubation, les zones d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques de test sont mesurées à l'aide d'une règle. (Biondi et al.,1993).

### III-3- Antibiogramme

Les antibiotiques utilisés : Clindamycine (2µg), Fosfomycine trométamol (200µg), Pénicilline (6µg), Ofloxacine (5µg), Cefotaximine (30µg) et Spiramycine (100µg). Deux répétitions ont été réalisées contre les souches appropriées, c'est-à-dire selon leur sensibilité vis-à-vis de l'antibiotique.

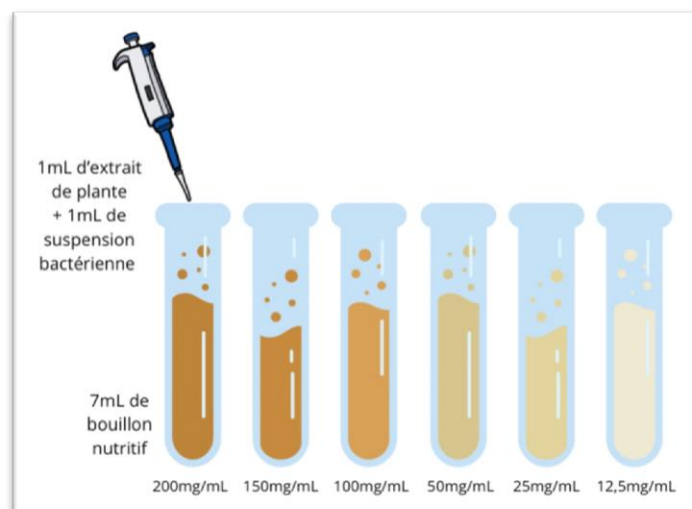
### IV- Concentration Minimale Inhibitrice sur milieu liquide

#### IV-1- Préparation du bouillon nutritif

8g de poudre de bouillon nutritif sont dissouts dans un litre d'eau distillée puis repartis sur des tubes pour stérilisation.

#### IV-2- Mode opératoire

1ml de suspension bactérienne dans de l'eau physiologique (équivalent à 0,5 McFarland) est mélangé avec 1 mL d'extrait de plante et 7 mL de bouillon nutritif. Cette opération est répétée deux fois, puis le mélange est agité et incubé pendant 24 heures à 37°C avant d'être lu. ([www.pasteur.dz/aarn](http://www.pasteur.dz/aarn)).



**Figure 24.** Schéma de la préparation de la CMI

# ***Résultats et discussion***

## Résultats et discussion

### I- Screening phytochimique sur plaque CCM

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les différentes phases de la partie sous terrain de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. (Éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol) ont montré une grande diversité de familles de métabolites secondaires en l'occurrence : les quinones libres, les anthrones et anthranols, les flavonoïdes, les saponines, les terpènes, les tanins et les acides phénoliques (Tableau 4).

**Tableau 4.** Détection des phytoconstituants par différents révélateurs.

Phytoconstituants	Révélateur	Extrait		
		AcOEt	Ether de pétrole	Méthanol
Quinones libres	KOH	+	-	-
Anthrones et anthranols		+	+	-
Dérivés anthracéniques		+	+	-
Flavonoïdes	AlCl <sub>3</sub>	+	+	+
Saponines	Ethanol/Acide sulfurique	+	+	+
Composés phénoliques	FeCl <sub>3</sub>	+	+	-
Tanins		+	+	+
Alcaloïdes	Dragendorff	-	-	-
	Ethanol/ Acide sulfurique	-	-	-
	Sans révélateur	-	-	-
Acides phénoliques	Folin et NH <sup>4+</sup>	+	+	-

## Résultats et discussion

Tableau 4. Détection des phytoconstituants par différents révélateurs (suite).

Phytoconstituants	Révélateur	Extraits		
		AcOEt	Ether de pétrole	Méthanol
Terpènes	Vanilline sulfurique	+	+	+
Lignanes		-	-	-

### Rapports frontaux

Les résultats de chromatographie sur couche mince (CCM) avec différents révélateurs montrent les rapports frontaux suivants :

#### I-1- Révélation par KOH à 10%

Dans l'extrait acétate d'éthyle, les spots sont tous de couleur rouge dont les valeurs de Rf sont : Rf1  $\approx$  0,35, Rf2  $\approx$  0,41, Rf3  $\approx$  0,48, Rf4  $\approx$  0,53, Rf5  $\approx$  0,6, Rf6  $\approx$  0,89, Rf7  $\approx$  0,96, tandis que dans l'extrait éther de pétrole, un spot de teinte rouge avec une valeur de Rf1  $\approx$  0,91.

#### I-2-Révélation par AlCl<sub>3</sub> à 2 %

Dans l'extrait d'acétate d'éthyle, les valeurs de Rf sont : Rf1  $\approx$  0,22 (un spot brun), Rf2  $\approx$  0,3 (un spot brun), Rf3  $\approx$  0,38 (un spot jaune), Rf4  $\approx$  0,57 (un spot jaune), Rf5  $\approx$  0,61 (un spot jaune), Rf6  $\approx$  0,77 (un spot brun), Rf7  $\approx$  0,83 (un spot violet), Rf8  $\approx$  0,87 (un spot jaune), Rf9  $\approx$  0,97, tandis que dans l'extrait éther de pétrole, les valeurs sont Rf1  $\approx$  0,53 (un spot jaune), Rf2  $\approx$  0,87 (un spot jaune orangé).

#### I-3- Révélation par FeCl<sub>3</sub> à 1 %

Dans l'extrait d'acétate d'éthyle, les spots ont les couleurs et les valeurs de Rf suivantes : Rf1  $\approx$  0,09 (gris), Rf2  $\approx$  0,17 (brun verdâtre), Rf3  $\approx$  0,23 (brun verdâtre), Rf4  $\approx$  0,27 (brun verdâtre), Rf5  $\approx$  0,3 (brun verdâtre), Rf6  $\approx$  0,32 (brun verdâtre), Rf7  $\approx$  0,4 (brun verdâtre), Rf8  $\approx$  0,47 (brun verdâtre), Rf9  $\approx$  0,56 (vert), Rf10  $\approx$  0,74 (brun), Rf11  $\approx$  0,86 (brun verdâtre), et Rf12  $\approx$  0,95 (brun verdâtre). Tandis que dans l'extrait éther de pétrole, les spots ont les valeurs de Rf suivantes : Rf1  $\approx$  0,56 (vert), Rf2  $\approx$  0,73 (brun), et Rf3  $\approx$  0,97 (brun verdâtre).



## Résultats et discussion

### I-4- Révélation par Folin et $\text{NH}_4$

Dans l'extrait d'acétate d'éthyle, les spots ont les couleurs et les valeurs de Rf suivantes : Rf1  $\approx$  0,2 (bleu-noir), Rf2  $\approx$  0,5 (bleu-noir), tandis que dans l'extrait éther de pétrole, un spot avec la valeur de Rf1  $\approx$  0,9 (bleu-noir).

### I-5-Révélation par vanilline sulfurique

Dans l'extrait d'acétate d'éthyle, les spots ont les couleurs et valeurs suivantes : Rf1  $\approx$  0,17 (vert brunâtre), Rf2  $\approx$  0,12 (violet), Rf3  $\approx$  0,31 (vert brunâtre), Rf4  $\approx$  0,37 (vert brunâtre), Rf5  $\approx$  0,45 (vert brunâtre), Rf6  $\approx$  0,6 (violet), Rf7  $\approx$  0,68 (vert jaunâtre), Rf8  $\approx$  0,81 (vert jaunâtre), Rf9  $\approx$  0,91 (violet), tandis que dans l'extrait éther de pétrole, les spots ont les valeurs de Rf et les couleurs suivantes : Rf1  $\approx$  0,56 (violet), Rf2  $\approx$  0,68 (vert jaunâtre), Rf3  $\approx$  0,98 (violet), cependant l'extrait méthanol, les spots sont violets avec Rf1  $\approx$  0,24 et Rf2  $\approx$  0,24.

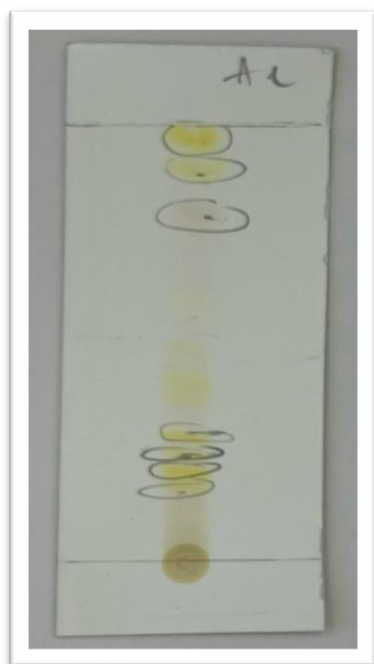


Figure 25 a.



Figure 25 b.



Figure 25 c.

**Figures 25.** Chromatogrammes des trois extraits dans le spectre visible avant révélation dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10). a. AcOEt, b. Ether de pétrole, c. MeOH

## Résultats et discussion

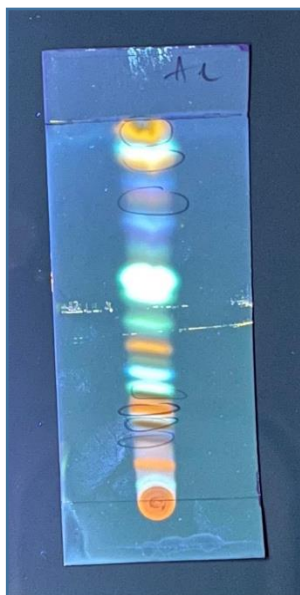


Figure 26 a.

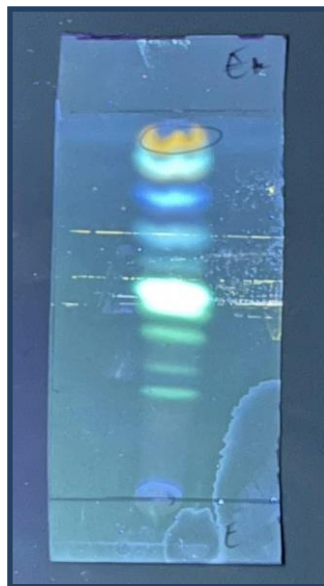


Figure 26 b.

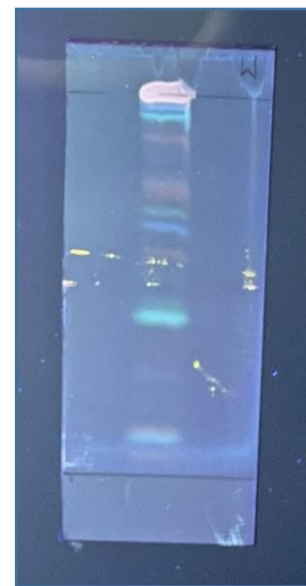


Figure 26 c.

**Figures 26.** Chromatogrammes des trois extraits sous UV 365 nm avant révélation dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10). a. AcOEt, b. Éther de pétrole, c. MeOH.



Figure 27 a.



Figure 27 b.

**Figures 27.** /a. Chromatogramme avant chauffage révélé avec KOH éthanolique (10%) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (30/60/10)./b. Chromatogramme avant chauffage révélé avec le révélateur KOH éthanolique (10%) sous UV 365 nm dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (30/60/10). Ac : AcOEt, E : éther de pétrole, M : MeOH.

## Résultats et discussion

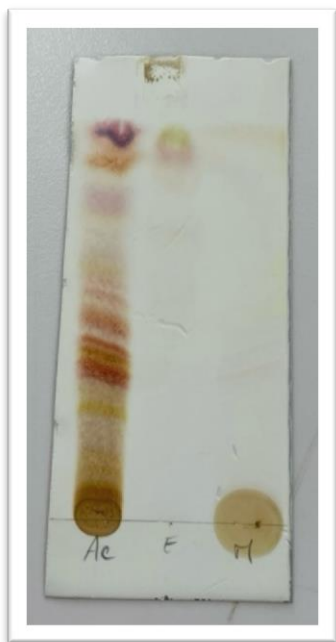


Figure 28 a.

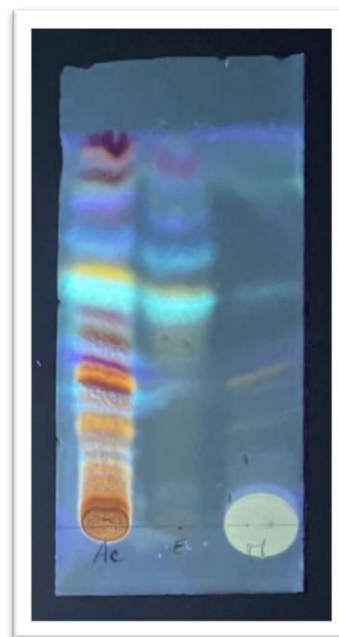


Figure 28 b.

**Figures 28.** /a. Chromatogramme après chauffage révélé avec KOH méthanolique (10%) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme après chauffage révélé avec le révélateur KOH méthanolique (10%) sous UV 365 nm dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10). Ac : AcOEt, E : éther de pétrole, M : MeOH.



Figure 29a.

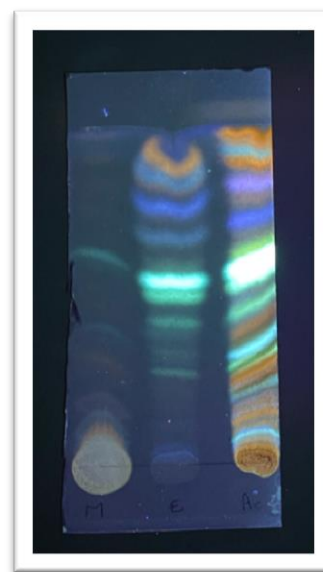


Figure 29 b.

**Figures 29** /a. Chromatogramme révélé avec  $\text{AlCl}_3$  éthanolique (2%) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme révélé avec  $\text{AlCl}_3$  éthanolique (2%) sous UV-365nm dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).

## Résultats et discussion



Figure 30 a.

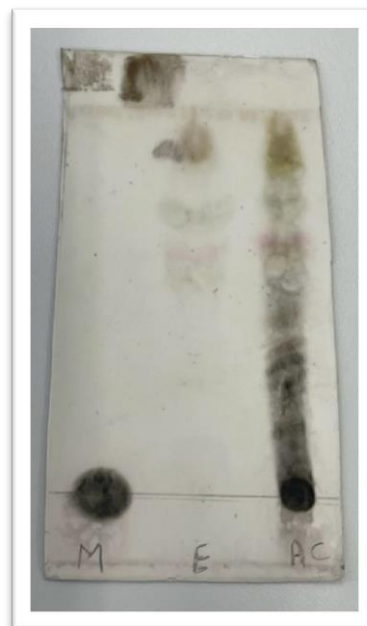


Figure 30 b.

**Figures 30.** /a. Chromatogramme avant chauffage révélé par ethanol/acide sulfurique (9/1) (v/v) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10)./b. Chromatogramme après chauffage révélé par ethanol/acide sulfurique (9/1) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).



**Figure 31.**Chromatogramme révélé par  $\text{FeCl}_3$  éthanolique (1%) en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).

## Résultats et discussion

---



**Figure 32.** Chromatogramme après chauffage révélé par le réactif de Dragendorff en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).

## Résultats et discussion

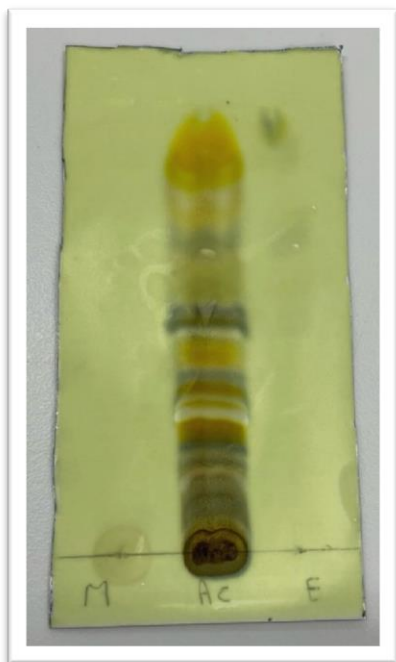


Figure 33 a.



Figure 33 b.

**Figures 33. /a.** Chromatogramme lors de l'ajout de Folin-Ciocalteu révélé en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).

**/b.** Chromatogramme révélé par  $\text{NH}_4^+$  en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).



Figure 34 a.



Figure 34 b.

**Figures 34. /a.** Chromatogramme avec chauffage révélé par la vanilline sulfurique dans le spectre visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/70/10).

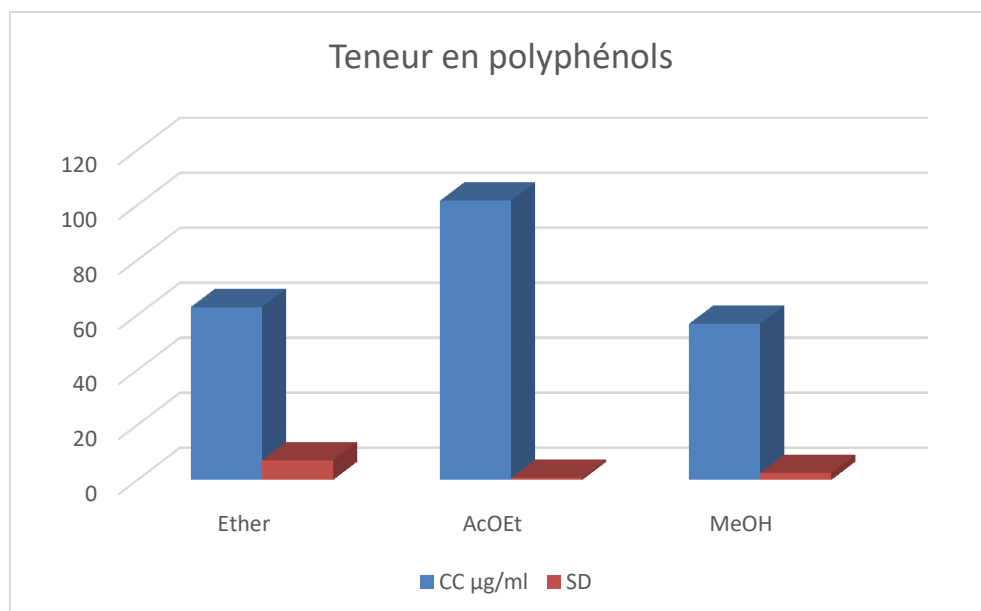
## Résultats et discussion

/b. Chromatogramme avec chauffage révélé par la vanilline sulfurique en visible dans le système toluène/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH : (20/65/15). M : MeOH, Ac : AcOEt, E : Ether de pétrole.

### II- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

#### II-1- Teneur en polyphénols totaux

Les résultats présentés dans l'histogramme ci-dessous montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait AcOEt présente la teneur la plus élevée en polyphénols ( $101,54 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ ), suivi de l'extrait éther de pétrole qui renferme un faible taux ( $62,875 \pm 7,14 \mu\text{g/mL}$ ). Tandis que la plus basse concentration en polyphénols a été enregistrée dans l'extrait méthanolique ( $56,792 \pm 2,53 \mu\text{g/mL}$ ).



**Figure 35.** Teneur en polyphénols des différents extraits.

En revanche, l'étude menée par Di Petrillo et al.,(2016) sur les tubercules d'*Asphodelus microcarpus* révèle des teneurs en polyphénols significativement inférieures à nos résultats. En effet, cette étude a déterminé que les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique contiennent respectivement ( $5,10 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ), ( $39,35 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$ ) et ( $15,31 \pm 7,8 \mu\text{g/mL}$ ) de polyphénols.

Dans la présente étude, l'extrait méthanolique ( $56,792 \pm 2,53 \mu\text{g/mL}$ ) est nettement plus concentré en polyphénols que celui de Di Petrillo et al.,(2016).

Cette différence marquée peut s'expliquer par des variations dans les méthodes d'extraction, les solvants utilisés ou les conditions spécifiques de culture des plantes. Ces

## Résultats et discussion

résultats mettent en évidence l'importance de l'optimisation des conditions d'extraction pour maximiser la récupération des polyphénols dans les extraits végétaux.

### II-2- La teneur en flavonoïdes

Les résultats présentés dans l'histogramme ci-dessous montrent que les teneurs en flavonoïdes varient significativement entre les différents extraits. L'extrait d'AcOEt enregistre la teneur maximale en flavonoïdes ( $192,25 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$ ), indiquant une richesse notable en flavonoïdes par rapport aux autres extraits. L'extrait d'éther de pétrole présente une teneur modérée en flavonoïdes ( $73,83 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ ). En revanche, l'extrait de MeOH affiche la plus basse concentration en flavonoïdes ( $19,42 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ). Ces résultats suggèrent que l'AcOEt est le solvant le plus efficace pour extraire les flavonoïdes, comparé à l'éther de pétrole et au MeOH.

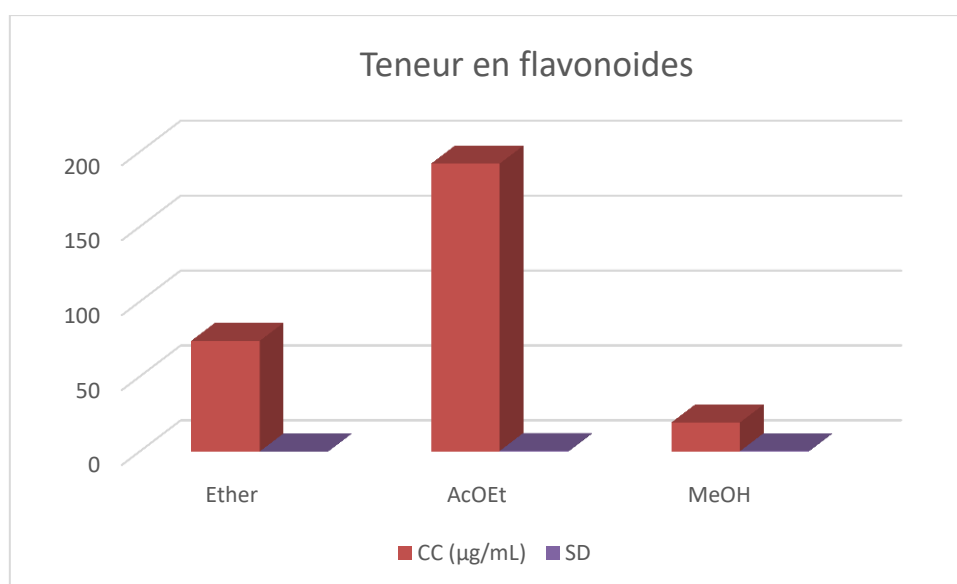


Figure 36. Teneur en flavonoïdes des différents extraits.

Par contre, les résultats obtenus pour les tubercules d'*Asphodelus microcarpus*, décrits par Di Petrillo et al. (2016), montrent des teneurs en flavonoïdes significativement plus faibles, dans les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique ( $1,99 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ ,  $1,4 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$  et  $3,94 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$ ) respectivement, indiquant ainsi que les extraits de tubercules d'*Asphodelus microcarpus* sont moins riches en flavonoïdes, quel que soit le solvant utilisé, comparé aux extraits étudiés. En particulier, l'extrait méthanolique des tubercules d'*Asphodelus microcarpus* ( $3,94 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$ ) qui est beaucoup moins concentré en flavonoïdes que l'extrait méthanolique mentionné dans notre étude ( $19,42 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ).



## Résultats et discussion

### III- Activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits faisant objet de cette étude, différentes concentrations ont été testées contre plusieurs souches bactériennes. Après 24h d'incubation, les résultats obtenus ont été notés dans le tableau ci-dessous, indiquant la présence (+) ou l'absence (-) de l'activité antibactérienne.

**Tableau 5.** Activité antibactérienne des extraits de l'espèce *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. à différentes concentrations et celle des antibiotiques utilisés contre les diverses souches bactériennes, exprimée en termes de diamètre d'inhibition.

Extrait De plante	Concentration (mg/mL)	Bactérie			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Éther de pétrole	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
	3,13	-	-	-	-
	1,56	-	-	-	-
AcOEt	200	+ 11±0,33 mm	-	-	+ <6mm
	150	+ 7,9±0,54 mm	-	-	+ <6mm
	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
	3,13	-	-	-	-
1,56	-	-	-	-	
MeOH	200	+ 8±0,08 mm	-	-	+ 9±0,23 mm
	150	+ 12±0,21mm	-	-	+ <6mm
	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
	3,13	-	-	-	-
1,56	-	-	-	-	

## Résultats et discussion

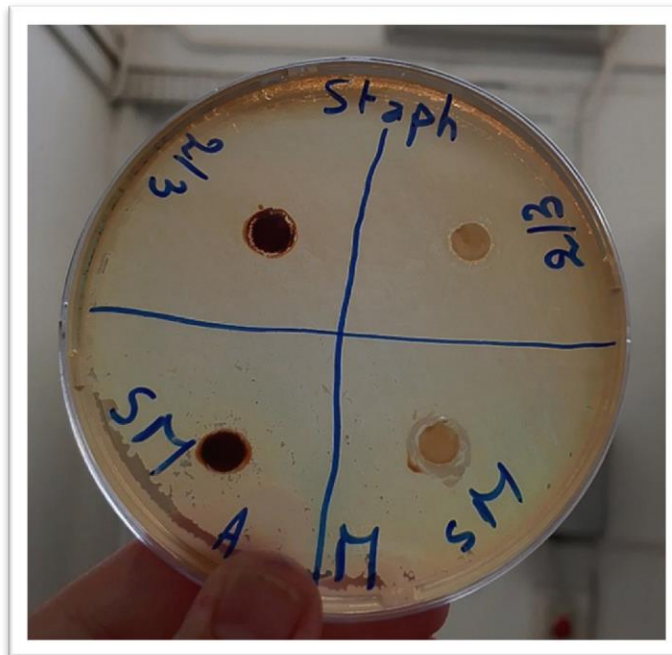
**Tableau 5.** Activité antibactérienne des extraits de l'espèce *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. à différentes concentrations et celle des antibiotiques utilisés contre les diverses souches bactériennes, exprimée en termes de diamètre d'inhibition.

Antibiotiques	Concentration	E. coli	B.subtilis	P.aeruginosa	S. aureus
Ofloxacine	(5µg/mL)	21,5±1,5mm	/	19,5±0,5mm	23±0mm
Pénicilline	(6µg/mL)	-	-	30±5mm	18±0
Cefotaximine	(30µg/mL)	37,5±2,5mm	/	/	/
Fosfomycine trométamol	(200µg/mL)	-	/	-	/
Spiramycine	(100µg/mL)	/	36,5±1,5mm	/	/
Clindamycine	(2µg/mL)	/	/	/	17±0,4mm



**Figure 37.** Activité antibactérienne des extraits AcOEt et MeOH contre *Escherichia coli*.

## Résultats et discussion



**Figure 38.** Activité antibactérienne des extraits AcOEt et MeOH contre *Staphylococcus aureus*.

La majorité des concentrations testées des extraits de la plante n'ont montré aucune activité antibactérienne contre les souches testées, à savoir : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Cependant, les concentrations les plus élevées ont démontré une activité antibactérienne modérée. Les extraits AcOEt et MeOH à 200 mg/mL et 150 mg/mL ont présenté une inhibition de la croissance bactérienne pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, comme indiqué par un (+) dans le tableau 5. Néanmoins, la zone d'inhibition observée n'était pas très étendue, variant de moins de 6 mm à 12 mm.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Alhage et Elbitar,(2019). Leur étude a évalué l'activité antimicrobienne des extraits des racines de *Asphodelus* à des concentrations variant de 1 à 10 mg/mL. En effet, ils ont constaté que les extraits (Dichlorométhane, MeOH et H<sub>2</sub>O) n'ont montré aucune activité inhibitrice significative contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, à l'exception de l'extrait méthanolique des tubercules à 10 mg/mL, qui a présenté une zone d'inhibition de 14mm pour *Staphylococcus aureus*.

La principale différence entre nos résultats et ceux d'Alhage et Elbitar réside dans les concentrations testées. Nous avons utilisé des concentrations plus élevées (150 mg/mL et 200 mg/mL). Cette différence de concentration pourrait expliquer pourquoi nous avons observé

## Résultats et discussion

---

une activité antibactérienne à ces niveaux plus élevés. Ces observations suggèrent que l'efficacité antibactérienne des extraits de *Asphodelus microcarpus* est dose-dépendante et structure-dépendante, nécessitant des concentrations plus élevées pour obtenir une inhibition significative de la croissance bactérienne.

### III-1- Antibiogramme

Les résultats obtenus ont permis d'évaluer la sensibilité de chaque souche bactérienne aux antibiotiques testés, fournissant ainsi un cadre de référence pour le comparer avec l'activité antibactérienne des extraits de *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. (Tableau 5)

### III-2- Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide


Les résultats de la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits de *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv., ont montré une variabilité dans l'efficacité antimicrobienne contre les souches testées, incluant *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats ont été évalués en observant la turbidité des cultures. L'absence de turbidité indiquait une inhibition de la croissance bactérienne, déterminant ainsi la CMI pour chaque extrait et chaque souche bactérienne. Le tableau ci-dessous résume les concentrations minimales inhibitrices observées pour chaque combinaison extrait-souche bactérienne.

**NB :** L'extrait éther de pétrole n'a pas été testé en raison de la quantité insuffisante.

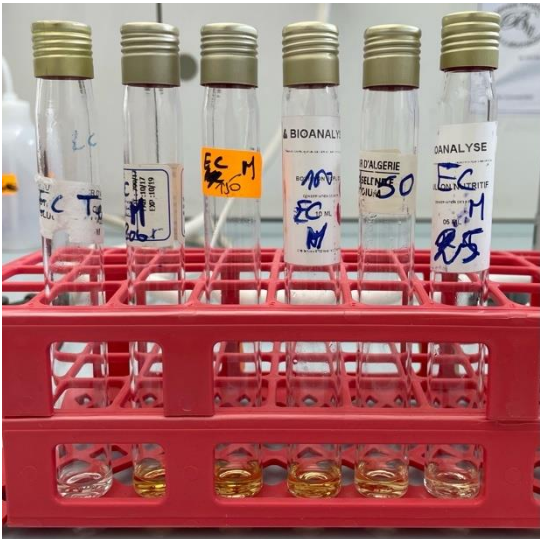
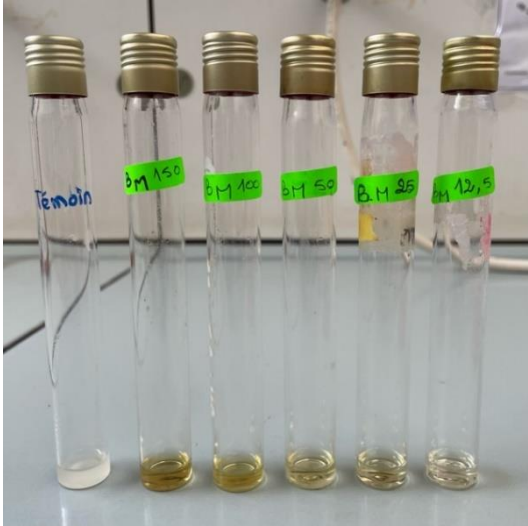
## Résultats et discussion

**Tableau 6.** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. vis-à-vis de diverses souches bactériennes.

Bactérie	Extrait	Résultats	CMI
<i>Escherichia coli</i>	AcOEt		150 mg/mL

## Résultats et discussion


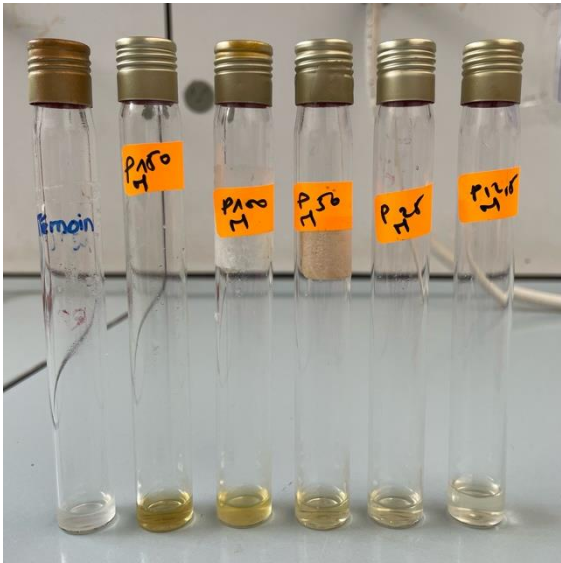
**Tableau 6.** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. vis-à-vis de diverses souches bactériennes (Suite).

Bactérie	Extrait	Resultats	CMI
<i>Escherichia coli</i>	MeOH		50 mg/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	MeOH		100 mg/mL

Ec : *Escherichia coli*, B : *Bacillus subtilis*, M : MeOH, Ac : AcOEt.

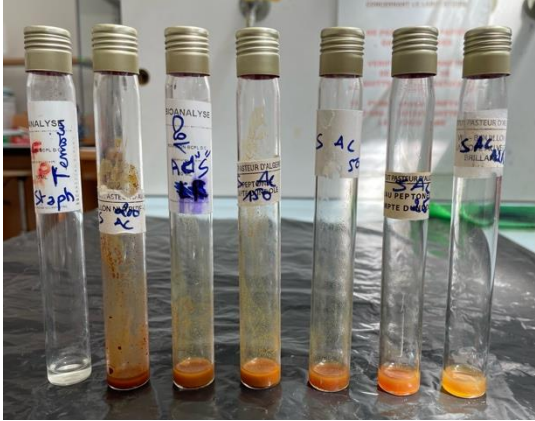

## Résultats et discussion

**Tableau 6.** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. vis-à-vis de diverses souches bactériennes (Suite).

Bactérie	Extrait	Résultats	CMI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AcOEt		100 mg/mL
	MeOH		100mg/mL

## Résultats et discussion

**Tableau 6.** Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. vis-à-vis de diverses souches bactériennes (Suite).

Bacterie	Extrait	Resultats	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	AcOEt		100 mg/mL
	MeOH		150 mg/mL

P : *Pseudomonas aeruginosa*, S : *Staphylococcus aureus*, M : MeOH, Ac : AcOEt.

Les extraits d'*Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv., montrent une variation dans leur efficacité contre différentes bactéries. Globalement, l'extrait méthanolique a montré une meilleure efficacité contre *Escherichia coli* avec une CMI plus faible (50 mg/mL) comparée à l'extrait de l'AcOEt. En revanche, pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, les deux



## Résultats et discussion

extraits (AcOEt et MeOH) semblent avoir une efficacité similaire, avec une CMI de 100 mg/mL, sachant que la souche *Bacillus subtilis* présente une résistance significative contre les antibiotiques visant les ribosomes comme cible, en les protégeant par les ions de magnésium et en augmentant la perméabilité membranaire pour ces ions, ce qui engendre sa survie (Lee et al., 2019). Pour *Staphylococcus aureus*, l'extrait AcOEt est plus efficace que l'extrait méthanolique présentant une CMI de 150 mg/mL. Cet effet modéré est probablement dû à la teneur modérée en polyphénols et en particulier les flavonoïdes. En effet les polyphénols, dont les flavonoïdes, possèdent une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif grâce à divers mécanismes.

Les polyphénols peuvent inhiber la synthèse des acides nucléiques, perturbant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN bactérien. Ils altèrent également les fonctions de la membrane cytoplasmique, provoquant des dommages structurels et fonctionnels. Certains acides phénoliques, comme l'acide caféique, compromettent la stabilité de la membrane bactérienne, tandis que d'autres, comme l'acide chlorogénique, inhibent la formation de biofilms, sachant que les bactéries Gram- sont plus sensibles à cette classe de métabolites secondaires (Coppo et Marchese, 2014 ; Shamsudin et al., 2022).

Les flavonoïdes, une classe spécifique de polyphénols, peuvent interagir avec les membranes cellulaires de bactéries perturbant la perméabilité membranaire et provoquant des fuites de composants intracellulaires. Ils endommagent les bicouches phospholipidiques de la membrane cellulaire et inhibent des enzymes essentielles à la survie bactérienne, telles que la gyrase et la topoisomérase IV, ils peuvent également se lier aux protéines de la paroi cellulaire, perturbant la fonction des ribosomes et générant un stress oxydatif. Ils inhibent la chaîne respiratoire bactérienne et la synthèse d'ATP et perturbent la formation de biofilms. (Coppo et Marchese, 2014 ; Shamsudin et al., 2022).

Il faut noter que les effets de ces molécules sont modulés par les substitutions dans leurs différents cycles qui peuvent augmenter ou diminuer l'activité antibactérienne, comme les hydroxylations, les méthyloxylation, les glycosylations, l'acétylation, la méthylation qui favorisent ou défavorisent l'effet selon leurs positions sur les différents cycles, la double liaison quant à elle améliore l'effet antibactérien contre les Gram+ (Coppo et Marchese, 2014 ; Shamsudin et al., 2022).

*Conclusion et  
perspectives*

## Conclusion Générale

---

### Conclusion

La présente étude a révélé que l'extrait de l'AcOEt de la plante *Asphodelus microcarpus Salzm. et Viv.* présente un effet antibactérien modéré, principalement en raison de sa teneur modérée en flavonoïdes. Il est cependant crucial de ne pas négliger l'impact des autres métabolites présents dans la plante, tels que les quinones, les anthrones et les anthranols qui possèdent également des propriétés antibactériennes. Ces composés peuvent parfois montrer une meilleure activité lorsqu'ils sont isolés, plutôt que combinés, ce qui est connu sous le nom d'effet antagoniste.

Afin de mieux comprendre et confirmer l'activité antibactérienne de cette plante, il est recommandé de réaliser d'abord un profil phytochimique détaillé, par exemple via LC-MS, puis d'isoler les composés spécifiques responsables de cet effet. Cela permettra de caractériser spécifiquement les différentes classes de flavonoïdes présentes et d'établir de manière certaine leur corrélation avec l'activité antibactérienne, notamment vis-à-vis des bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- Abedini, A. (2013). Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques. Lille : Université du Droit et de la Santé - Lille II, 259 p.
- Achat, S. (2013). Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques (Thèse de doctorat). Université d'Avignon, 1048.
- Alhage, J., & Elbitar, H. (2019). In vitro screening for antioxidant and antimicrobial properties of three Lebanese medicinal plants crude extracts. *Pharmacognosy Research*, 11(2), 127-133.
- AOUABED Radhia, M. N. G. D. (2023). Evaluation de l'activité antimicrobienne, antioxydant et antidiabétique des extraits de *Ruta graveolens* L., de la région de Constantine (Doctoral dissertation, Université Echahid Chikh Larbi Tebessi-Tebessa).
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Biondi, D., Cianci, P.A., Geraci, C., Ruberto, G., 1993. Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants, *Flavor fragr. j.* 8, 331-377.
- Billing, J., & Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1), 3-49.
- Blohm, W. P. (1997). Preparation of Anthrone and its C-10 derivatives: a literature review. San Jose State University.
- Bourlière, F. (1962). Quezel, P. et Santa, S.—Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, 1962. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)*, 16(4), 459-459.
- Calixto J. B., 2005a. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 131 - 134.
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 380-390.
- COWAN N. M., 1999. Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*. Vol. 12(4): 564-582.

## Références bibliographiques

---

- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Éds.). (2006). *Plant Secondary Metabolites : Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (1<sup>re</sup> éd.). Wiley.  
<https://doi.org/10.1002/9780470988558>
- Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
- Di Petrillo, A., González-Paramás, A. M., Era, B., Medda, R., Pintus, F., Santos-Buelga, C., & Fais, A. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(453).
- Diallo, H et Tall, S. (2018). Étude Phytochimique et Activité Antioxydante des Extraits de Plantes Médicinales. Mémoire Master. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine I, 70p.
- Dioguardi, M., Campanella, P., Cocco, A., Arena, C., Malagnino, G., Sovereto, D., Aiuto, R., Laino, L., Laneve, E., & Dioguardi, A. (2019). Possible uses of plants of the genus *asphodelus* in oral medicine. *Biomedicines*, 7(3), 67.
- Dobignard, A., & Chatelain, C. (2012). *Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord* Volume 4.
- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Massani L.M, Badoc A., Gmira N.(2003). Screening phytochimique d'une endémique Libéro-Marocaine, *Thymelaea luthroïdes* ; *Bull. Pharm. Bordeaux* ; 142 : 61-78 pp.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening of tannins and phenolic compounds of some Moroccan medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 17(5), 427-430.
- El Aziz, M. M. A., Ashour, A. S., & Melad, A. S. G. (2019). A review on saponins from medicinal plants : Chemistry, isolation, and determination. *J. Nanomed. Res*, 8(1), 282-288.
- FOURNIER.P. (1947) *Livre des plantes médicinales et veneneuses de France*
- Gay, M. J. (1857). Sur La Distribution Géographique Des Trois Espèces De La Section Gamon Du Genre *Asphodelus*. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 4(6), 607-612.

## Références bibliographiques

---

- Ghaleb, H., Rizk, A. M., Hammouda, F. M., & Abdel-Gawad, M. M. (1972). The active constituents of *asphodelus microcarpus* Salzm et Vivi. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 21(3), 237-251.
- Gorham, J. (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and *Hydrangea*. *Phytochemistry*, 16(2), 249-253.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Samp; Halla, N. (2016). Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria.
- Hammouda, F., Rizk, A., Ghaleb, H., & Abdel-Gawad, M. (1972). CHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES OF *ASPHODELUS MICROCARPUS* 1. *Planta Medica*, 22(06), 188-195.
- Hosni, H., Salama, A., Abudunia, A., Cherrah, Y., Ibrahim, A., & Alaoui, K. (2020). Toxicité aiguë, cytotoxicité et effet antiradicalaire de l'extrait méthanolique des feuilles de l'asphodèle, *Asphodelus microcarpus*. *Phytothérapie*, 18(5), 2
- Kabran, G. R., Ambeu, N. C., Mamyrbékova-Békro, J. A., & Békro, Y.-A. (2011). CCM D'extraits Selectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 63(4), 592-603.
- Kaufmann, S. H. E. (1997). *Host response to intracellular pathogens*: Springer et R.G.
- Koneri, Roni., Nangoy, M. J., Saroyo, & Tallei, T. E. (2017). Diversity and community composition of dragonfly (insecta: odonata) in tangkoko, nature reserve, North Sulawesi, Indonesia. *Bioscience Research*, 14(1), 1-8.
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics : Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- LA, Maroh. J.-, Bahi, C., Dje, K., Loukou, Y. G., & Guede-Guina, F. (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli* Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*.

## Références bibliographiques

---

- Lacaille-Dubois, M. A., & Wagner, H. (2000). Bioactive saponins from plants : An update. *Studies in natural products chemistry*, 21, 633-687.
- Lagnika L.(2005). Etude photochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes beninoises ; Thèse de doctorat. Strasbourg : Université Louis Pasteur, 268 p.
- Lee, D. D., Galera-Laporta, L., Bialecka-Fornal, M., Moon EShen, C. Z., Briggs, S.P., Garcia-Ojalvo, J., Süel, G. M. (2019). Magnesium flux modulates ribosomes to increase bacterial survival. *Cell*, 177.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J., *Food Chem.*, 2011, 126, 261-269.
- Mabou, F. D., & Yossa, I. B. N. (2021). TERPENES : Structural classification and biological activities. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* e-ISSN, 16, 2319-7676.
- Majeed, K. R. (2014). Morphological and anatomical study of *Asphodelus microcarpus*. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum* (P-ISSN: 1017-8678, E-ISSN: 2311-9799), 13(1).
- Mammeri, H., & Amiens, C. H. U. (2013). Mode d'action des antibiotiques. Service de bactériologie, CHU Amiens. P, 2.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Mémoire, Université de Limoges, Limoges.
- Merck E.(1980). Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier. Darmstadt, 12–153 pp.
- Moghimipour, E., & Handali, S. (2014). Saponin: properties, methods of evaluation and applications. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), 207-220.
- Muanda, Francois. N. (2018). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Université Paul Verlaine-Metz, 238.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., & Böhm V.(2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *Food Science and Technology*, 43:992-999.
- Natacha mauric *Asphodelus microcarpus* –Asphodèle a petits fruit [en ligne ] .( page consulté le 02/02/2006) [http://nature.jardin.free.fr/vivace/nmauric\\_asphodele.html](http://nature.jardin.free.fr/vivace/nmauric_asphodele.html)
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 10731, Anthranol. Retrieved June 26, 2024



## Références bibliographiques

---

- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 8418, Anthracene. Retrieved June 26, 2024
- Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). Bactériologie médicale. Elsevier Masson.
- Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report* 17: 215 - 234.
- Noudjoud Houas (2022). Synthèse, caractérisation, calculs quantiques et étude comparative de l'activité biologique d'un acide  $\alpha$ -aminophosphonique et une base de Schiff. Ferhat Abbas Sétif-1.
- Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants—Hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217.
- Ouasti, M., Chaachouay, N., Bussmann, R., & Mostafa, E. (2023). *Asphodelus aestivus* Brot., *Asphodelus fistulosus* L., *Asphodelus macrocarpus* Parl., *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv., *Asphodelus ramosus* L., *Asphodelus refractus* Boiss., *Asphodelus tenuifolius* Cav. : *Asphodelaceae* (p. 1-9).
- Pengelly, A. (2004). The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Routledge p 184 2<sup>nd</sup> Edition
- Phytotherapie, 16(S1), S254-\$262. <https://doi.org/10.3166/phyto-2019-0140>
- Poli, J. P. (2018). Recherche des mécanismes d'action des molécules à activité biologique issues des produits naturels (Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli).
- Roma-Rodrigues, C., Malta, G., Peixoto, D., Ferreira, L. M., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Branco, P. S. (2020). Synthesis of new hetero-arylidene-9 (10H)-anthrone derivatives and their biological evaluation. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103849
- Shamsudin, N.F., Ahmed, Q.U., Mahmood, S., Ali Shah, S.A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M.A., Parveen, H., & Zakaria, Z.A. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. *Molecules*, 27(1149).
- Sharma, O. P., Kumar, N., Singh, B., & Bhat, T. K. (2012). An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins. *Food Chemistry*, 132(2), 671-674.
- Sharkey, T. D., & Yeh, S. (2001). Isoprene emission from plants. *Annual review of plant biology*, 52(1), 407-436.
- Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy* (pp. 199-232). Academic Press.

## Références bibliographiques

---

- Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale, 8ème édition, 2020. [www.pasteur.dz/aarn](http://www.pasteur.dz/aarn)
- Topçu G, Ay A, Bilici A, Sankürkci C, Öztürk M, Ulubelen A. (2007). A new flavone from antioxdan textracts of Pistacia terebinthus. Food. Chem, 103: 816-822.
- Wagner, H., &Bladt, S. (2001). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer. 352 p. 2<sup>nd</sup> edition

# ***Annexes***

## Annexes

---

### Préparation des révélateurs

- **Révélation par KOH à 10 %**

Dissoudre 10g d'hydroxyde de potassium (KOH) dans 100 mL d'éthanol.

- **Révélation par  $\text{AlCl}_3$  éthanolique à 2%**

2 g d' $\text{AlCl}_3$  ont été dissout dans 100 mL d'éthanol.

- **Révélation par  $\text{FeCl}_3$  éthanolique à 1%**

1g de  $\text{FeCl}_3$  ont été pesés et ajoutés à 100 mL d'éthanol.

- **Révélation par acide sulfurique EtOH (10 :90)**

1mL d'acide sulfurique ajouté à 9mL d'éthanol.

- **Révélation par le réactif de Dragendorff**

Préparation de la solution acide d'iodobismuthate de potassium :

Pour la solution A : Mélanger 10 mL d'acide acétique glacial avec 40 mL d'eau distillée et 0,85 g de nitrate de bismuth basique (chauffé et filtré si nécessaire).

Pour la solution B : Dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 mL d'eau distillée.

Ensuite, mélanger 5 mL de la solution A avec 5 mL de la solution B, puis ajouter 20 mL d'acide acétique glacial et 100 mL d'eau distillée.

- **Révélation par vanilline sulfurique**

A : 1%. 1 g de vanilline dissous dans 100 mL d'éthanol.

B : 10%. 1 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  mélangé avec 9 mL d'éthanol.

Ensuite, 10 mL de chaque solution ont été pulvérisés sur la plaque, puis cette dernière a été placée dans l'étuve à 110°C pendant 10 minutes.

# Annexes

## Dosage de polyphénols et des flavonoïdes

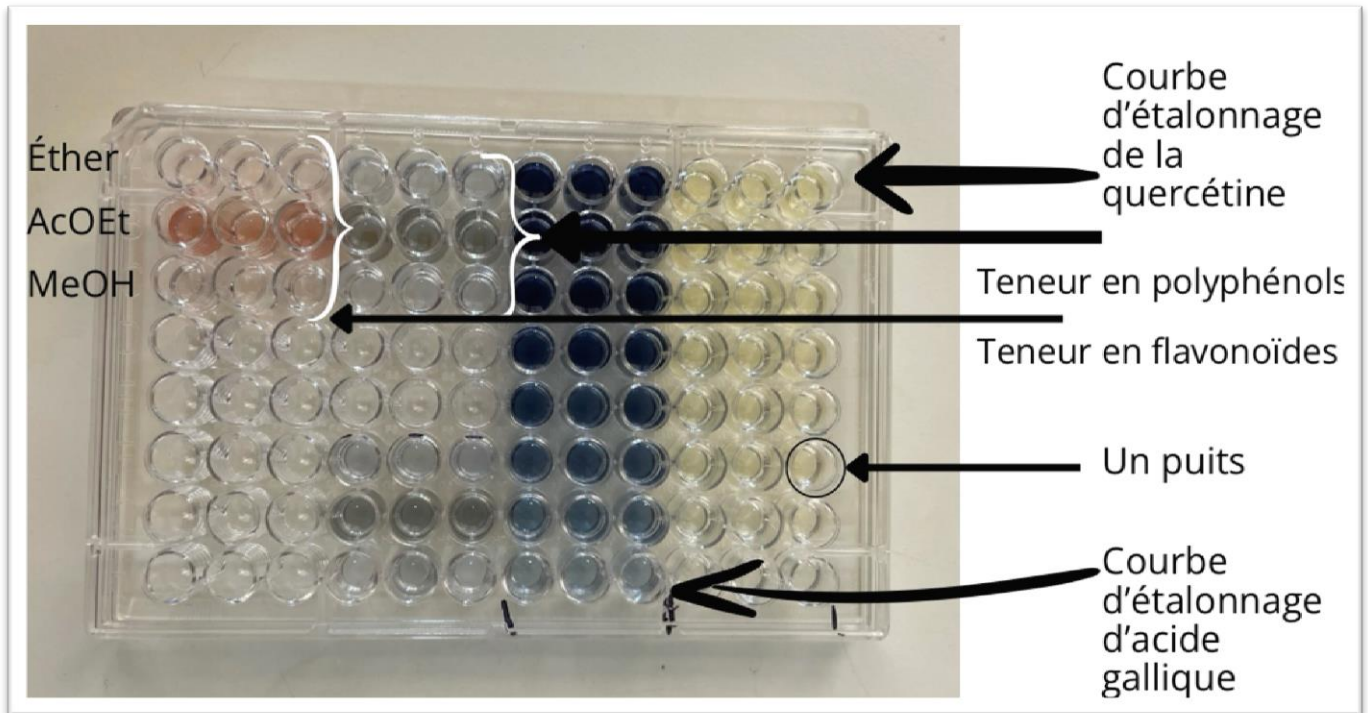
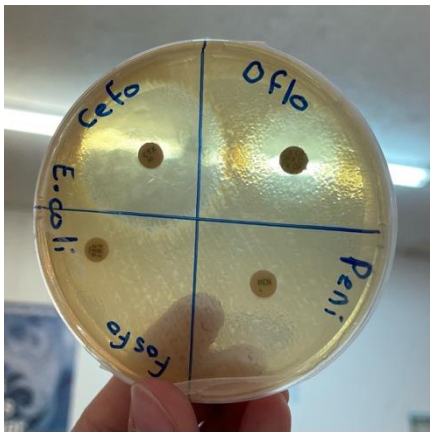
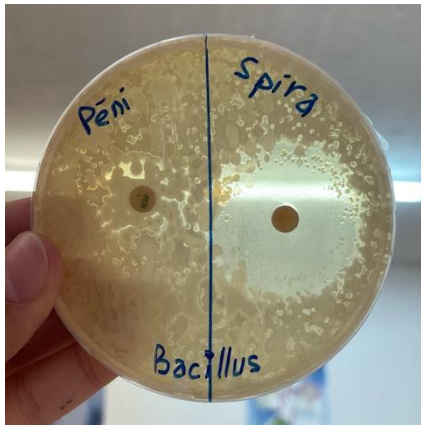


Figure 39 : Microplaque à 96 puits.

# Annexes

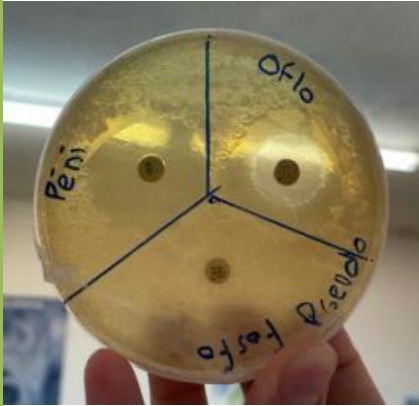

## Antibiogramme

Tableau 7. Antibiogramme réalisé sur les différentes souches bactériennes.

Bactérie	Antibiogramme	Antibiotique	Zone d'inhibition
<i>Escherichia coli</i>		Pénicilline (R)	/
		Ofloxacine (I)	21,5 mm
		Céfotaximine (S)	37,5 mm
		Fosfomycine (R) trométamol	/
<i>Bacillus subtilis</i>		Pénicilline (R)	/
		Spiramycine (S)	36,5 mm

Péni : Pénicilline, Oflo : Ofloxacine, Cefo: Céfotaximine, Fosfo : Fosfomycine trométamol, Spira : Spiramycine.

**Tableau7.** Antibiogramme des antibiotiques (témoins positifs) sur différentes souches bactériennes (Suite).

Bacterie	Resultats	Antibiotique	Zone d'inhibition
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Pénicilline (S)	30 mm
		Ofloxacine (I)	19,5 mm
		Fosfomycine (R) trométamol	/
<i>Staphylococcus aureus</i>		Pénicilline (I)	18 mm
		Ofloxacine (I)	23 mm
		Clindamycine (I)	17 mm

Clinda : Clindamycine.

(S) : Bactérie sensible à un antibiotique. (I) : Bactérie à une sensibilité intermédiaire contre un antibiotique. (R) : Bactérie résistante à un antibiotique.

# Résumés



# Résumés

---

## Résumé

Ce travail vise à étudier la composition phytochimique et l'activité antibactérienne de la partie souterraine d'*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv., une plante médicinale méditerranéenne. Les extraits ont été obtenus par extraction solide-liquide ensuite l'extrait brut est soumis à une extraction liquide-liquide utilisant des solvants de polarité croissante : éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol.

Le Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince a révélé la présence des anthrones et anthranols, des flavonoïdes, des saponines, des terpènes, des tanins et des acides phénoliques.

Le dosage quantitatif du contenu en polyphénols totaux, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'acétate d'éthyle est l'extrait présentant la plus grande quantité de polyphénols ( $101,54 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ ). De même, la teneur en flavonoïdes dosée par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  avec une valeur de ( $192,25 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$ ), ce qui indique une quantité considérable en flavonoïdes dans cet extrait.

L'activité antibactérienne des extraits a été testée par la méthode de diffusion sur disque ainsi que l'ensemencement dans un milieu liquide, contre 4 souches bactériennes à Gram- et à Gram+ à savoir : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B.subtilis*, et *S.aureus*. Seuls les extraits acétate d'éthyle et méthanol à des concentrations élevées (150 mg/mL et 200 mg/mL) ont montré une inhibition modérée sur *E. coli* et *S. aureus*. Ce pendant Les extraits d'*Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv., montrent une variation dans leur efficacité contre différentes bactéries en milieu liquide, l'extrait methanolique a montré une meilleure efficacité contre *E. coli* avec une CMI plus faible (50 mg/mL) comparée à l'extrait de l'AcOEt. En revanche, pour *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, les deux extraits (AcOEt et MeOH) semblent avoir une efficacité similaire, avec une CMI de 100 mg/mL. Pour *S. aureus*, l'extrait AcOEt est plus efficace que l'extrait methanolique présentant une CMI de 150 mg/mL.

**Mots-clés** : Plante médicinale, extraction, activité antibactérienne, *Asphodelus microcarpus*, métabolites secondaires.

## Résumés

---

### Abstract

This study aims to investigate the phytochemical composition and antibacterial activity of the underground part of *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv., a Mediterranean medicinal plant. Extracts were obtained by solid-liquid extraction, followed by liquid-liquid extraction using solvents of increasing polarity: petroleum ether, ethyl acetate, and methanol.

Phytochemical screening by Thin Layer Chromatography revealed the presence of anthrones and anthranols, flavonoids, saponins, terpenes, tannins, and phenolic acids.

Quantitative analysis of the total polyphenol content, using the Folin-Ciocalteu method, showed that ethyl acetate extract has the highest amount of polyphenols ( $101.54 \pm 0.72$   $\mu\text{g/mL}$ ). Similarly, the flavonoid content, measured by the  $\text{AlCl}_3$  method, was found to be ( $192.25 \pm 0.44$   $\mu\text{g/mL}$ ), indicating a considerable amount of flavonoids in this extract.

The antibacterial activity of the extracts was tested using the disc diffusion method and liquid medium inoculation, against 4 Gram-negative and Gram-positive bacterial strains: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, and *S. aureus*. Only the ethyl acetate and methanol extracts at high concentrations (150 mg/mL and 200 mg/mL) showed moderate inhibition against *E. coli* and *S. aureus*. However, the extracts of *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. showed variability in their effectiveness against different bacteria in liquid medium. The methanolic extract showed better effectiveness against *E. coli* with a lower MIC (50 mg/mL) compared to the ethyl acetate extract. On the other hand, for *P. aeruginosa* and *B. subtilis*, both extracts (AcOEt and MeOH) seemed to have similar effectiveness, with an MIC of 100 mg/mL. For *S. aureus*, the ethyl acetate extract was more effective than the methanolic extract, with an MIC of 150 mg/mL.

**Keywords:** Medicinal plant, extraction, antibacterial activity, *Asphodelus microcarpus*, secondary metabolites.

### ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيب الكيميائي النباتي والنشاط المضاد للبكتيريا للجزء الجوفي من *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. وهو نبات طبي متوسطي. تم الحصول على المستخلصات عن طريق الاستخلاص الصلب-السائل، ثم تم إخضاع المستخلص الخام لاستخلاص سائل-سائل باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة: إيثير البترول، خلات الإيثيل، والميثانول.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود الأنترونات والأنترانولات، الفلافونويدات، الصابونينات، التربينات، التانينات والأحماض الفينولية.

أظهر التحليل الكمي لمحتوى الفينولات الكلية باستخدام طريقة فولين-سيوكالتي أن مستخلص خلات الإيثيل يحتوي على أعلى كمية من الفينولات ( $101.54 \pm 0.72$  ميكروغرام/مل). وبالمثل، تبين أن محتوى الفلافونويدات، الذي تم قياسه بطريقة AIC13، هو ( $192.25 \pm 0.44$  ميكروغرام/مل)، مما يشير إلى كمية كبيرة من الفلافونويدات في هذا المستخلص.

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات باستخدام طريقة الانتشار على الأقراص وزرعها في وسط سائل، ضد أربع سلالات بكتيرية موجبة وسالبة الجرام: *E. coli*، *P. aeruginosa*، *B. subtilis*، و *S. aureus*. أظهرت مستخلصات خلات الإيثيل والميثانول بتركيزات عالية (150 مجم/مل و 200 مجم/مل) تثبيطاً معتدلاً ضد *E. coli* و *S. aureus*. ومع ذلك، أظهرت مستخلصات *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. نقاوياً في فعاليتها ضد البكتيريا المختلفة في الوسط السائل. أظهر المستخلص الميثانولي فعالية أفضل ضد *E. coli* مع MIC أقل (50 مجم/مل) مقارنةً بمستخلص خلات الإيثيل. من ناحية أخرى، بالنسبة لـ *P. aeruginosa* و *B. subtilis*، بدت كلا المستخلصات (AcOEt و MeOH) فعالة بشكل مشابه، مع MIC قدره 100 مجم/مل. بالنسبة لـ *S. aureus*، كان مستخلص خلات الإيثيل أكثر فعالية من المستخلص الميثانولي، مع MIC قدره 150 مجم/مل.

**الكلمات المفتاحية:** نبات طبي، استخلاص، نشاط مضاد للبكتيريا، *Asphodelus microcarpus*، مركبات

ثانوية.

**Année universitaire :** 2023-2024

**Présenté par :** Bouziane Sara Nihel

**Date de soutenance :** 13/06/2024

Madani Amani

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire Des Microorganismes**

**Thème :** Screening phytochimique des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv. et évaluation de leur activité antibactérienne

Ce travail vise à étudier la composition phytochimique et l'activité antibactérienne de la partie souterraine d'*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv., une plante médicinale méditerranéenne. Les extraits ont été obtenus par extraction solide-liquide ensuite l'extrait brut est soumis à une extraction liquide-liquide utilisant des solvants de polarité croissante : éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol. Le Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince a révélé la présence des anthrones et anthranols, des flavonoïdes, des saponines, des terpènes, des tanins et des acides phénoliques. Le dosage quantitatif du contenu en polyphénols totaux, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'acétate d'éthyle est l'extrait présentant la plus grande quantité de polyphénols ( $101,54 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ ). De même, la teneur en flavonoïdes dosée par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  avec une valeur de ( $192,25 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$ ), ce qui indique une quantité considérable en flavonoïdes dans cet extrait. L'activité antibactérienne des extraits a été testée par la méthode de diffusion sur disque ainsi que l'ensemencement dans un milieu liquide, contre 4 souches bactériennes à Gram- et à Gram+ à savoir : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, et *S. aureus*. Seuls les extraits acétate d'éthyle et méthanol à des concentrations élevées (150 mg/mL et 200 mg/mL) ont montré une inhibition modérée sur *E. coli* et *S. aureus*. Ce pendant Les extraits d'*Asphodelus microcarpus* Salzm. & Viv., montrent une variation dans leur efficacité contre différentes bactéries en milieu liquide, l'extrait methanolique a montré une meilleure efficacité contre *E. coli* avec une CMI plus faible (50 mg/mL) comparée à l'extrait de l'AcOEt. En revanche, pour *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, les deux extraits (AcOEt et MeOH) semblent avoir une efficacité similaire, avec une CMI de 100 mg/mL. Pour *S. aureus*, l'extrait AcOEt est plus efficace que l'extrait methanolique présentant une CMI de 150 mg/mL.

**Mots-clés :** Plante médicinale, extraction, activité antibactérienne, *Asphodelus microcarpus*, métabolites secondaires.

**Laboratoires de recherche :** laboratoire de Biochimie Appliquée

**Jury d'évaluation :**

**Présidente :** BENSARI Souheir (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrante :** OUELBANI Rayene (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examinatrice :** MERIANE Ilhem (MAA- U Constantine 1 Frères Mentouri).