

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Etude analytique et biologique des extraits phytochimique de
l'espèce *Bupleurum fruticosum L.* (Buplèvres)**

Présenté par :

Melle CHALAH Celia

Melle DOUAOUDA Damia

Soutenu publiquement, le 27/09 / 2023, devant le Jury composé de :

Mme IGHILAHRIZ	Karima	MCB	UMMTO	Présidente
Mr BENCHOULAK	Mounir	MAA	UMMTO	Encadrant
Mr BAIT	Larbi	MAA	UMMTO	Examineur
Mlle TOUZOURT	Saida	MCA	UMBB	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nos remerciements les plus sincères vont à toute personne ayant eu la bonté et la patience de satisfaire notre curiosité et de nous aider dans notre travail par leurs précieux conseils, réponses et recommandations.

Nous remercions en particulier, notre encadrant **Mr BEN CHOULAK Mounir** tout d'abord pour nous avoir proposé cette intéressante thématique et nous avoir encadré durant ce travail. Nous adressons toute notre gratitude et notre profonde reconnaissance pour nous avoir fait bénéficier de son savoir et de son expérience scientifique, avec tant de passion et de pédagogie pour ses conseils avisés et ses remarques toujours constructives sur notre travail.

Nous remercions vivement les membres de jury **Mme IGHILHRIZ Karima, Mr BAIT Larbi et Melle TAZOUIRT Saida** pour le privilège qu'ils nous font, de l'intérêt porté à notre thématique et d'avoir accepté de présider et d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs recommandations.

Nous citons en particulier **Mme KOULALI Djedjega** chef de service du laboratoire de mycologie et microbiologie du CHU de nous avoir permis d'assurer la partie pratique de notre travail. Et **Mr DERIAS Fatsah** le botaniste du PNG pour son aide.

Pour conclure, nous souhaitons adresser nos remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail

A mes chers parents source de tendresse et de force et d'affection

A mes chers frères et ma sœur

A ma grand-mère

A mes chers oncles et tantes

A mes chers cousins

A ma chère copine

A toute les personnes que je porte dans le cœur

Celia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mes parents

Mes grands-parents

Mes sœurs : Djouher et Laeticia

Mon frère : Anis

Mes oncles : Mouloud, Karim et Saïd

Mes tantes : Djamila, Djedjega, Dalila et Ghenima

Mes copines : Lysa, Farroudja et Nadjat

Et à tous mes proches

Damia

Liste des abréviations

AA : activité antioxydante ;

Abs : absorbance ;

ADN : acide désoxyribonucléique ;

ARN : acide ribonucléique ;

ATCC : American Type Culture Collection ;

CCM : Chromatographie sur couche mince ;

CHU : centre hospitalier universitaire ;

CPG : chromatographie en phase gazeuse ;

DMSO : diméthylsulfoxyde ;

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl ;

ERO : espèce réactive de l'oxygène ;

HPLC-UV : chromatographie liquide à haute performance couplée à l'ultraviolet ;

IC50 : concentration inhibitrice à 50% ;

KD : kilo dalton ;

ME : masse de l'extrait ;

MF : Mac Ferland ;

Mg EAG/g E : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait ;

Mg EQ/g E : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait ;

MS : matière sèche ;

Nm : nanomètre ;

PNG : Parc Nationale de Gouraya ;

R : rendement ;

Tr/min : tour par minute ;

UMMTO : université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ;

UV-Visible : ultraviolet-Visible ;

Liste des figures

Figure 1 : Principales substances élaborées par les plantes médicinales	5
Figure 2 : Structure de base d'un composé phénolique	6
Figure 3 : Composés phénoliques	7
Figure 4 : schéma général d'une extraction végétale solide/liquide	9
Figure 5 : Répartition géographique mondiale des Apiaceae	11
Figure 6 : Répartition géographique du genre <i>Bupleurum fruticosum</i> L.	11
Figure 7 : L'espèce <i>Bupleurum fruticosum</i> L. au niveau du PNG.....	12
Figure 8 : Balance d'équilibre entre le système pro-oxydant et antioxydant	14
Figure 9 : La situation géographique de la station de récolte (Google Maps, 2023).....	19
Figure 10 : Séchage de <i>Bupleurum fruticosum</i> L.....	21
Figure 11 : Diagramme de travail expérimental.....	21
Figure 12 : Filtrats hydro-méthanoliques et dichlorométhaniques des trois organes de la plante <i>Bupleurum fruticosum</i> L.	22
Figure 13 : Dispositif d'extraction	24
Figure 14 : Décantation des extraits hydro-méthanoliques	25
Figure 15 : Appareil de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	27
Figure 16 : Extraits hydro-méthanoliques des feuilles, tiges et racines.....	33
Figure 17 : Courbe d'étalonnage établi avec l'acide gallique.....	34
Figure 18 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques feuilles, tiges et racines	35
Figure 19 : Courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.....	36
Figure 20 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits hydro-méthanoliques feuilles, tiges et racines.	36
Figure 21 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles	39
Figure 22 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des tiges.....	40
Figure 23 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des racines.....	40
Figure 24 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.	41
Figure 25 : Test de Piégeage du radical libre DPPH des extraits hydro-méthanoliques du <i>Bupleurum fruticosum</i> L.	42
Figure 26 : Aromatogrammes des activités antibactériennes des extraits hydro-méthanoliques.	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de la plante <i>Bupleurum fruticosum</i> L.....	12
Tableau 2 : Dénomination de l'espèce <i>Bupleurum fruticosum</i> L.....	13
Tableau 3 : Récapitulatif des principales espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs caractéristiques	15
Tableau 4 : Les différents types des antioxydants	16
Tableau 5 : Réactifs et produits utilisés... ..	20
Tableau 6: Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des feuilles	31
Tableau 7 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des tiges	31
Tableau 8 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des racines.....	32
Tableau 9 : Résultats des rendements d'extraction des extraits de différents organes	33
Tableau 10 : Absorbances de la gamme d'acide gallique à différentes concentrations	34
Tableau 11 : Absorbances de la gamme de la quercétine à différentes constatations.....	35
Tableau 12 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des feuilles	38
Tableau 13 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des tiges	38
Tableau 14 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des racines.....	38
Tableau 15: Concentrations d'inhibition minimales IC50 des extraits végétaux	41
Tableau 16 : Diamètre d'inhibition des extraits contre <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Tableau 17 : Diamètre d'inhibition des extraits contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tableau 18 : Diamètre d'inhibition des extraits contre <i>Escherichia coli</i>	43

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
1 Généralités.....	3
1.1 Plantes médicinales	3
1.2 Phytothérapie.....	3
1.3 Phytochimie.....	3
2 Composition des plantes médicinales	3
2.1 Métabolites primaires	3
2.1.1 Glucides.....	4
2.1.2 Lipides.....	4
2.1.3 Protéines	4
2.2 Métabolites secondaires	4
2.2.1 Alcaloïdes.....	5
2.2.2 Terpénoides	5
2.2.3 Saponosides.....	6
2.2.4 Huiles essentielles... ..	6
2.2.5 Composés phénoliques... ..	6
2.2.5.1 Tanins... ..	7
2.2.5.2 Flavonoïdes	7
2.2.5.3 Coumarines.....	8
3 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires	8
3.1 Extraction végétale.....	8

4 Méthodes d'analyses et d'identifications des métabolites secondaires.....	9
4.1 Chromatographie en phase liquide couplé à l'ultra-violet (HPLC-UV).	10
5 Etude botanique.....	10
5.1 Famille desapiaceae.....	10
5.2 Genre Bupleurum... ..	11
5.3 Etude botanique de Bupleurum fruticosum.....	12
5.3.1 Description botanique	12
5.3.2 Classification botanique	13
5.3.3 Composition chimique	13
6 Propriétés thérapeutique	13
7 Intérêt médicinale.....	14
7.1 Activité antioxydante	14
7.1.1 Stress oxydatif.....	14
7.1.2 Les radicaux libres	14
7.1.3 Les antioxydants.....	16
7.2 Activité antibactérienne.....	16
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	19
1 Zone d'étude.....	19
2 Matériels.....	19
2.1 Appareillages et équipements.....	19
2.2 Réactifs et produits.....	20
3 Méthodes.	20
3.1 Préparation de la matière végétale.....	20
3.2 Traitement et préparation des échantillons.....	21
3.3 Criblage phytochimique.....	22
3.4 Préparations des infusés	22
3.4.1 Test des saponisides	22
3.4.2 Test des polyphénols... ..	23
3.4.3 Test des des flavonoïdes.....	23

3.4.4 Test des coumarines...	23
3.4.5 Test des tanins...	23
3.4.6 Test des tri-terpènes.....	23
3.4.7 Test des alcaloïdes.....	23
3.4.8 Test de l'amidon.....	24
3.4.9 Test des composés réducteurs	24
3.5 Extraction des composés polyphénoliques de <i>Bupleurum fruticosum</i>	24
3.5.1 Dispositif d'extraction	24
3.5.2 Principe de l'extraction	24
3.6 Détermination du rendement d'extraction.....	26
3.7 Dosage des polyphénols totaux	26
2.8 Dosage des flavonoïdes totaux	27
3.9 Identification des composés polyphénoliques par HPLC-UV	27
3.10 Analyse des activités biologiques des extraits hydro-méthanoliques.	28
3.10.1 Evaluation de l'activité antioxydante	28
3.10.2 Evaluation de l'activité antibactérienne	29
3.10.2.1 Les souches bactériennes cibles	30
3.10.2.2 Milieu de culture	30
3.10.2.3 Inoculum bactérien	30
3.10.2.4 Préparations des solutions	30
3.10.2.5 Imprégnation des disques	30
Chapitre III : Résultats et Discussion	31
1 Criblage phytochimiques.....	31
2 Rendement d'extraction	33
3 Dosage des composés phénoliques	34

3.1 Dosage des polyphénols totaux	34
3.2 Dosage des flavonoïdes totaux	35
4 Analyse Chromatographique HPLC-UV	38
5 Analyse des activités biologiques des extraits hydro-méthanolique de <i>Bupleurum</i> <i>Fruticosum.L</i>	39
5.1 Evaluation de l'activité antioxydante	39
5.2 Evaluation de l'activité antibactérienne	42
Conclusion et perspectives	45

Annexes

Références bibliographiques

Résumé

Introduction générale

Les humains possèdent une connaissance pharmacologique discrète des propriétés thérapeutiques des plantes depuis le début de leur histoire évolutive, laissant des empreintes dans le patrimoine culturel préhistorique et ultérieur. Ces dernières années, le secteur pharmaceutique se tourne de nouveau vers l'incorporation des molécules bioactifs issus des plantes aux caractéristiques chimiques et biologiques originales dénués de tout effet nocif dans ses formulations afin de remplacer les médicaments thérapeutiques synthétiques.

De nos jours, les propriétés des composés phénoliques sont largement étudiées dans le domaine médical, où on leur reconnaît des activités antivirales, antibactériennes, antiallergiques, anti-tumorales mais aussi anti-inflammatoires. Par ailleurs, les composés phénoliques présentent des propriétés botaniques importantes. Ils sont responsables de la couleur vive des fleurs, des fruits et de certaines feuilles. Les polyphénols sont des métabolites secondaires très diversifiés. On estime que chaque végétal produit au moins une centaine de molécules différentes. Il y a plusieurs classes de métabolites secondaires dont les plus étudiées actuellement sont les composés phénoliques reconnus comme de bons antioxydants par excellence [1].

Cependant, l'évaluation des propriétés thérapeutiques, antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs [2].

Notre étude, vise principalement à quantifier les composés phénoliques des différents organes (feuilles, tiges, racines) du *Bupleurum fruticosum L.* et à déterminer leurs activités biologiques (antioxydante et antibactérienne).

Le premier chapitre consiste une synthèse bibliographique qui décrit le contexte global de phytothérapie, les plantes médicinales et leurs compositions, les méthodes d'extraction et d'identification des métabolites secondaires, et aussi une étude botanique de la famille des apiacées et du genre *Bupleurum fruticosum L.* ainsi son intérêt médicinal.

Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale qui renferme le matériel et méthodes utilisés au cours de notre travail à savoir l'extraction des trois organes de la plante, screening phytochimique suivi par la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes ainsi que l'analyse chromatographique HPLC-UV, les protocoles utilisés au cours d'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne.

Le troisième chapitre porte les résultats obtenus au cours de notre travail et leur discussion.

Enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

Les plantes s'imposent sur la planète par leur aspect, leur exubérance et leur mystère. Depuis les temps les plus reculés, l'homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux et il a appris à ses dépens à discerner les plantes toxiques. Ces connaissances, transmises d'abord oralement, l'ont ensuite été dans les écrits et il subsiste des traces de l'emploi des plantes comme médicaments par les Anciens dans les plus vieilles civilisations [3].

1. Généralités

1.1. Plantes médicinales

Selon la définition de la pharmacopée Française : « les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la pharmacopée Européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [4].

1.2. Phytothérapie

Etymologiquement, le mot phytothérapie provient de deux mots grecs : *phuton* qui signifie plante et *therapeia* qui signifie traitement. Donc la phytothérapie est une thérapeutique destinée à traiter certains troubles fonctionnels et certains états pathologiques aux moyens des végétaux, de parties de végétaux ou des préparations à base des végétaux [5].

On distingue deux types de phytothérapie : la phytothérapie traditionnelle et la phytothérapie clinique [5].

1.3. Phytochimie

C'est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes [6].

2. Composition des plantes médicinales

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Mais il existe une exclusivité du monde végétal appelé métabolisme secondaire [7].

2.1. Métabolites primaires

Le métabolite primaire regroupe toutes les voies de synthèse de composés indispensables à la croissance de la plante. Les métabolites primaires qui en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucre et polysaccharides ...).

2.1.1. Glucides

Ils sont des composés organiques carbonylés polys hydroxylés. Ce sont surtout des éléments de soutien ou de réserve énergétique, précurseurs obligatoires des autres métabolites [8].

Ils représentent pour les végétaux :

- Un moyen de stockage de l'énergie solaire, ils forment le groupe le plus important, sous forme de polymère (amidon) ;
- Des éléments de soutien, ils participent à la structure du végétal (cellulose...) ;
- Constituants de métabolites (les enzymes, acide nucléiques, hétérosides...) ;
- Des précurseurs des autres métabolites [8].

2.1.2. Lipides

Ce sont des substances naturelles, constituées d'esters d'acides gras et d'un alcool ou d'un polyol. Appelés aussi des corps gras, ce sont des substances hydrophobes et parfois amphiphiles, solubles dans les solvants organiques polaires et apolaires et sont non volatils.

Ils rentrent dans les constituants de structures cellulaires tels les glycolipides, les phospholipides membranaires, ils peuvent aussi être des éléments de revêtement comme les cires ou les cutines, mais aussi des substances de réserves, sources d'énergies [8].

2.1.3. Protéines

Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines. Constituées principalement d'acides aminés, elles jouent un rôle fonctionnel (les enzymes) et un rôle dans la structure du végétal. Le rôle diététique des protéines végétales est loin d'être négligeable mais également leur utilisation en pharmacie aussi bien dans le domaine médicale ou industriel (chimique ou agroalimentaire) [8].

2.2. Métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection les contre UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...). Certains de ces composés participent à la défense contre les bios agresseurs. Les produits des métabolismes secondaires sont très nombreux, plus de 200.000 structures ont été identifiées. On distingue classiquement quatre grandes catégories de métabolites secondaires chez les plantes : les

composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes et composés azotés et les composés terpéniques.

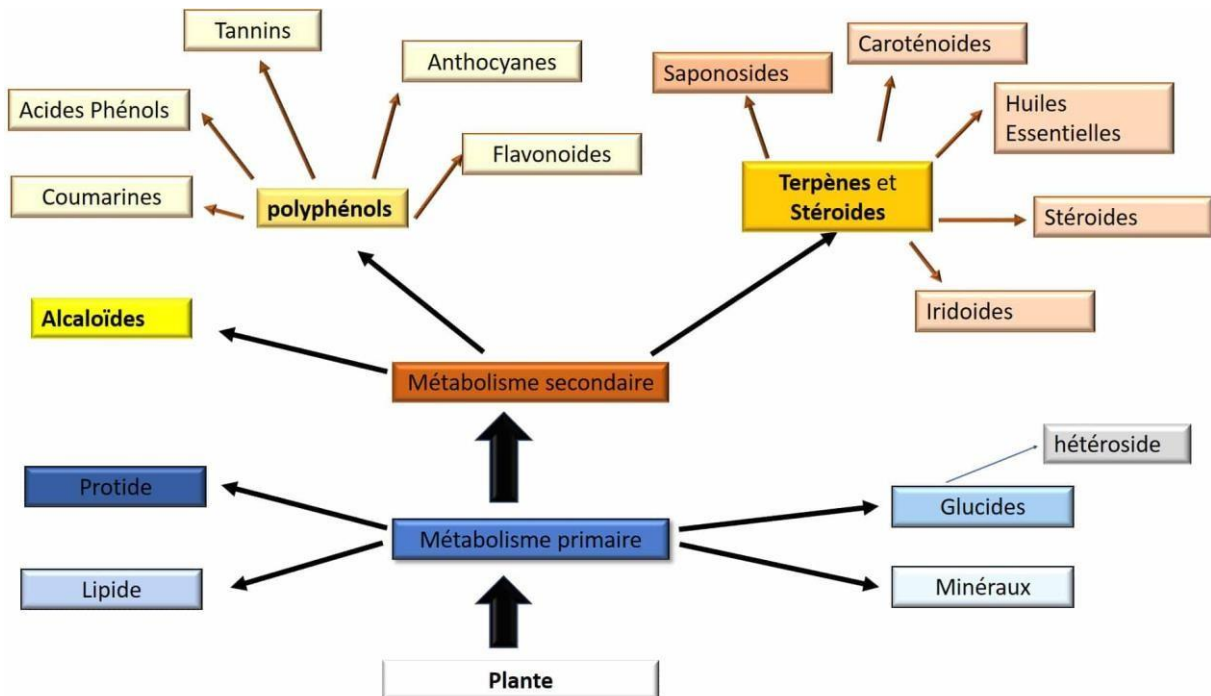


Figure 1 : Principales substances élaborées par les plantes médicinales [9].

2.2.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes initialement définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils ont une structure complexe : leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative [10].

2.2.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des molécules avec un nombre de carbones multiple de 5, de formule brute générale $(C_5H_8)_n$ et dont le précurseur est l'isoprène ($n=1$). Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, ce sont donc des molécules hydrophobes. Ils sont stockés dans les vacuoles au niveau des épines, des racines, ou encore des feuilles. Ils sont produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composés majeurs de la résine et de l'essence végétale [10].

2.2.3. Saponosides

Les Saponosides ou saponines sont des hétérosides de PM élevé, constitués d'un ou plusieurs oses et d'une génine stéroïdique à 27 atomes de carbone. Ils sont caractérisés principalement par leurs propriétés tensioactives. Ces propriétés se traduisent notamment par la formation de mousse par agitation dans l'eau (pouvoir aphrogène). De plus, la plupart des Saponosides présentent des propriétés hémolytiques [10].

2.2.4. Huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles contenues dans les végétaux. Elles sont largement réparties dans le règne végétal et certaines familles en sont particulièrement riches [10].

2.2.5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils sont caractérisés par la présence de groupements phénoliques : un ou plusieurs cycles aromatiques (benzéniques) porteurs d'un ou plusieurs OH.

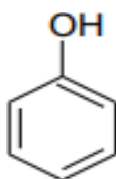


Figure 2 : Structure de base d'un composé phénolique.

La désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (fonctions phénols).

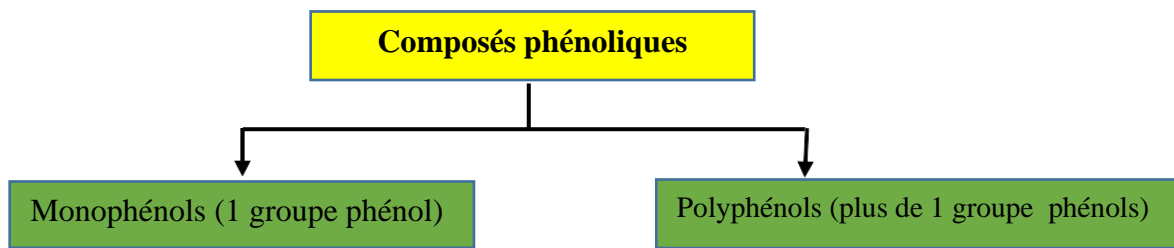


Figure 3 : Composés phénoliques.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois). Ils sont synthétisés par les plantes soumises à des conditions difficiles (infections, blessures, radiation UV, ...) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins.

2.2.5.1. Tanins

Ils sont définis comme étant des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 kD (polymères), ayant la propriété de tanner la peau (la rendre imputrescible). Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides). On distingue :

- Les tanins hydrolysables ou galliques : ce sont des esters d'un sucre ; généralement le glucose ou d'un polyol et d'un acide phénol : acide gallique.
- Les tanins condensés ou catéchiques : ce sont des dérivés non hydrolysables, résultant de la polymérisation de plusieurs unités « flavane ». Ce groupe, n'ayant pas tous des propriétés tannantes [10].

2.2.5.2. Flavonoïdes

Sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits et parfois des feuilles. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal et on les trouve en abondance dans les organes jeunes : feuilles et boutons floraux.

Les flavonoïdes dérivent tous de la flavone (ou 2-phénylchromone) et existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides [10].

2.2.5.3. Coumarines

Elles ont été isolées pour la première fois en 1820 ; Ce sont des 2-*H*-1-benzopyran-2-one que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-*Z*-cinnamiques [10].

Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge clarée et la lavande. Les coumarines sont des composés phénoliques des végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure.

3. Méthode d'extraction des métabolites secondaires

L'extraction est un procédé de séparation d'une substance à partir d'un mélange. C'est l'étape la plus importante à réaliser, puis une étape de purification s'ensuit pour l'élimination des impuretés, afin d'étudier : la quantité, la structure et l'activité biologique d'une biomolécule [11].

Pour chacune des biomolécules, il existe plusieurs méthodes d'extraction : traditionnelles (conventionnelles) et modernes (non conventionnelles), et chaque méthode influe sur les résultats finals, mais aucune n'est considérée comme standard pour l'extraction. Donc une biomolécule nécessite la méthode adéquate pour son extraction. L'efficacité de quelconque méthode dépend essentiellement de plusieurs facteurs : la nature du composé, le solvant, la température, la pression et le temps [11].

Dans notre travail nous nous intéressons à la technique d'extraction solide-liquide autrement dite extraction végétale.

3.1. Extraction végétale

L'extraction végétale est un procédé visant à extraire des composants présents dans les plantes. Comme il est montré dans la figure 04.

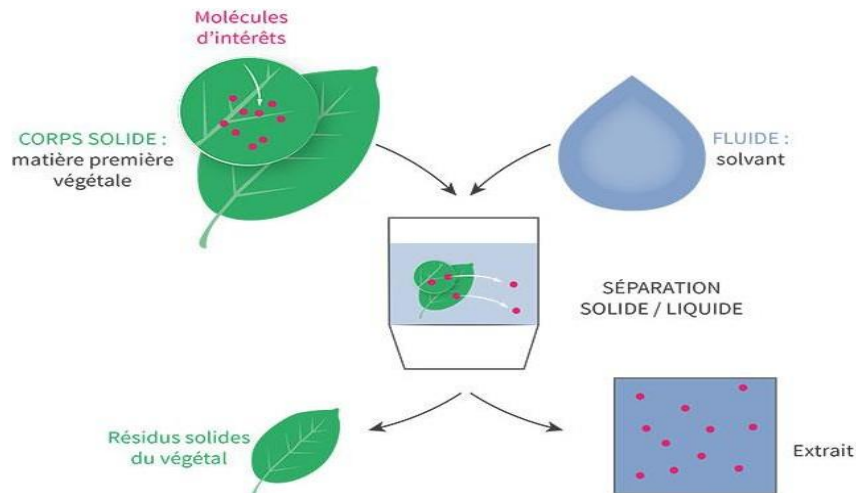


Figure 4 : Schéma général d'une extraction végétale solide/liquide [12].

Le schéma général de l'extraction solide/liquide est déclinable de cinq manières différentes : [12]

La macération : cette méthode est utilisée pour les différentes parties de la plante. La macération consiste à maintenir en contact la drogue avec un solvant ou mélange de solvant polaire à température ambiante pendant une durée de 30min à 4h.

La décoction ou reflux : la phase de contact est maintenue à température d'ébullition du solvant.

La digestion : la phase de contact est maintenue à une température intermédiaire aux deux premiers cas.

L'infusion : le solvant bouillant est versé sur le solide puis mis à refroidir durant un temps donné.

La lixiviation ou percolation : le solvant passe à travers la biomasse.

4. Méthodes d'analyses et d'identifications des métabolites secondaires

Afin de séparer ces mélanges obtenus par extraction on fait référence à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les volatils et la chromatographie en phase liquide (HPLC) pour les composés pas ou peu volatils. Il existe d'autres techniques chromatographiques telle que la

CCM qui fournissent facilement des informations qualitatives et grâce auxquelles il devient possible d'obtenir des données quantitatives.

4.1. Chromatographie en phase liquide couplé à l'ultra-violet (HPLC –UV)

Il s'agit d'une technique analytique combinant à la fois les performances de la chromatographie en phase liquide et l'ultra-violet. L'objectif est d'identifier ou de quantifier précisément de nombreuses substances organiques de types principes actifs ou contaminants dans diverses matrices : produits cosmétiques, produits pharmacologiques, matrices biologiques. Deux blocs principaux composent une unité HPLC-MS : un chromatographe en phase liquide et un détecteur UV.

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques : la spectroscopie de masse, la spectrométrie infrarouge, la spectrophotométrie UV-visible et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone. Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structural.

5. Etude botanique

5.1. Famille des apiaceae

La famille des apiaceae est une famille de plantes appartenant à la classe des dicotylédones, anciennement nommés ombellifères, regroupant les plantes qui ont une inflorescence en forme d'ombelle [13]. Cette famille compte plus de 3000 espèces réparties en 420 genres, se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord [14]. Le sol algérien compte environ 55 genres regroupant 117 espèces. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les uns des autres [15].

Les plantes de cette famille sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés pharmacologique et économique en raison de la présence des métabolites secondaires tels que : les saponines, les alcaloïdes, les huiles essentielles, les polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines et les poly-acétylènes.

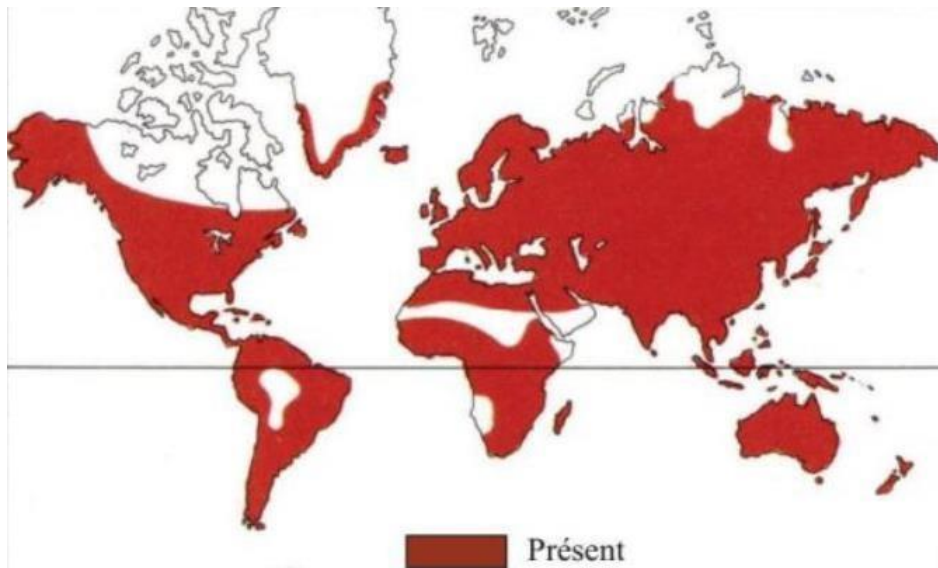


Figure 5 : Répartition géographique mondiale des Apiaceae [16].

5.2. Genre bupleurum

Il constitue l'un des de la famille des apiécées, représenté par environ 200 espèces. Ce genre est essentiellement localisé dans l'hémisphère Nord (Europe, Afrique du Nord, Asie, Amérique du Nord et dans l'air méditerranéenne) [17].

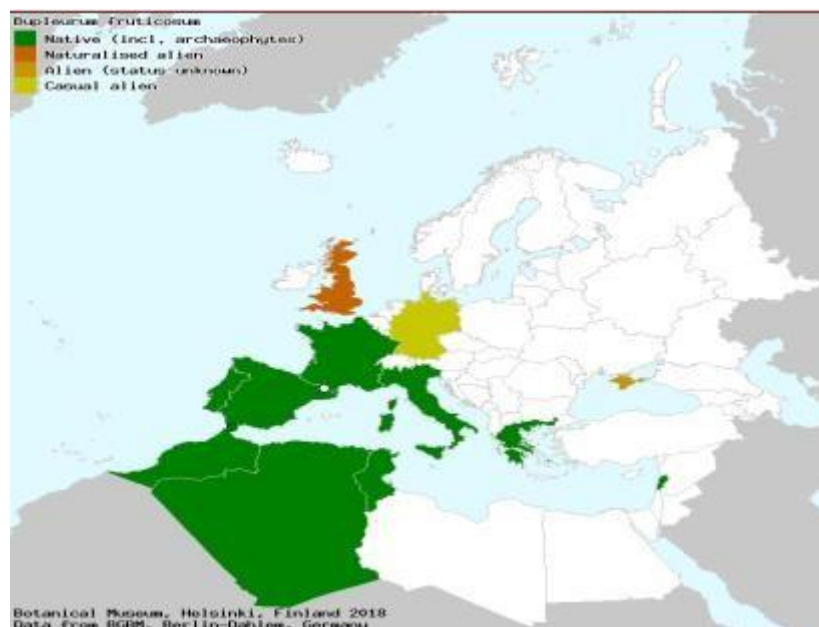


Figure 6 : Répartition géographique du genre *Bupleurum fruticosum* L. [12].

5.3. Etude botanique de *Bupleurum fruticosum L.*

5.3.1. Description botanique

Bupleurum fruticosum L. est une plante arbustive de la famille des apiacées, vivace persistante atteignant 1-2m de haut, on la trouve partout dans l'hémisphère nord, en Asie, en Amérique du Nord et en Europe et en particulier dans les régions méditerranéennes. [18].

Tableau 1 : Caractéristique de la plante *Bupleurum fruticosum L.*

<ul style="list-style-type: none"> • Ses feuilles sont très courtement pétiolées, ovales, mucronées, coriaces, glabres, plus glauques au revers, à nervure principale très développée et à marge translucide Réseau de nervures secondaires développé et bien visible et une odeur forte au froissement.
<ul style="list-style-type: none"> • Ombelles convexes, à 8-20 rayons égaux.
<ul style="list-style-type: none"> • Pétales jaune d'or. Anthères jaunes. Stylopode jaune.
<ul style="list-style-type: none"> • Fruit : Akène, ovoïde, 4-8 mm, noirâtre, à côtes très saillantes.
<ul style="list-style-type: none"> • Floraison : d'Avril à Août.
<ul style="list-style-type: none"> • Type biologique : Nanophanérophytes.



Figure 7 : L'espèce *Bupleurum fruticosum L.* au niveau du PNG.

5.3.2. Classification botanique

La classification du *bupleurum fruticosum* L. est la suivante : [19].

- Règne *planteahaeckel*
- Division : *tracheophyta*
- Subdivision : *spermatophytina*
- Classe : *magnoliopsida*
- Super ordre : *asteranae*
- Ordre : *apiale*
- Famille : *apiaceae*
- Genre : *bupleurum*
- Espèce : *bupleurum fruticosum*

1.1.1. Dénomination

Tableau 2 : Dénomination de l'espèce *Bupleurum fruticosum* L. [20].

Nom scientifique	<i>Bupleurum fruticosum</i> L.
Nom vernaculaire : nom français	Buplèvre ligneux, buplèvre arbustif, buplèvre en arbre, buplèvre en buisson
Nom arabe/berbère	Douag

5.3.3. Composition chimique

De nombreuses études phytochimiques antérieures sur le genre *Bupleurum* ont révélé la présence de divers constituants actifs, notamment des saponines triterpénique, des lignanes, des flavonoïdes, mais aussi des stérols, des coumarines, des polyacétylènes, des huiles volatiles et des polysaccharides [21].

6. Propriétés thérapeutique

- Anti oxydante.
- Antibactérienne.
- Anti inflammatoire.
- Antivirale [18].

7. Intérêt médical

7.1. Activité antioxydante

L'oxygène, un élément indispensable à la vie, est nécessaire à tous les organismes aérobiques (animaux, plantes, bactéries) pour produire de l'énergie mais, il est également à l'origine de toxicité, d'altération et de dégénérescence [22].

Le métabolisme de l'oxygène, lorsqu'il est dérégulé, que ce soit sous l'effet de facteurs endogènes ou de facteurs exogènes, peut entraîner un stress oxydatif.

7.1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydant est défini comme étant l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces pro-oxydantes suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ces espèces, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante. Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines) et conduisant à l'apparition des diverses maladies [10].

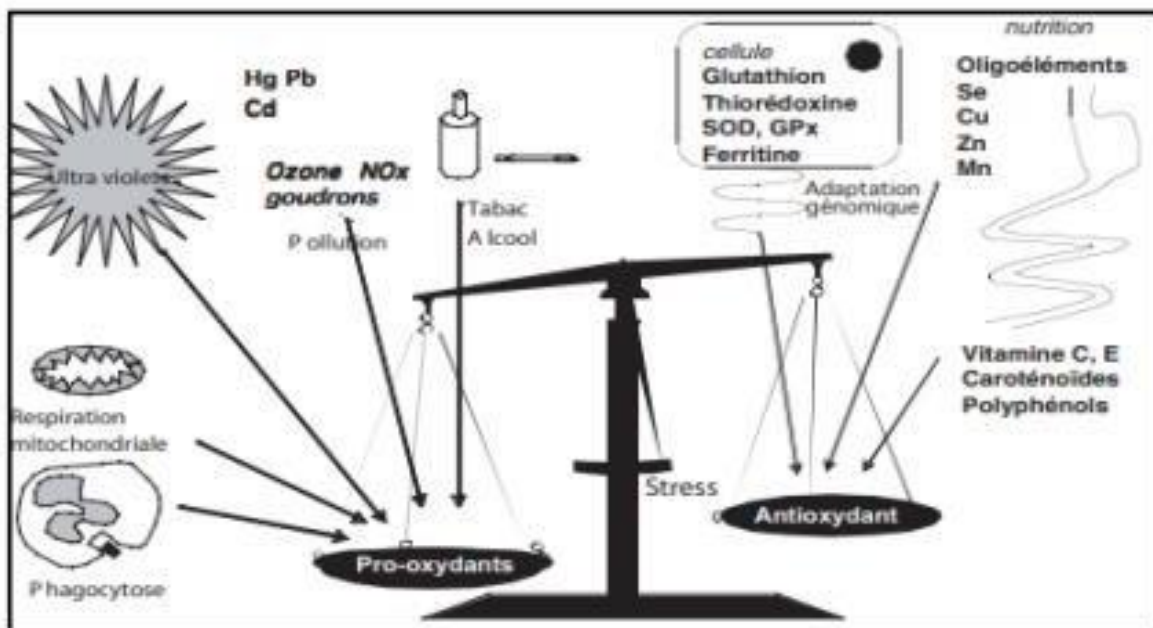


Figure 8 : Balance d'équilibre entre le système pro-oxydant et antioxydant [10].

7.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres également, connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont des atomes ou des molécules hautement réactives qui présentent un électron non apparié

dans leur couche externe. Cette caractéristique les rend très instables et les pousse à réagir rapidement avec d'autres molécules pour stabiliser leur configuration électronique.

Un excès de radicaux libres peut entraîner des dommages cellulaires, notamment la dégradation des lipides, des protéines et de l'ADN, qui sont des composants essentiels des cellules. Cela peut être associé à des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, le vieillissement prématurés et d'autres problèmes de santé.

Tableau 3 : Récapitulatif des principales espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leurs caractéristiques.

Espèce réactive de l'oxygène (ROS)	Formule chimique	caractéristiques	formation
Singulet oxygène	1O_2	Forme excitée de l'oxygène moléculaire	Exposition à la lumière du soleil ou processus photochimiques
Superoxyde radicalaire	O_2^-	Radicaux libres possédant un électron célibataire	Généré principalement lors de la respiration cellulaire (mitochondries)
Hydroxyle radicalaire	OH^\cdot	Très réactif et dommageable pour les cellules	Formé par diverses réactions, y compris entre O_2^- et H_2O_2 sous certaines conditions catalysées par des métaux
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Contient de l'oxygène, n'est pas un radical libre	Formé lors de la réduction de l'oxygène singulet et par d'autres réactions entraînant O_2^-
Peroxynitrite radicalaire	$ONOO^\cdot$	Formé par la réaction entre le radical superoxyde (O_2^-) et l'oxyde nitrique (NO^\cdot)	Réaction de O_2^- avec NO^\cdot

7.1.3. Les antioxydants

Par définition, les antioxydants sont des molécules qui préviennent ou réduisent l'oxydation. Pour cela, ils agissent en neutralisant ou en réduisant les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ils peuvent être d'origine endogène ou bien exogène.

Il existe deux principaux types d'antioxydants : enzymatiques et non enzymatiques.

- Les antioxydants enzymatiques : Les antioxydants enzymatiques sont des enzymes qui jouent un rôle clé dans la neutralisation des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Ils accélèrent des réactions chimiques pour décomposer les radicaux libres nuisibles en substances moins nocives.
- Les antioxydants non enzymatiques : Les antioxydants non enzymatiques sont des composés qui neutralisent les radicaux libres sans agir comme des enzymes. Ils jouent un rôle essentiel dans la protection des cellules et des tissus du corps contre les dommages causés par l'oxydation.

Tableau 4 : Les différents types des antioxydants.

Antioxydants enzymatiques	antioxydants non enzymatiques
Superoxydes dismutases (SOD)	Flavonoïdes
Glutathion peroxydases GPXS	Vitamine E
Thiorédoxine	Caroténoïdes
	Vitamine C

7.2. Activité antibactérienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes, de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise.

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes.

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tannins, sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire.

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

Cette partie de notre étude est divisée en deux parties distinctes :

- Une partie échantillonnage sur terrain
- Une partie analyse au laboratoire

1. Zone d'étude

Le PNG est une aire protégée qui se situe sur le littoral de la wilaya de Bejaia, au nord-est de l'Algérie. Il occupe une superficie de 2080 ha.

Il se subdivise en trois unités écologiques bien distinctes : une unité terrestre, une unité marine et une unité lacustre présentée par lac Mézaia.

Selon le témoignage du botaniste du parc Monsieur DRIES Fatsah le parc renferme une flore très diversifiée qui totalise plus de 500 espèces.



Figure 9 : La situation géographique de la station de récolte (Google Maps, 2023).

2. Matériel

2.1. Appareillages et équipements

- Balance analytique de type *Denver instrument SI-2002*
- Broyeur
- Agitateur à hélice
- Centrifugeuse de type *Hettich*
- Evaporateur rotatif de type *Heldolphlaborota 4001-efficient*
- Etuve de type *Memmert*

- Agitateur vortex de type
- Spectrophotomètre UV-Visible de type *SHIMADZU UV-1900I*
- Verreries
- Pipettes graduées
- Papiers filtre standard **Medilips**
- Boîtes de pétrie
- Ecouillons
- Disques en papiers

2.2. Réactifs et produits

Tableau 5 : Réactifs et produits utilisés.

Réactifs et produits	Données physicochimiques	Réactifs et produits	Données physicochimiques
Méthanol	Mr = 32,04 g/mol N° CAS : 67-56-1	Acide sulfurique	Mr = 98,08 g/mol N° CAS : 7664-93-9
Hexane	Mr = 86,6 g/mol N° CAS : 110-54-3	Liqueur de Fehling	Mr = N° CAS :
Chloroforme	Mr = 119,38 g/mol N° CAS : 67-66-3	Réactif Folin-Ciocalteu	N° CAS = 7647-01-0
Dichlorométhane	Mr = 84,93 g/mol N° CAS : 75-09-2	Carbonate de sodium	Mr = 106 g/mol N° CAS : 497-19-8
Chlorure ferrique	Mr = 162,2 g/mol N° CAS : 7705-08-0	Chlorure d'aluminium	Mr = 133,34 g/mol N° CAS : 7446-70-0
Acide chlorhydrique	Mr = 36,46 g/mol N° CAS : 7647-01-0	Acétate de potassium	Mr = 98,15 g/mol N° CAS : 127-08-2
Hydroxyde de Sodium	Mr = 40 g/mol N° CAS : 1310-73-2	DPPH	Mr = 394,32 g/mol N° CAS : 1998-66-4

3. Méthodes

3.1. Préparation de la matière végétale

Les parties aériennes (feuilles, tiges) et racinaires de notre plante ont été récoltées le 14 mars 2023 au PNG.

La plante destinée pour l'extraction a été séchée à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 1 mois. Après séchage, les coussinets de *Bupleurum fruticosum L.* ont été coupés à l'aide d'un sécateur puis broyé à l'aide d'un moulin à café jusqu'à l'obtention d'une poudre.



Figure 10 : Séchage de *Bupleurum fruticosum L.*

3.2. Traitement et préparation des échantillons

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire pharmaceutique de la faculté des sciences UMMTO, laboratoire analytique de la faculté de médecine UMMTO et du laboratoire microbiologie de CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou, durant la période Avril à Juin 2023

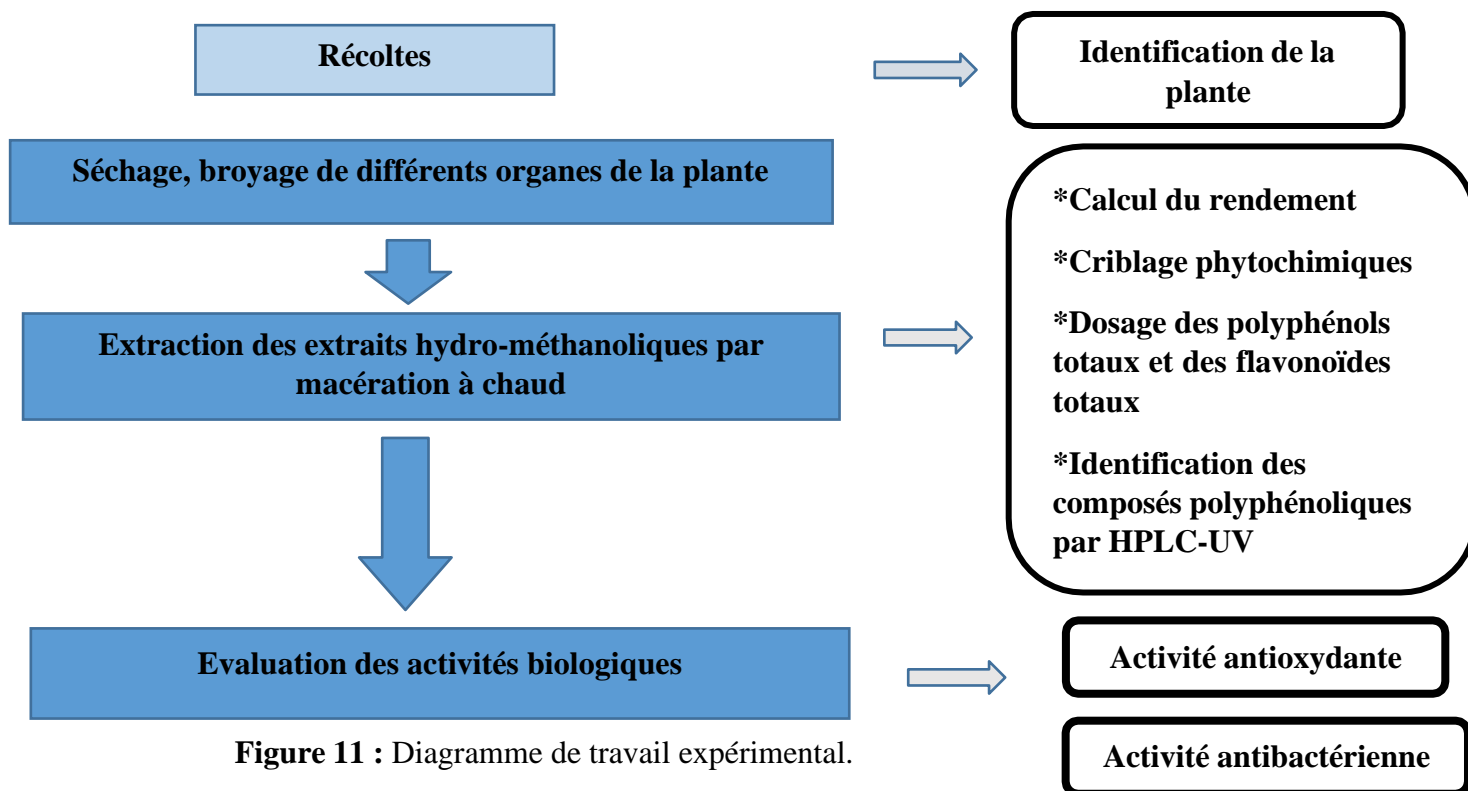


Figure 11 : Diagramme de travail expérimental.

3.3. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique permet de détecter les différentes familles chimiques constituant une plante présentant un intérêt pharmacologique tels que les stérols les triterpènes, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les Saponosides et les composés réducteurs et les amidons.

Afin de caractériser les métabolites secondaires présents dans le *Bupleurum fruticosum* nous avons effectué une infusion.

Les tests y sont basés sur des réactions de coloration et de précipitation.

3.4. Préparation des infusés

Trois solvants de polarité différente ont été utilisés lors de cette étude phytochimique à savoir Eau, méthanol (solvant polaire) et le dichlorométhane (solvant apolaire). Les infusés à tester ont été préparés comme suit :

- Deux masses de 10g de poudre végétale de chaque organe (feuilles, tiges, racines) sont versées dans deux béchers contenant chacun 150ml d'eau-méthanol (50/50 : v/v), et 150ml du dichlorométhane et portés à ébullition pendant 20min.
- Filtration des infusés à l'aide d'un papier filtre standard et récupération des filtrats dans des erlenmeyers.



Figure 12 : Filtrats hydro-méthanoliques et dichlorométhaniques des trois organes de la plante *Bupleurum fruticosum L.*

3.4.1. Test des Saponosides

5ml de chaque infusé est placé dans un tube à essai, agiter pendant 15s puis laisser déposer durant 15min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1cm indique la présence des Saponosides [12].

3.4.2. Test des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols.

A 2ml de chaque extrait (hydro-méthanolique et dichlorométhanique), une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée.

L'obtention d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols [12].

3.4.3. Test des flavonoïdes

3 copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré sont additionné à 5ml de chaque extrait (hydro-méthanolique et dichlorométhanique). La présence des flavonoïdes est déterminée par l'observation d'une couleur rouge pour les flavonols, orange pour les flavones et violet pour les flavonones [12].

3.4.4. Test des coumarines

Nous versons 3ml de NaOH à 10% dans chaque extrait (hydro-méthanolique et dichlorométhaniques). La présence des coumarines est détectée par l'apparition d'une couleur jaune [12].

3.4.5. Test des tanins

0,5ml de chlorure ferrique dilué à 1% est ajouté à 2ml de chaque extrait l'apparition d'une coloration verdâtres ou brune (tanins catéchiques) ou bleu noir (tanins galliques) [12].

3.4.6. Test des tri-terpènes

Un volume de 0,4ml du chloroforme est ajouté à 1ml de chaque extrait puis 0,6ml d'acide sulfurique est ajouté (test slakouski). La formation de deux phases avec coloration marron à l'interface [23].

3.4.7. Test des alcaloïdes

Dans un tube à essai 1ml de chaque extrait (hydro-méthanolique, dichlorométhanique) est déposé puis 2 gouttes d'acide chlorhydrique (1%) est ajouté dans chaque tube. 1ml du réactif de Mayer est ajouté à la solution. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes [12].

3.4.7. Test de l'amidon

5ml de chaque extrait est traité avec quelques gouttes d'empois d'amidon (aqueux). La présence d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon [12].

3.4.7. Test des composés réducteurs

Nous versons 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling dans 2ml de chaque extrait puis chauffer. Un précipité rouge brique indique la présence d'hydrate de carbone [12].

3.5. Extraction des composés polyphénoliques de *Bupleurum fruticosum L.*

3.5.1. Dispositif d'extraction

L'extraction des composés polyphénoliques a été effectuée par une extraction à chaud dans un bain thermostaté au niveau du laboratoire pharmaceutique de la faculté des sciences UMMTO. L'installation comporte un bécher contenant la matière végétale dissoute dans le mélange de solvant Eau-méthanol, placé dans un bain thermostaté et soumis à une agitation mécanique à l'aide d'un agitateur à hélice.

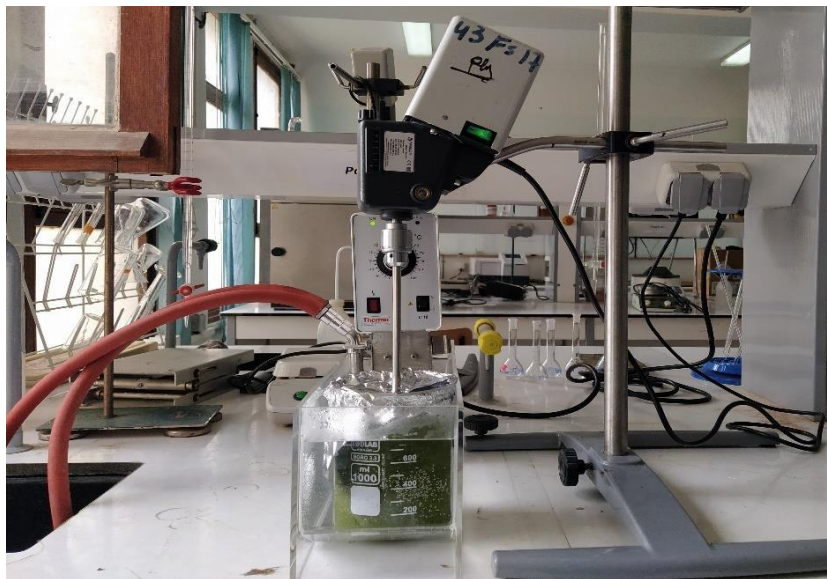


Figure 13 : Dispositif d'extraction.

3.5.2. Principe de l'extraction :

Les composés polyphénoliques présents dans le *Bupleurum fruticosum L.* ont été extraits en effectuant une infusion.

- **Mode opératoire :**
- 70g de poudre végétale de chaque organe sont introduites séparément dans des béchers de 1000ml, contenant 700ml d'un mélange eau-méthanol (50/50 : v/v) et introduits ensuite dans des bains thermostatés. La température est réglée à 50°C pour assurer la stabilité du processus d'extraction (une bonne température aidant le déroulement de l'extraction, évitant l'évaporation du solvant et la dégradation de la matière végétale).
- L'ensemble est soumis à une agitation à hélice d'environ 100tr/min durant 2h, les infusés sont ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre standard Medilips.
- Récupération des filtrats dans des récipients en verre. Par la suite nous avons effectué une décantation en ajoutant 150ml de l'hexane aux filtrats récupérés pour éliminer les corps gras et récupération de la phase eau-méthanol.
- Les phases eau-méthanol récupérées sont soumis à une centrifugation à 6000tr/min pendant 15min.
- Elimination du méthanol par évaporation sous vide en se servant d'un évaporateur rotatif réglé à une température de 50°C.
- Les phases aqueuses obtenues des trois extraits ont été mélangés avec le Chloroforme (v=200ml) pour éliminer les pigments.
- Séparation des deux phases, aqueuses et chloroformiques des trois extraits par décantation et récupération de la phase aqueuse.
- Elimination de l'eau par évaporation à l'aide d'une étuve réglée à une température de 70°C.



Figure 14 : Décantation des extraits hydro-méthanoliques.

Conservation

Nos extraits secs des polyphénols ont été récupérés et conservés dans des flacons stériles et opaques, hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière.

3.6. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en polyphénols est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu après extraction et la masse de la matière végétale sèche utilisée.

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée ;

$$R (\%) = (ME/MS) 100$$

Où :

R : le rendement en %.

ME : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

MS : la masse sèche de l'échantillon végétal en g.

3.7. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

La teneur en polyphénols dans les extraits préparés a été déterminée spectrophotométrique selon la méthode de Folin-Ciocalteu : ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et de l'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [24].

- **Mode opératoire**

1ml de chaque extrait sec (feuilles, tiges, racines) dissous dans le méthanol à 1mg/ml est mélangé avec le réactif de Folin (5ml, 2,5 %) et du Na₂CO₃ aqueux (4ml, 7,5 %). Les mélanges sont laissés au repos pendant 15min et les phénols totaux sont déterminés en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde λ de 765 nm.

La courbe standard est préparée dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant des solutions d'acide gallique à différentes concentrations (50, 100, 150, 200, 250 mg/ml) dans un mélange eau-méthanol (50/50 : v/v).

Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en termes de masse en acide gallique équivalent (mg EAG /g d'extrait), qui est un composé polyphénolique de référence [24].

3.8. Dosage des flavonoïdes totaux

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium. La couleur jaune de la solution apparaît lors de la formation d'un complexe flavonoïde- AlCl_3 [24].

- **Mode opératoire**

0,5ml de chaque extrait sec (feuilles, tiges, racines) dissous dans le méthanol est mélangé séparément avec 1,5ml de méthanol, 0,1ml de chlorure d'aluminium à 10 %, 0,1ml d'acétate de potassium 5 % et 2,8ml d'eau distillée et laissé incubé à température ambiante pendant 30min. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 415nm. La courbe d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant la quercitrine à des concentrations allant de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en termes de masse en quercitrine équivalent (mg EQ/g d'extrait), qui est un flavonoïde de référence [24].

3.9. Identification des composés polyphénoliques par HPLC-UV

L'analyse chromatographique liquide à haute performance HPLC des extraits hydro-méthanoliques, a été réalisée avec un appareil **HPLC** couplé à un appareil **UV**.



Figure 15 : Appareil de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

- **Principe**

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant puis introduits dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser étant injecté dans le système chromatographique, les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [12].

- **Mode opératoire**

Les séparations ont été réalisées sur une colonne C18 à température ambiante, avec une pré-colonne C18. La phase mobile est constituée de solvant A (Eau/acide acétique 0,1%) et de solvant B (Méthanol). Le gradient de solvant est réalisé comme suit :

- 0.0-50min : de 10 à 60% de phase B
- 50min-54min : de 60 à 95% de solution B
- 54min-55min : de 95% à 10% de phase B
- 55min-60min : 10% de phase B

Le volume d'injection est de 20µl à un débit de 1ml/min. la détection est réalisé par un détecteur UV à 260nm.

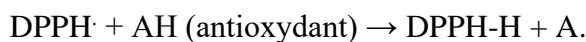
3.10. Analyse des activités biologiques des extraits hydro-méthanoliques de *Bupleurum fruticosum* L.

Afin de déterminer la valeur et évaluer la qualité pharmacologique de nos extraits, nous proposons de tester leurs effets antioxydants et antibactériens in vitro comme analyses primaires pour donner un aperçu initial sur leurs propriétés médicinales.

3.10.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des extraits hydro-méthanoliques a été testé par la méthode faisant appel au DPPH (1,1-diphénylpicrylhydrazyl) comme radical libre relativement stable.

Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine. L'intensité de la couleur du radical DPPH est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu [25].



Violette —————> Jaune

- **Mode opératoire**

La réaction est réalisée dans un volume total de 2,5ml contenant 0,5ml de l'extrait hydro-méthanolique, volume auquel est ajouté 2ml de DPPH à (20µg /ml) solubilisé dans le méthanol. Les extraits sont préparés par dissolution dans le méthanol absolu, ces solutions dites solutions mères seront ensuite diluées afin d'obtenir les concentrations finales (0,005 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5) mg/ml.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence préparé dans les mêmes conditions opératoires.

Les échantillons sont ensuite conservés à l'obscurité pendant 30min, et la décoloration, par rapport au témoin négatif contenant 2ml du DPPH et 0,5ml de MeOH est mesurée à 517nm. L'activité est estimée selon l'équation suivante [25] :

$$\text{AA} = ([\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}] / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

AA : activité antioxydante.

Abs : absorbance à 517nm.

Après le calcul des différents pourcentages de réduction et sur la base des données obtenues et des droites tracées, on procède au calcul de la CI50.

- **Détermination de l'CI50**

La valeur de l'CI50 est déterminée graphiquement par l'extrapolation sur la courbe de réduction du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits.

3.10.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour cette étude, l'activité antibactérienne de la plante *Bupleurum fruticosum L.* a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, permettant de révéler les extraits présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis de souches de référence.

Le principe de cette méthode consiste à déposer sur une gélose ensemencée, des disques de papier buvard puis les imprégner de la substance à tester à des doses bien déterminés à l'aide d'une micropipette. Cette substance en question diffuse au sein de la gélose à partir du disque donnant une zone d'inhibition dans le milieu autour du disque s'il y a une activité [26].

3.10.2.1. Les souches bactériennes cibles

Il s'agit notamment des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et d'une bactérie à Gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.10.2.2. Milieu de culture

Le milieu Muller Hinton a été utilisé. La gélose fondue est coulée en boîte de pétri de 90mm de diamètre pour obtenir une épaisseur d'environ 4mm de gélose. Les boîtes refroidies sont séchées à l'étuve à 37°C avant d'être utilisées.

3.10.2.3. Inoculum bactérien

Les inoculums des souches testées *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été préparé à partir de cultures jeunes et pures, des colonies bien isolées ont été raclées à l'aide d'une anse de platine stérile ou une pipette Pasteur puis déchargée dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, aseptiquement dans la zone du bec Benzène. Par la suite, la suspension bactérienne a été bien homogénéisée dans le but d'obtenir un inoculum ayant une opacité de 0,5MF.

3.10.2.4. Préparations des solutions

Les extraits hydro-méthanoliques de la partie aérienne de *Bupleurum fruticosum L.*, ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 500mg/ml, tandis que ceux de la partie racinaire ont été dissous dans 50mg/ml.

3.10.2.5. Imprégnation des disques

Les disques blancs de 9mm de diamètre ont été imprégnés séparément de 10µL et 40µL respectivement de la solution d'essai préparée. Ils ont été placés dans des boîtes de Pétri ou ils ont été séchés.

- **Mode opératoire**

L'inoculum préparé a été ensemencé sur des boîtes de pétri contenant le milieu MH à l'aide d'un écouvillon stérile, en décrivant des stries serrées sur toute la surface et en pivotant l'écouvillon sur lui-même. Des disques vierges ont été déposés d'une manière équidistante puis imprégnés par des volumes croissants d'extraits hydro-méthanoliques (10 et 40 μ l).

L'activité antibactérienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Une zone claire est présente autour du disque si l'extrait inhibe le développement microbien. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le micro-organisme est sensible [26].

Chapitre III :

Résultats et discussions

1. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques permettent de détecter les principaux composés chimiques présents dans la partie aérienne et racinaire de *Bupleureum fruticosum L.*

Les résultats des tests réalisés sur les deux extraits hydro-méthanolique et dichlorométhanique de notre plante sont mentionnés dans les tableaux suivants :

Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des feuilles.

Métabolites secondaires	Réactifs	Solvant hydro-méthanolique	Solvant dichlorométhanique
Polyphénols	Chlorure ferrique	++	-
Flavonoïdes	Acide Chlorhydrique + copeaux de magnésium	++	-
Tanins	Chlorure ferrique	++	++
Alcaloïdes	Mayer	-	-
Coumarines	Hydroxyde de Sodium	+	-
Saponines	Test de mousse	+	+
Triterpènes	Chloroforme + Acide Sulfurique	+	-
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	-	-
Amidon	Réactif d'amidon	-	-

Tableau 7 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des tiges.

Métabolites secondaires	Réactifs	Solvant hydro-méthanolique	Solvant dichlorométhanique
Polyphénols	Chlorure ferrique	++	-
Flavonoïdes	Acide Chlorhydrique+ copeaux de magnésium	++	-
Tanins	Chlorure ferrique	++	-
Alcaloïdes	Mayer	-	+
Coumarines	Hydroxyde de Sodium	+	-
Saponines	Test de mousse	+	-

Triterpènes	Chloroforme + Acide Sulfurique	+	-
Composés réducteurs	Liquueur de Fehling	+	-
Amidon	Réactif d'amidon	-	-

Tableau 8 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait des racines.

Métabolites secondaires	Réactions	Solvant hydro-méthanolique	Solvant dichlorométhanique
Polyphénols	Chlorure ferrique	++	-
Flavonoïdes	Acide Chlorhydrique + copeaux de magnésium	+	-
Tanins	Chlorure ferrique	++	-
Alcaloïdes	Mayer	+	-
Coumarines	Hydroxyde de Sodium	+	-
Saponines	Test de mousse	-	+
Triterpènes	Chloroform+H₂SO₄	+	-
Composés réducteurs	Liquueur de Fehling	+	-
Amidon	Réactif d'amidon	-	-

(-) : test négatif (+) : test faiblement positif (++) : test positif

Afin de vérifier la présence des métabolites secondaires dans nos extraits préparés, nous avons réalisé un criblage phytochimiques avec deux solvants de polarité différente.

L'étude complète du criblage phytochimiques chez *Bupleurum fritocusum L.* met en évidence la présence des métabolites secondaires qui présente des propriétés biologiques.

D'après les tableaux 5 ; 6 ;7 nous remarquons la présence des substances poly phénoliques (tanins, flavonoïdes), Coumarines, de plus des saponines et triterpènes, ainsi des alcaloïdes et des composés réducteurs.

D'après la littérature la nature et la polarité du solvant sont des facteurs influents dans l'extraction des métabolites secondaires. Dans cette étude nous avons utilisé deux solvant de polarité décroissante : méthanol, dichlorométhane. Ce qui permet une extraction sélective des composés chimiques, les solvants polaires comme le méthanol est efficace pour extraire les composés hydrophile tels que les flavonoïdes, les tanins et les saponines. D'un autre côté, les solvants apolaires comme le dichlorométhane extrait plutôt les composés lipophiles tels que les terpènes et les alcaloïdes.

2. Rendement d'extraction

Le tableau ci-dessous présente les rendements d'extraction des extraits de différents organes de *Bupleurum fruticosum* obtenus par infusion en utilisant eau-méthanol comme solvant d'extraction ainsi que l'aspect et la couleur de ces extraits.

Tableau 9 : Résultats des rendements d'extraction des extraits de différents organes.

Organes étudiés	Feuilles	Tiges	Racines
Quantité de la plante (g)	70	70	70
Volume du solvant (ml)	700	700	700
Rendement (%)	12,43	4,76	1,31
Aspects	Visqueux très collant	Visqueux très collant	Pâte collante
Couleurs	Marron caramélisé	Marron caramélisé	Marron caramélisé
Odeur	Douce sucré	Douce sucré	Douce sucré

Comme nous avons déjà cité, le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu après extractions (ME) et la masse de la matière végétale sèche utilisée (MS) en pourcentage.

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction de tableau que l'extrait des feuilles fournisse le rendement le plus élevé (12,43%), c'est l'organe le plus favorable pour la production des polyphénols en comparant avec le rendement d'extrait des tiges (4,76%) et l'extrait des racines avec le rendement le plus faible (1,31%). Le taux d'extraction dépend donc du type d'organe considéré.



Figure 16 : Extraits hydro-méthanoliques des feuilles, tiges et racines.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée sont déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu.

La courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard a permis de calculer les concentrations des polyphénols totaux, exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche, dans les trois extraits.

Tableau 10 : Absorbances de la gamme d'acide gallique à différentes concentrations.

S	Concentration (mg/ml)	Absorbances
S ₁	50	0,1701
S ₂	100	0,2512
S ₃	150	0,3807
S ₄	200	0,4957
S ₅	250	0,5678

Les résultats obtenus sont présentés dans une courbe d'étalonnage équivalent en acide gallique, ayant l'équation : $Y = 0,0021x + 0,0611$ et $R^2 = 0,915$

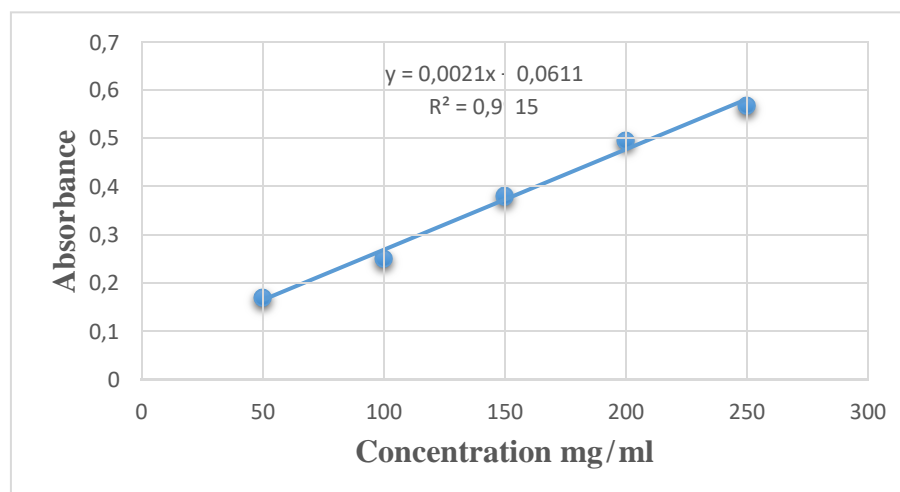


Figure 17 : Courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée sont présentées dans la figure ci-dessus :

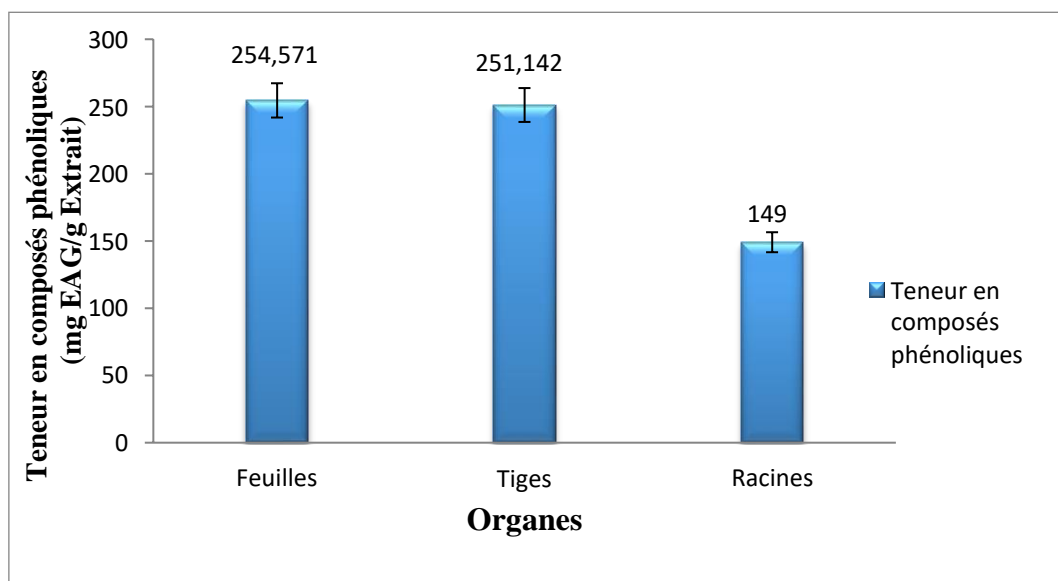


Figure 18 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques feuille, tiges et racines.

3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de la plante étudiée sont déterminées par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium.

La courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme standard a permis de calculer les concentrations des flavonoïdes totaux, exprimées en mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche, dans les trois extraits.

Tableau 11 : Absorbances de la gamme de quercétine à différentes concentrations.

S	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbances
S ₁	10	0,1268
S ₂	20	0,2534
S ₃	30	0,4319
S ₄	80	1,0234
S ₅	90	1,1669
S ₆	100	1,3556

Les résultats obtenus sont présentés dans une courbe d'étalonnage équivalent en quercétine, ayant l'équation : $Y = 0,0132x + 0,0021$ et $R^2 = 0,9969$

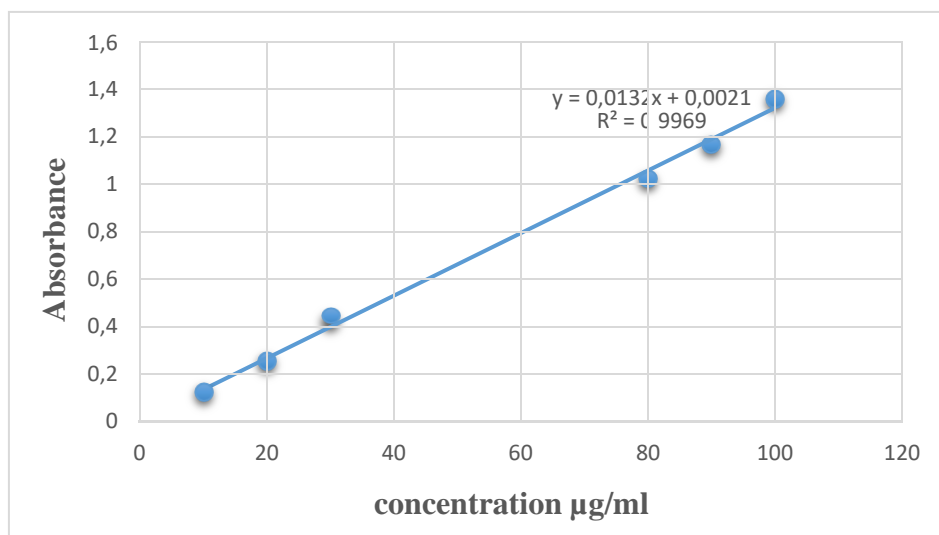


Figure 19 : Courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de la plante étudiée sont présentées dans la figure ci-dessus :

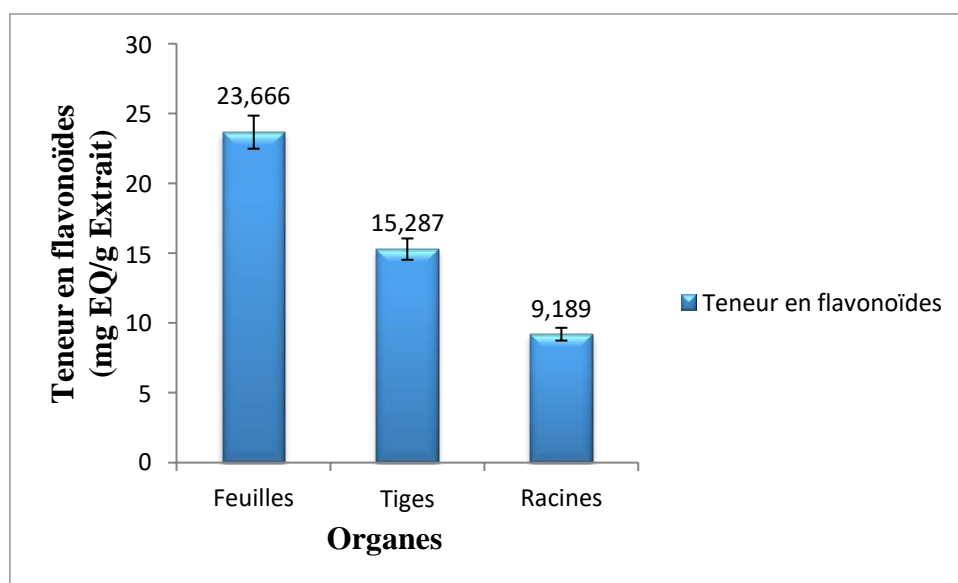


Figure 20 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits hydro-méthanoliques feuilles, tiges et racines.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans la plante étudiée, avait pour objectif de déterminer les teneurs de ces derniers dans les différents organes de la plante.

Nous nous sommes intéressées précisément à ces deux substances du fait que ces dernières révèlent des activités thérapeutiques telles que l'activité anti oxydante et anti bactérienne.

En général l'estimation des teneurs des polyphénols totaux est réalisés avec le réactif de Folin-Ciocalteu ; qui est une réaction oxydation-réduction, les phénols possèdent un pouvoir réducteur et sont des donneurs de H⁺, cette réaction se fait dans un milieu basique auquel se forme un complexe bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde λ de 765nm.

Nous constatons que la teneur la plus élevée en polyphénols est enregistrée pour l'extrait hydro-méthanolique des feuilles avec une concentration de 254,571mg EAG/g d'extrait (équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait)

L'extrait hydro-méthanolique des tiges renferme aussi une quantité importante en polyphénols qui est de l'ordre de 251,142mg EAG/g d'extrait. Pour les racines est de 149mg EAG/g d'extrait.

Les flavonoïdes aussi possèdent des propriétés thérapeutiques, la quantification de ces derniers est déterminée par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium qui forme un complexe de couleur jaune flavonoïdes-Al à une longueur d'onde λ de 415nm.

Les feuilles enregistrent un maximum de flavonoïdes de 23,666mg EQ/g d'extrait (Equivalent de Quercitine par gramme d'extrait) tandis que les tiges est 5,287mg EQ/g d'extrait. La teneur la plus faible en flavonoïdes est enregistrée pour l'extrait hydro-méthanolique des racines qui est 9,189mg EQ/g d'extrait.

L'ensemble des résultats quantitatifs obtenus par les dosages spectrophotométriques (UV-VIS) montre une variation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux entre les trois organes étudiés (feuilles, tiges, racines). Le contenu phénolique de la partie racinaire et aérienne d'une plante peut varier en fonction de plusieurs facteurs. Selon Ksouri *et al.* [27], la distribution des métabolites secondaires peut fluctuer entre les différents organes de la plante. Des expériences ont montré que le contenu phénolique est fait régie par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques à cette fin, le méthanol était recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction des composés phénoliques.

La quantification en métabolites secondaires de la plante peut varier, en raison de l'existence d'une liaison avec les conditions climatiques et les conditions de collecte, telles que les températures élevées, la durée d'exposition solaire, la nature du sol et la saison de croissance, en plus de l'organe analysé, la région et la date de la récolte. D'après Ksouri *et al.* [27]. La teneur en composés phénoliques peut varier également en fonction de la méthode d'extraction.

4. Identification des composés phénoliques par HPLC-UV

Les extraits de chaque organe de *Bupleurum fruticosum L.* ont été analysés par HPLC-UV. Les composés chimiques de chaque organe ont été détectés par UV à une longueur d'onde 260 nm à l'aide des temps de rétentions des étalons, de plus ils ont été caractérisés par leurs aires (area) de pics et leurs hauteurs (height).

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau 12 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des feuilles.

Nom	Temps de rétention	Air	Hauteur
Catechine	14,226	75387	4108
Acide cafeique	17,890	2734079	140078

Tableau 13 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des tiges.

Nom	Temps de rétention	Air	Hauteur
Catechine	14,333	12716	945
Acide caféique	17,842	391028	20756
Acide p-coumarique	28.110	6974	489
Rutine	35,323	82316	4898

Tableau 14 : Résultats de la HPLC-UV de l'extrait des racines.

Nom	Temps de rétention	Air	Hauteur
Catechine	14,669	139606	9268
Acide caféique	18,987	584185	32051
Acide p-coumarique	28,494	237338	12549
Rutine	35,328	155397	9236

Quatre composés polyphénoliques ont été identifiés en fonction de leurs temps de rétention. Les chromatogrammes montrent la présence de la catéchine, acide caféique et l'acide p-coumarique, rutine dans nos extraits.

Pour les feuilles, d'après le chromatogramme UV à 260nm annexe (4) montre un pic qui correspond à la catéchine avec un temps de rétention 14,226min, ce dernier indique aussi la

présence de l'acide caféique qui est l'un des flavonoïdes avec un pic plus intense au temps de rétention 17,890min.

En plus des métabolites enregistrés précédemment, le chromatogramme UV à 260nm annexe (4) indique la présence de l'acide p-coumarique, rutine, catéchine, acide caféique, acide p-coumarique, possèdent des temps de rétention respectivement : 14,333min ; 17,842 ; 28,110 et 35,323.

Le profil de chromatogramme UV à 260nm de l'extrait racine montre la présence de la catéchine au temps de rétention 14,669min, l'acide caféique au temps de rétention 18,987 min, acide p-coumarique au temps de rétention 28,494, et la rutine au temps de rétention 35,328 min.

Ces résultats, confirme la richesse du *Bupleurum fruticosum L.* en composés phénolique (flavonoïdes), il s'agit d'une classe très importante qui possède des propriétés biologiques antioxydante et anti bactérienne.

5. Analyses des activités biologiques des extraits hydro-méthanoliques de *Bupleurum fruticosum L.*

5.1. Evaluation de l'activité antioxydante

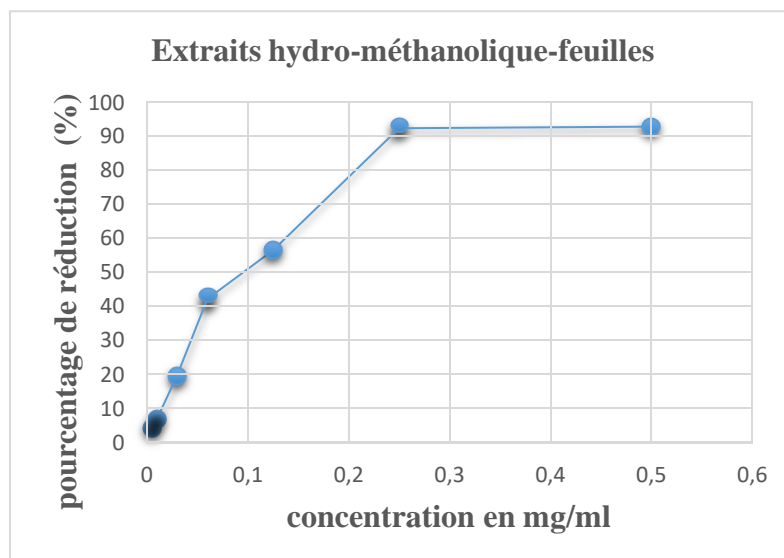


Figure 21 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles.

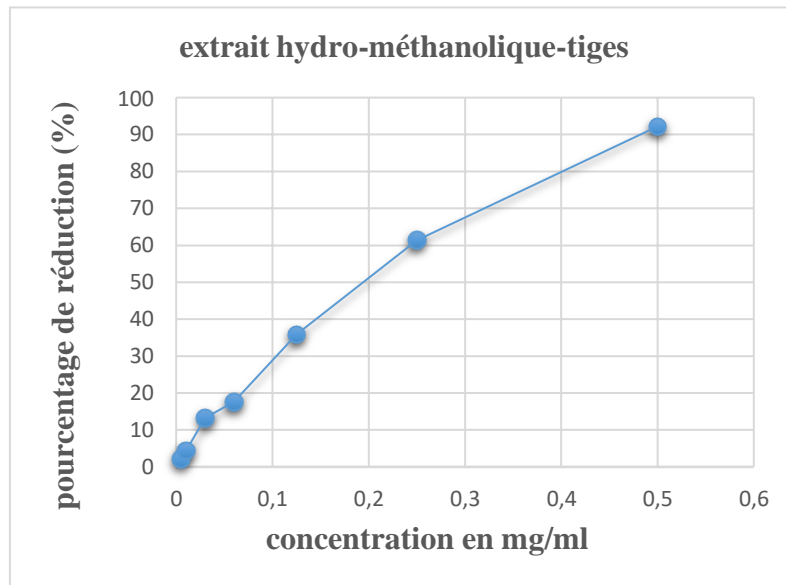


Figure 22 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des tiges.

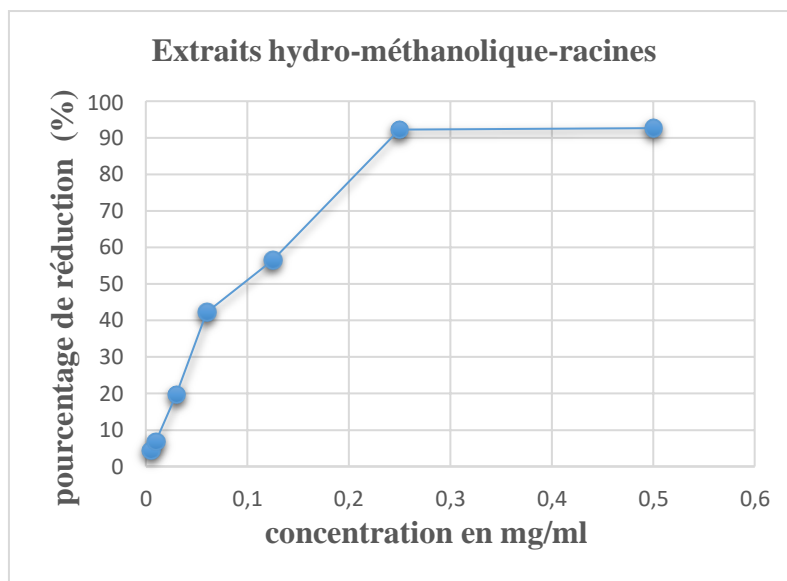


Figure 23 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanolique des racines.

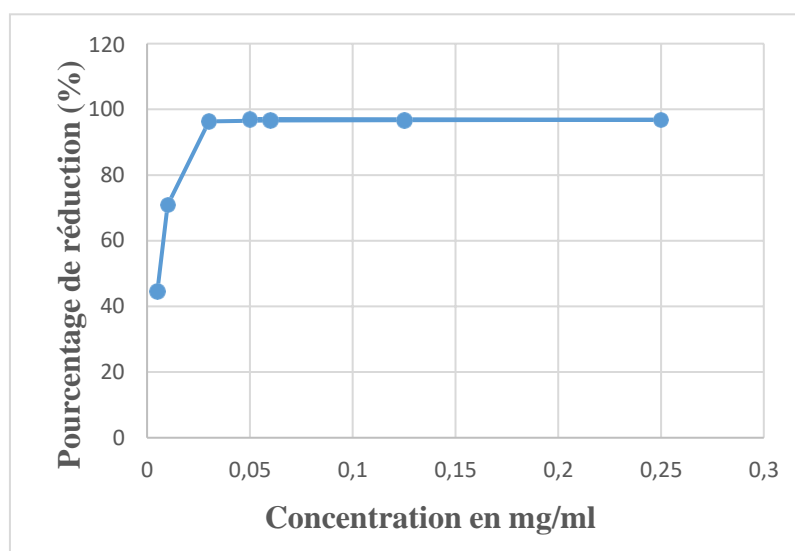


Figure 24 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante des différents extraits de l'espèce *Bupleurum fruticosum L.* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée au spectrophotomètre en suivant la réduction de radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Cette décoloration se fait lorsque l'électron célibataire s'apparie.

L'activité antioxydante est exprimée par l'IC50 qui est la concentration d'un antioxydant nécessaire pour inhiber 50% de l'activité des radicaux libres.

D'après le test DPPH quand la concentration des polyphénols augmente dans le milieu, le pourcentage de réduction augmente proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à la réduction presque totale du DPPH présent dans ce milieu.

Tableau 15: Concentrations d'inhibition minimales IC50 des extraits végétaux.

Extraits	IC50 (mg/ml)
Feuilles	0,09
Tiges	0,2
Racines	0,1
L'acide ascorbique	0,001

D'après le tableau 14, la capacité antioxydante au sein du genre *Bupleurum fruticosum L.* s'est avérée être significativement variable dans nos extraits.

L'extrait des feuilles enregistre une forte activité antioxydante avec une IC50 égale à 0,09mg/ml ; 0,2mg/ml pour l'extrait des tiges et 0,1mg/ml pour l'extrait des racines.

Nous constatons que l'ensemble des résultats obtenus par le test DPPH montre une variance en pouvoir réducteur, ce qui peuvent être liés aux teneurs plus élevées en polyphénols de *Bupleurum fruticosum L.*

En revanche, et par comparaison à l'antioxydant standard l'acide ascorbique, tous nos extraits ont montré des IC50 supérieurs, de ce fait, l'acide ascorbique est toujours l'antioxydant le plus puissant comparativement aux extraits de l'espèce *Bupleurum fruticosum L.*



Figure 25 : Test de Piégeage du radical libre DPPH des extraits hydro-méthanoliques du *Bupleurum fruticosum L.*

5.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les extraits de chaque organe du *Bupleurum fruticosum L.* ont été testés contre trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations 500mg/ml pour l'extrait des feuilles et tiges, 50mg/ml pour l'extrait des racines par la méthode de diffusion en milieu gélose.

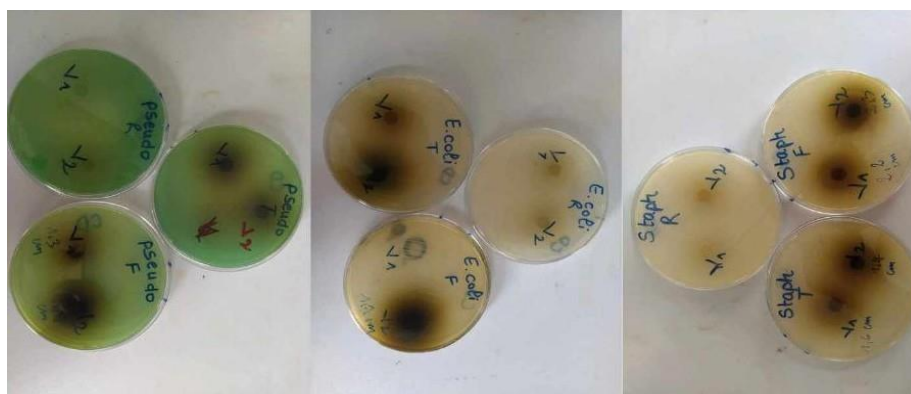


Figure 26 : Aromatogrammes des activités antibactériennes des extraits hydro-méthanoliques.

Les résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits sont représentés dans la figure 24 et les tableaux suivants :

Tableau 16 : Diamètre d'inhibition des extraits contre *Staphylococcus aureus*.

Extraits	Feuilles		Tiges		Racines	
Volume (μL)	10	40	10	40	10	40
Diamètre d'inhibition (mm)	22	23	14	16	-	-

Tableau 17 : Diamètre d'inhibition des extraits contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Extraits	Feuilles		Tiges		Racines	
Volume (μL)	10	40	10	40	10	40
Diamètre d'inhibition (mm)	13	17	-	-	-	-

Tableau 18 : Diamètre d'inhibition des extraits contre *Escherichia coli*.

Extraits	Feuilles		Tiges		Racines	
Volume (μL)	10	40	10	40	10	40
Diamètre d'inhibition (mm)	-	17	-	-	-	-

Les résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits à 40 μl montrent que l'extrait des feuilles dont sa concentration est 500mg/ml présente une activité contre les trois souches bactériennes testées. En revanche l'extrait des tiges à 500mg/ml enregistre une activité contre *Staphylococcus aureus* uniquement.

En diminuant le volume à 10 μl , nous observons que l'extrait des feuilles présente une activité contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, l'extrait des tiges à une concentration de 500mg/ml présente une sensibilité à *Staphylococcus aureus*.

Pour l'extrait des racines ne présentent aucun effet sur les trois germes testés.

Nous signalons qu'aucun extrait ne présente une sensibilité à *Escherichia coli*.

Nous constatons que plus la concentration en polyphénols dans un extrait est élevée, plus l'activité antibactérienne potentiellement bénéfique peut être intense. Le volume des extraits utilisés dans les tests antibactériens peut également jouer un rôle crucial. Un volume adéquat

est nécessaire pour permettre une diffusion efficace des composés antibactériens à travers le milieu de culture.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques Algériennes, notre étude réalisée sur l'espèce *Bupleurum fruticosum L.* a révélé des conclusions significatives. Cette plante se révèle riche en composés polyphénoliques variés notamment les tanins, les flavonoïdes, les saponines, les coumarines, les tri terpènes, les alcaloïdes et les composés réducteurs.

Parmi les organes étudiés, les feuilles ont émergé comme le réservoir le plus abondant de polyphénols, confirmant leur statut privilégié en terme de contenu potentiellement thérapeutique. Nos analyses ont démontré que les feuilles affichent la plus haute teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.

L'application de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la détection par ultraviolet (UV) a mis en évidence la présence d'acide caféique et de catéchine dans les feuilles, tandis que les tiges et les racines ont également révélé la présence d'acide p-coumarique et de rutine. Cette caractérisation des composés spécifiques confirme l'abondance de composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, dans *Bupleurum fruticosum L.*, une classe de composés largement associée à des propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante et antibactérienne.

Nous avons constaté que les extraits polyphénoliques issus des trois organes présentent une activité antioxydante, suggérant leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à conférer une protection contre le stress oxydatif.

Nos investigations sur l'activité antibactérienne ont révélé que l'extrait des feuilles se distingue par une activité significative contre les trois souches bactériennes testées. De plus, l'extrait des tiges a démontré une sensibilité particulière envers la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* : Cependant, il est important de noter que l'extrait racinaire n'a pas montré de sensibilité aux germes testés.

Ces conclusions soulignent le potentiel thérapeutique prometteur de l'espèce étudiée en tant que source de composés polyphénoliques et flavonoïdes bénéfiques. Les propriétés antioxydantes et antibactériennes observées dans les extraits renforcent l'idée que cette plante pourrait servir de ressource naturelle pour la recherche et le développement de nouvelles approches médicales et thérapeutiques.

Ces résultats offrent également des perspectives passionnantes :

- Faire des travaux supplémentaires pour identifier et isoler les composés bioactifs en utilisant plusieurs techniques plus fines (HPLC-SM).
- Elargir le travail pour d'autres activités biologiques telles que : l'activité cytotoxique, anti tumorale et anticancéreuse, anti inflammatoire, anti virale.
- Déterminer de nouvelles molécules bioactives naturelles en tant qu'alternatives aux médicaments synthétiques.
- Etudier la composition chimique de toutes les parties de la plantes (feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, grains).

Les huiles essentielles ont été souvent l'objet d'attention dans les études sur le *Bupleurum fruticosum L.* mais il existe un potentiel énorme à explorer davantage les extraits de cette plante et à étudier leurs propriétés bioactives.

Annexes

Annexe 1

Réactifs de caractérisation :

• Réactif de Mayer :

Chlorure de mercure ... 1,36g

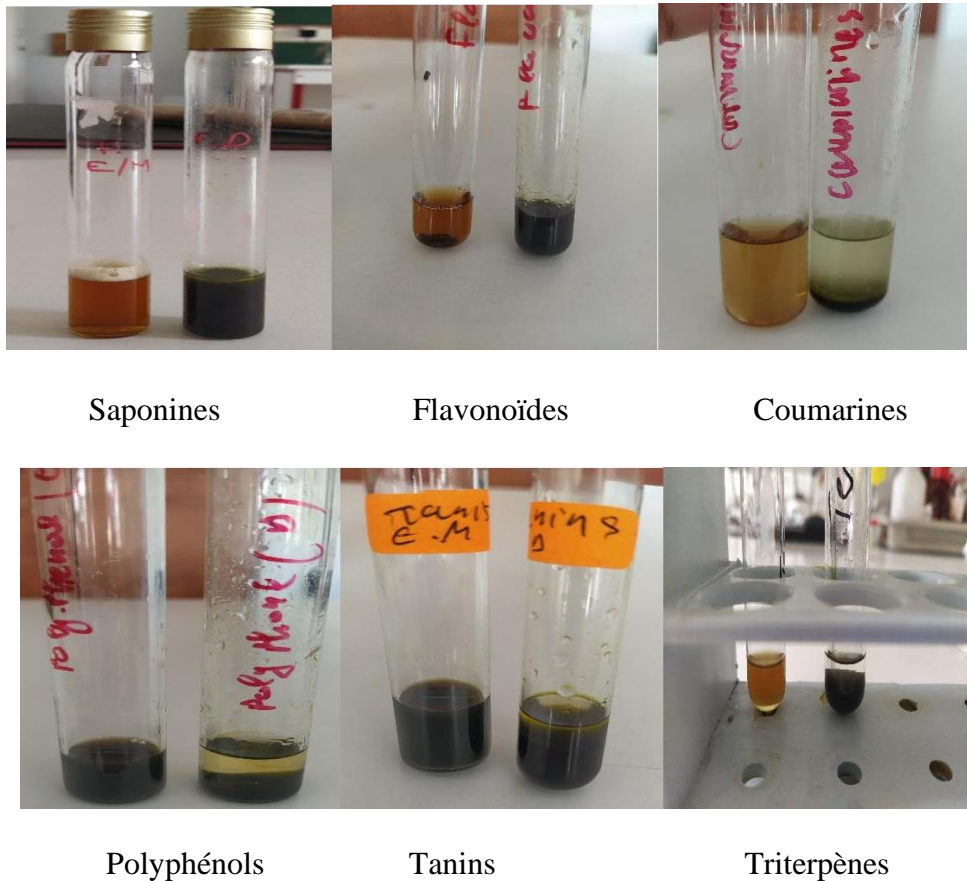
Iodure de potassium ... 5g

Eau distillé ... qsp 100ml

Dissoudre 1,36g de HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée.

Dissoudre 5g de KI dans l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume jusqu'à 100ml.

**Figure 1** : Résultats positifs des tests phytochimiques de l'extrait des feuilles.



Polyphénols

Flavonoïdes

Tanins



Alcaloïdes

Coumarines

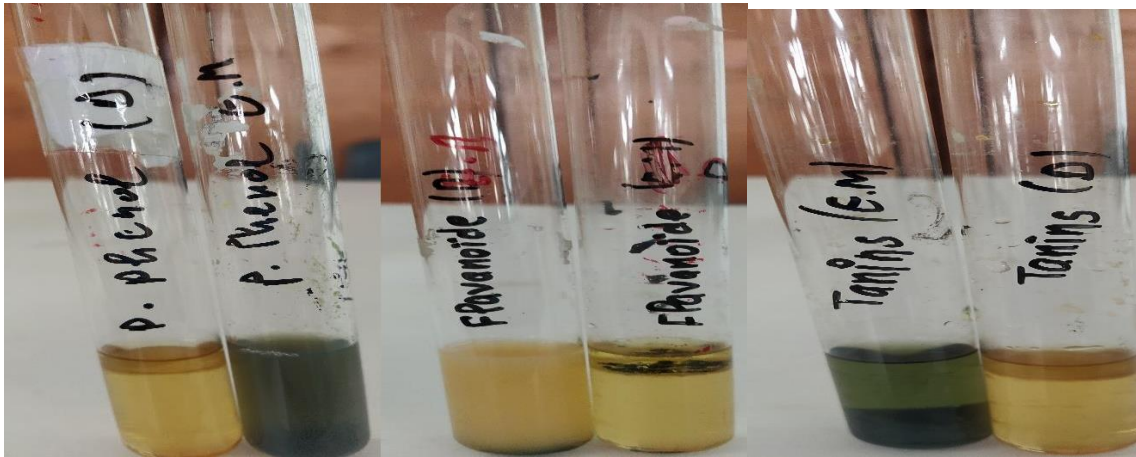
Saponines



Composés réducteurs

Triterpènes

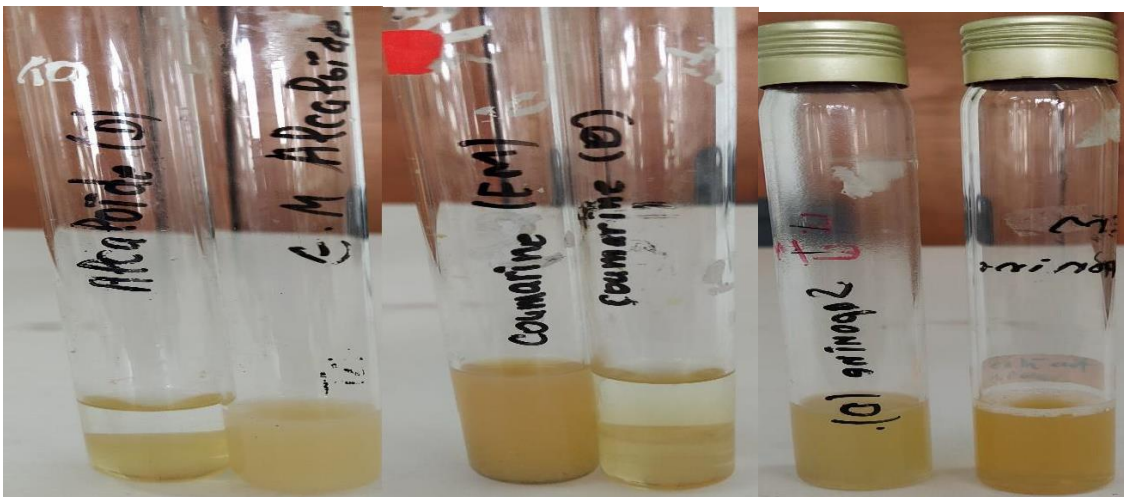
Figure 2 : Résultats positifs des tests phytochimiques de l'extrait des tiges.



Polyphénols

Flavonoïdes

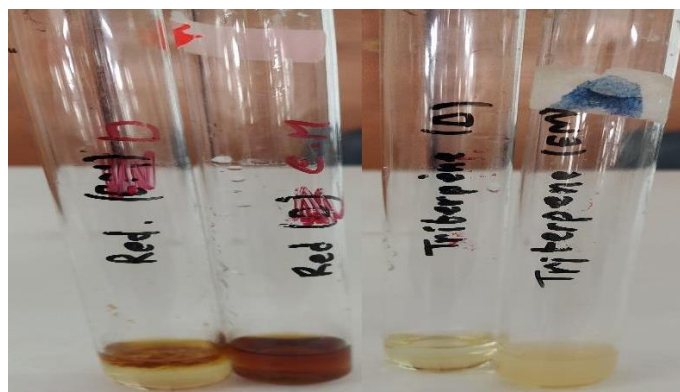
Tanins



Alcaloïdes

Coumarines

Saponines



Composés réducteurs

Triterpènes

Figure 3 : Résultats positifs des tests phytochimiques de l'extrait des racines.

Annexe 2

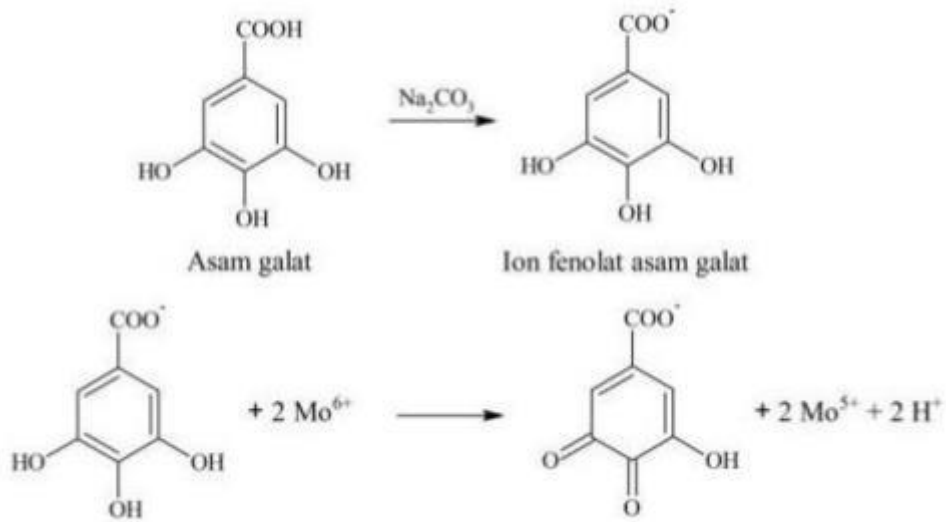


Figure 4 : Réaction oxydation-réduction de réactif de Folin-Ciocalteu.

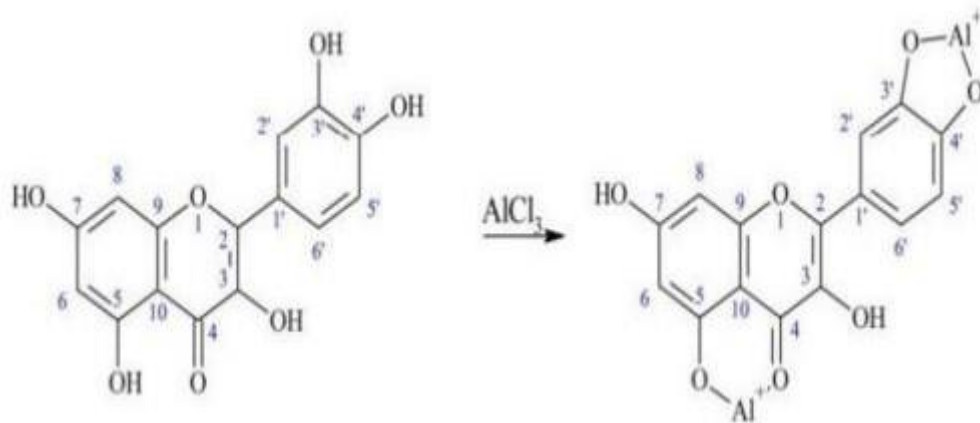


Figure 5 : Réaction de formation de complexe flavanoides-Al.

Annexe 3

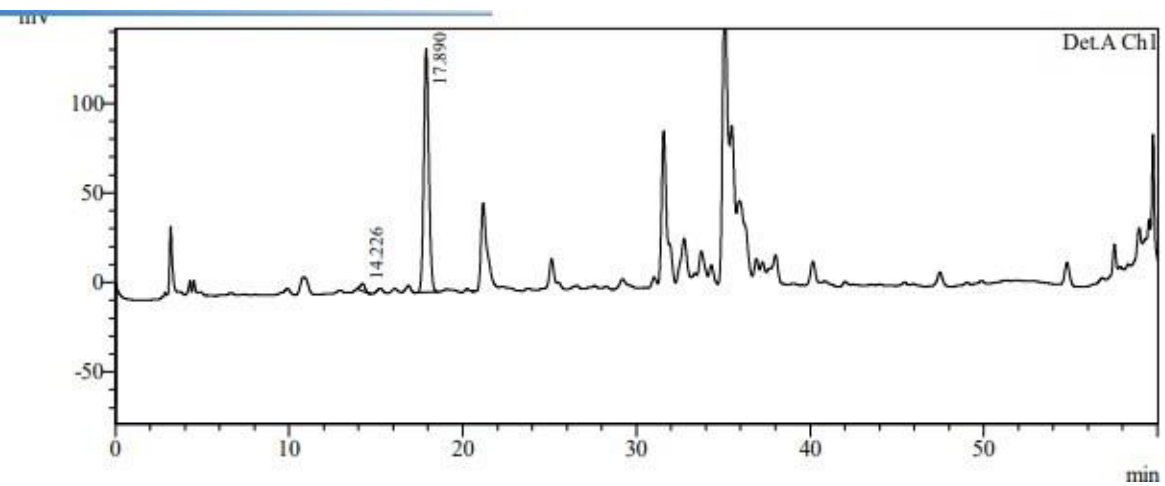


Figure 6 : Chromatogramme UV à 260nm de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles.

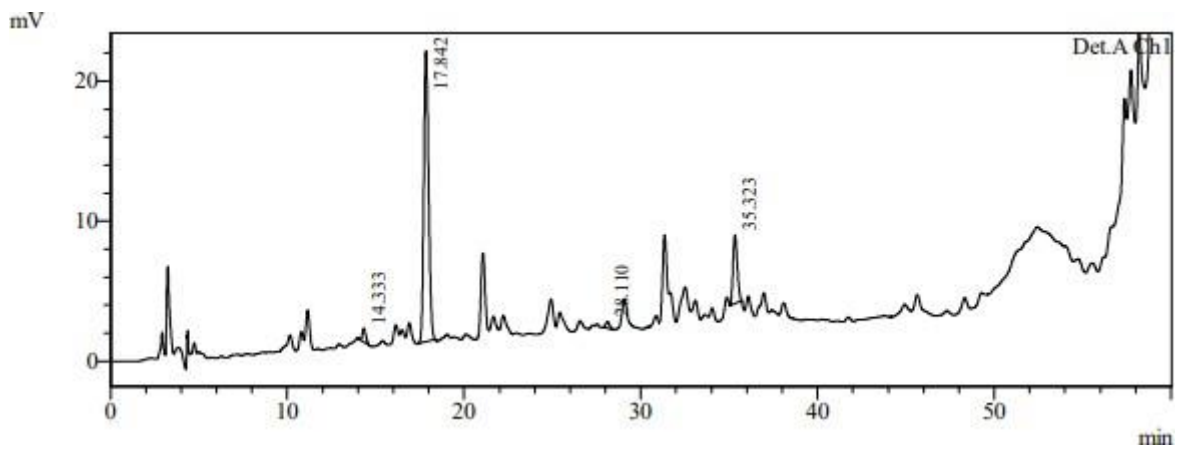


Figure 7 : Chromatogramme UV à 260nm de l'extrait polyphénolique des tiges.

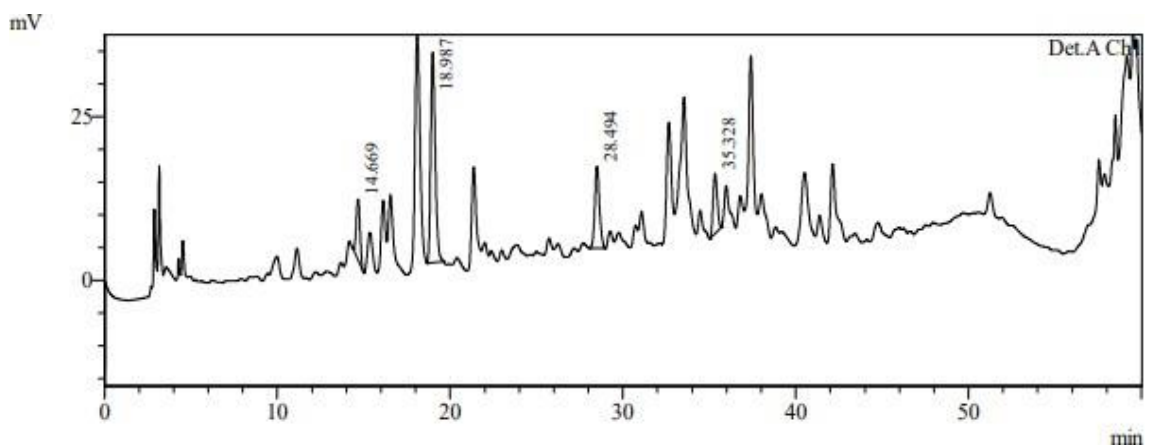


Figure 8 : Chromatogramme UV à 260 nm de l'extrait polyphénole des racines.

Références bibliographiques

- [1] NGUINAMBAYE, M et Al. (2015). Composés organiques et activités antioxydantes de *Ampelocissus multistriata* du Tchad. *Journal of Applied Biosciences* 91:8470-8479.
- [2] TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *African journal of Biotechnology*. Vol. 3(12), pp. 706-720.
- [3] GHARIB, K., BEN ZAOU, S. (2021). Investigations sur les propriétés antimicrobiennes antifongiques et antivirales « anti COVID 19 » chez L'*Aloe vera*. Mémoire de Master. Université Frères Mentouri Constantine 1.
- [4] LIMONIER, A. S. (2018). La phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie. Thèse de Docteur en Pharmacie. Université Aix Marseille, 21p.
- [5] CHABRIER, J. Y. (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phyétothérapie. Thèse de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincaré-NANCY-1, 22p.
- [6] BENHAMAMA, L. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de la plante médicinale *Crataegus monogyna*. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine, 1p.
- [7] MEYASSA, M., BENAMIRA, M. (2021). Etudes phytochimique et évaluation biologiques des extraits Aqueux de *Lawsonia inermis* et de *Juglans regia*. Mémoire de Master. Université Frères Mentouri Constantine 1, 23p.
- [8] CHENIH, M., HAOUACHE, L. (2021). Etude phytochimique d'une plante médicinale et quelques formes galéniques d'utilisation en phytothérapie. Mémoire de Master. Université Mohamed Boudiaf M'Sila, 9p.
- [9] ELSA. (2019). La phytothérapie : se soigner avec les plantes médicinales.
- [10] CHAIBET, D., CHERFIOUI, N., HAMEDOUNE, Ch., SELMANE, R. (2021). Contribution à l'étude de l'huile essentielle extraite de *Bupleurum spinosum* L. Mémoire de Docteur en Pharmacie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 8-52p.
- [11] HASSAINE, R. (2021). Méthode d'extraction de séparation et de purification des molécules bioactives de la parche de café. Mémoire de Master. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 40p.

- [12] HAMLIA, A., MIMOUNE, L. (2021). Analyse et étude des activités antioxydantes et microbienne des extraits polyphénoliques du *Bupleurum fruticosum* L. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 4-22p.
- [13] RIAH, S., SENOUCI, I. (2017). Évaluation de l'activité antifongique de l'extrait de *Thapsia garganica* de la région d'El hamadia wilaya de Bordj Bou-Arredj. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A, 6p.
- [14] NOUI, A. (2018). Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante *Daucus muricatus*. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine, 3p.
- [15] FILLIAT, P. (2012). Les plantes de la famille des apiacées dans les troubles digestifs. Thèse de Docteur en Pharmacie. Université Joseph Fournier, 14p.
- [16] DJARRI, L. (2011). Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille des apiaceae. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine, 6p.
- [17] LIU, K. (2011). La RMN du carbone-13 outil d'analyse étude phytochimique de *Clinopodium*, *Ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Cantolina corsica*. Thèse de Doctorat. Université de Corse Pascal Paoli, 91p.
- [18] KHEMAR, K., ZELLALI, L. (2019). Optimisation, analyse et étude biologique d'extraits de *Bupleurum fruticosum* L. (Buplèvre). Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 1-3p.
- [19] "The Euro+Med Plantbase Project."
<http://ww2.bgbm.org/europlusmed/ptaxondetail.asp?nameid=109084&ptreffk=750000>
- [20] ABRIKI, D., LABBACI, L. (2021). Analyse et étude biologique de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* (Buplèvre). Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 7p.
- [21] ACHOURI, A. (2018). Contribution à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Bupleurum lancifolium* Hornem. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri Constantine 1, 6-7p.
- [22] BENCHOUAK, M. (2008). Etude de l'effet des flavonoïdes de la *Foeniculum vulgare* Mill. dans la prévention de la cardiotoxicité de la doxorubicine. Mémoire de Magister. Université de Jijel, 1p.

- [23] HAOULIA, A. (2015). Tests phytochimiques, dosage et recherche d'effet hémolytique des polyphénols totaux extraits de la partie aérienne d'*Ammoides veticillata*. Mémoire de Master. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 10p.
- [24] POURMORAD, F., HOSSEINIMEHR, S. J., SHAHABIMAJD, N. (2006). Antioxydant activity, phenol and flavanoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African journal of Biotechnology Vol. 5 (11), pp. 1142-1145.
- [25] Ben Moussa, M., et al. (2022). Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS de L'Algérie (Sud-Est). Algerian journal of pharmacy. Vol.04 Num. 01 (2022) 2602-975X. 53p.
- [26] MEKAOUI, R. (2019). Etude analytique des fractions volatiles et lourdes de la buplèvre isolée par différentes techniques classiques par micro-ondes. Thèse de Doctorat. USTHB, 233-235 p.
- [27] KSOURI, R., ET AL. (2008). Influence des facteurs biologiques, environnementaux et techniques sur la teneur phénolique et les activités antioxydantes des halophytes tunisiennes. Volume 331, numéro 11, p 865-873.

Résumé

Le bupleurum fruticosum L. est une plante médicinale qui appartient à la famille des apiaceae.

Ce mémoire se concentre sur une étude analytique et biologique des extraits du *Bupleurum fruticosum L.* L'objectif principal est d'explorer les composés chimiques présents dans ces extraits et d'évaluer leurs potentiels thérapeutiques.

L'étude commence par un criblage phytochimique pour évaluer la composition de notre plante. Les extraits ont été obtenus par infusion, en utilisant un mélange de solvant à l'aide d'un bain thermostaté. Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium.

La technique HPLC_UV est utilisée afin d'analyser les polyphénols spécifiques. Ensuite le mémoire se penche sur l'évaluation biologique de ces extraits, ce pendant l'extrait des feuilles présente la capacité de piégeage radicalaire la plus élevée avec la valeur CI50 (la plus faible) 0.09 mg/ml, suivie d'extrait des racines avec une CI50 0.1 mg/ml, extrait des tiges avec une CI50 0.2mg/ml. De plus les extraits des feuilles et des tiges ont été efficace pour inhiber la croissance des bactéries pathogènes principalement contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Mot clé : *Bupleurum fruticosum*, polyphénols, extraction, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

Bupleurum Fruticosum L. is a medicinal plant belongs to the family of apiaceae.

This thesis focuses on an analytical and biological study of the extracts of *Bupleurum fruticosum L.* The main objective is to explore the chemical compounds present in these extracts and to evaluate their therapeutic potential.

The study begins with a phytochemical screening to evaluate the composition of our plant. The extracts were obtained by infusion, using a mixture of solvent using a thermostatic bath. The determination of total polyphenols was determined by the colorimetric method using the Folin-Ciocalteu reagent. The determination of total flavonoids is carried out by the colorimetric method of aluminum chloride.

HPLC_UV is used to analyze specific polyphenols. Then the thesis looks at the therapeutic evaluation of these extracts, this during the extract of the leaves has the highest radical trapping capacity with the IC50 value (the lowest) 0.09mg/ml, followed by root extract with a IC50 0.1mg/ml, extract stems with a CI50 0.2mg/ml. In addition extracts from leaves and stems have been effective in inhibiting the growth of pathogenic bacteria mainly against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Key words : *Bupleurum fruticosum*, polyphenols, extraction, activity antioxidant, activity antibacterial.