

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE
FILIERE : CHIMIE

MÉMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Analyse et étude des activités antioxydantes et microbiennes des extraits polyphénoliques du «Bupleurum fruticosum »

Présenté par : Mlle. HAMLA Ania et Mlle. MIMOUN Lamia

Le 21 / 10 / 2021 devant le Jury composé de :

<i>M^{me}. BELMAHDI</i>	<i>Lila</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENTE.</i>
<i>M^{me}. IDRIS</i>	<i>Imane</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATRICE</i>
<i>Mr. BENCHOUAK</i>	<i>Mounir</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>ENCADREUR</i>
<i>Mr. RAHAL</i>	<i>Foudil</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Co-ENCADREUR</i>

Remerciement

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

Nos sincères remerciements à notre encadreur Monsieur BENCHOUK Mounir, pour son dévouement, sa gentillesse et la patience dont il a fait preuve afin que ce travail se fasse dans de bonnes conditions, nous le remercions pour sa disponibilité et son assistance qui ont assuré le bon déroulement de notre projet de fin d'étude.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude à notre Co-encadreur, Monsieur RAHAL Foudil qui a été d'une aide précieuse, à travers ses explications et ses conseils.

Nous remercions les membres du jury, madame BELMAHDI Lila et madame IDRIS Imane qui nous font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Nos remerciements s'adressent à la direction du parc national de Gouraya (PNG) pour leur accueil chaleureux ainsi que leur aide. A monsieur DERIES Fatsah, pour ses encouragements ainsi que l'attention et le temps qu'il nous a accordé.

Un merci aux membres du laboratoire de chimie pharmaceutique du département chimie et ceux du laboratoire de chimie analytique de la faculté de médecine, ainsi qu'au personnel des laboratoires de mycologie et microbiologie du CHU, de nous avoir permis d'assurer la partie pratique de notre travail.

Nous citons en particuliers madame IKEN Horia ingénieur du laboratoire de chimie physique, madame KACI Célia ingénieur du laboratoire d'analyse chimique et chimie organique pour leur compréhension et encouragement. Et monsieur FETMOUCHE Karim le responsable du magasin du matériel et produits chimiques des laboratoires du département de chimie pour sa disponibilité.

Un grand merci à nos amis et à nos familles de nous avoir encouragé et soutenu jusqu'au bout.



Dédicaces

En manière de reconnaissance, je dédie ce travail

À mes chers parents

*Sources constantes d'encouragement, de soutien,
de confiance et d'affection.*

À mes frères Hanine et Zineddine,

Ainsi qu'à toute ma famille et mes amis.

À ma très chère binôme Lamia copine et amie,

nous avons formé une très bonne équipe, partagé des

moments uniques et inoubliables.

Ania





Dédicaces

Je dédie ce mémoire

*A mes chers et précieux parents pour leur amour
inestimable, leurs sacrifices, leur confiance et leur
soutien.*

*A mon grand frère Malik pour ses encouragements,
sa présence et son aide du début jusqu'à la fin.*

*A mes deux petits frères Akli et Yanis ainsi qu'à
tous mes amis qui m'ont encouragé et soutenu tout le
long de ce travail.*

*A ma très chère binôme Ania, sans tes efforts et ta
patience ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Je te
suis reconnaissante pour tous les moments inoubliables
qu'on a partagés.*

Lamia



Liste des abréviations

A. Ascorbique : acide ascorbique.

Abs : absorbance.

ATCC : american type culture collection.

B. fruticosum : *Bupleurum fruticosum*.

C : carbone.

C_{ft} : concentration des flavonoïdes totaux.

C.H.U : centre hospitalier universitaire.

cm : centimètre.

C_{ppt} : concentration des polyphénols totaux.

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

FRAP : ferric reducing antioxidant power.

g : gramme.

h : heure.

HPLC : high performance liquid chromatography.

IC50 : concentration inhibitrice à 50%.

m : mètre.

M : mole.

mg AGE/ g E : milligramme d'acide gallique équivalent par gramme d'extrait.

Mg QE/ g E : milligrammes de quercétine équivalent par gramme d'extrait.

MH : Muller-Hilton.

min : minute.

ml : millilitre.

nm : nanomètre.

OMS : organisation mondiale de la santé.

pH : potentiel hydrogène.

PNG : parc national de Gouraya.

RNS : reactive nitrogen species.

ROS : reactive oxygen species.

sec : seconde.

tr/min : tour par minute.

UV : ultraviolet.

°C : degré celsius.

µg : microgramme.

µl : microlitre.

Liste des figures

Figure 1 : schéma général d'une extraction végétale solide/liquide.	4
Figure 2 : distribution des métabolites secondaires dans le règne végétal.	5
Figure 3 : noyau de base des composés phénoliques.	6
Figure 4 : structure de base d'un flavonoïde.	7
Figure 5 : exemple de saponine stéroïdienne à 4 chaînes de sucre.	8
Figure 6 : structure de base d'isoprène.	9
Figure 7 : différentes classes de terpénoides.	9
Figure 8 : répartition géographique mondiale des Apiaceae.	13
Figure 9 : collecte des différents organes de la plante <i>Bupleurum fruticosum</i>	18
Figure 10 : séchage du <i>Bupleurum fruticosum</i>	19
Figure 11 : feuilles, tiges, racines du <i>B. fruticosum</i> broyés.	19
Figure 12 : filtrats hydro-méthanolique et dichlorométhanique du <i>Bupleurum fruticosum</i>	20
Figure 13 : procédé de décantation des deux phases des extraits polyphénoliques.	23
Figure 14 : évaporateur rotatif de type <i>Heldolph laborota 4001-efficient</i>	24
Figure 15 : faisceau incident I_0 et faisceau transmis I	26
Figure 16 : appareil de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).	27
Figure 17 : réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	29
Figure 18 : extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.	36
Figure 19 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	37
Figure 20 : teneur en composés phénoliques dans les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.	37
Figure 21 : courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.	38
Figure 22 : teneur en flavonoïdes dans les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.	39
Figure 23 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des feuilles.	40
Figure 24 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des tiges.	40
Figure 25 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des racines.	40
Figure 26 : chromatogramme HPLC des standards à 280nm.	41
Figure 27 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des feuilles à 280nm.	41
Figure 28 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des tiges à 280nm. ...	42

Figure 29 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des racines à 280nm.	42
Figure 30 : pouvoir réducteur des extraits de feuilles, tiges et racines et de l'acide ascorbique.....	43
Figure 31 : test de Piégeage du radical libre DPPH sur les extraits polyphenoliques du <i>Bupleurum fruticosom</i>	44
Figure 32 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.	45
Figure 33 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concertations de l'extrait polyphénolique des feuilles.	45
Figure 34 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique des tiges.	45
Figure 35 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique des racines.	46
Figure 36 : valeur d'IC 50 des extraits polyphénoliques des trois organes végétaux et de l'acide ascorbique.	46
Figure 37 : aromagrammes des activités antibactériennes des trois extraits polyphénoliques..	47
Figure 38 : aromagrammes des activités antifongiquesdes trois extraits polyphénoliques.	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : principales espèces réactives de l'oxygène.	11
Tableau 2 : répartition mondiale des genres Apiaceae.	13
Tableau 3 : quelques genres d'Apiaceae rencontrés en Algérie.	14
Tableau 4 : résultats de l'extraction des polyphénols des trois organes végétaux.	36
Tableau 5 : pourcentage d'inhibition des extraits polyphénoliques.	44
Tableau 6 : effet antibactérien des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
Tableau 7 : effet antibactérien des extraits sur <i>Salmonella typhimurium</i>	48
Tableau 8 : effet antibactérien des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	48

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Première partie : Généralités

1	Plante médicinale et extrait	3
1.1	Généralités	3
1.2	Plantes médicinales.....	3
1.3	Phytothérapie	3
1.4	Extraits.....	3
1.5	Extraction végétale	4
2	Métabolites secondaires des plantes médicinales.....	4
2.1	Composés phénoliques	5
2.2	Acides phénoliques.....	6
2.3	Flavonoïdes.....	6
2.4	Tanins	7
2.4.1	Tanins condensés	7
2.4.2	Tanins hydrolysables	7
2.5	Saponines.....	7
2.6	Alcaloïdes	8
2.7	Terpènes.....	8
3	Activité antioxydante.....	10
3.1	Radical libre.....	10
3.2	Stress oxydatif	10
3.3	Antioxydant	10

4	Activités biologiques	11
4.1	Activité antibactérienne	11
4.2	Activité antifongique	12

Deuxième partie : Bupleurum fruticosum

1	Généralités sur la famille des Apiaceae (ombellifères).....	13
2	<i>Bupleurum fruticosum</i>	14
2.1	Description botanique	14
2.2	Taxonomie	15
2.3	Répartition géographique	15
2.4	Noms vernaculaires du <i>Bupleurum fruticosum</i>	16
2.5	Composition chimique du <i>Bupleurum fruticosum</i>	16
2.6	Utilisation du <i>Bupleurum fruticosum</i>	17

Chapitre II : Matériels et méthodes

1	Choix et collecte du matériel végétal	18
1.1	Nettoyage.....	18
1.2	Séchage	18
1.3	Broyage.....	19
2	Tests d'identification phytochimiques	20
2.1	Préparation des extraits végétaux à tester.....	20
2.2	Tests réalisés.....	21
2.2.1	Test pour les saponosides.....	21
2.2.2	Test pour les polyphénols	21
2.2.3	Test pour les flavonoïdes	21
2.2.4	Test pour les coumarines	21
2.2.5	Test pour les tanins	21
2.2.6	Test pour les alcaloïdes	22
2.2.7	Test pour les stéroïdes et stérols	22
2.2.8	Test pour l'amidon	22
2.2.9	Test pour les composés réducteurs.....	22

3	Extraction des polyphénols	22
4	Rendement d'extraction.....	24
5	Dosage des métabolites secondaires.....	24
5.1	Dosage des phénols totaux	24
5.2	Dosage des flavonoïdes Totaux	25
6	Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques.....	26
6.1	Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible	26
6.2	Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrophotométrie Ultraviolet.....	27
7	Mesure de l'activité antioxydante	28
7.1	Test de la réduction du fer (FRAP)	28
7.2	Effet scavenger du radical DPPH	29
8	Détermination des activités biologiques.....	30
8.1	Activité antibactérienne	30
8.2	Activité antifongique	32

Chapitre III : Résultats et discussions

1	Tests phytochimiques	34
2	Rendement d'extraction.....	35
3	Dosages des métabolites secondaires	36
3.1	Dosage des polyphénols totaux	36
3.2	Dosage des flavonoïdes	38
4	Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques	39
4.1	Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible	39
4.2	Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrophotométrie Ultraviolet.....	41

5	Mesure de l'activité antioxydante	42
5.1	Test de la réduction du fer (FRAP)	43
5.2	Effet scavenger du radical libre DPPH.....	44
6	Détermination des activités biologiques.....	47
6.1	Activité antibactérienne	47
6.2	Activité antifongique	48

Conclusion

Annexes

Résumé

Introduction

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme puisque celles-ci s'imposent sur la planète par leur aspect, leur exubérance et leur mystère. Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses, c'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. L'usage de ces extraits est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, recommandée d'ailleurs par l'OMS. [1]

L'Algérie possède une flore parmi les plus diversifiées et les plus riches du bassin méditerranéen. Environ 4000 espèces réparties sur près de 150 familles. Parmi lesquelles se distingue la famille des Apiaceae qui comprend environ 450 genres avec 3540 espèces. [2]

Les espèces appartenant à la famille des Apiaceae sont très riches en métabolites secondaires potentiellement actifs. On y trouve le genre *Bupleurum* qui est inscrit dans les pharmacopées chinoises et japonaises. Au delà de leurs propriétés médicales, qui ont fait l'objet de dizaines de publications et ont conduit aux dépôts de plus de 400 brevets, ces plantes sont utilisées comme suppléments diététiques. [3]

Le *Bupleurum fruticosum* est un ombellifère qui est exploité dans plusieurs domaines alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques, en raison de la variété de ses vertus thérapeutiques (antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, antiseptiques etc.).

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est de quantifier les composés phénoliques des différents organes (racines, tiges et feuilles) du *Bupleurum fruticosum* et d'évaluer leurs activités (antioxydante et biologique).

Pour atteindre ces objectifs, nous avons structuré notre travail comme suit:

Le premier chapitre est une étude bibliographique qui comporte deux parties. La première partie aborde les généralités et les définitions relatives à notre objet d'étude, la deuxième partie présente la famille des Apiaceae et s'étale sur la plante *Bupleurum fruticosum* et son domaine d'utilisation.

La partie expérimentale constitue le deuxième chapitre de notre travail. Ce chapitre portera sur le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude dont le premier axe concerne l'extraction des composés phénoliques par solvant suivi par la qualification et la quantification des teneurs de ces composés. Dans le deuxième axe, nous nous sommes

intéressés au pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique des extraits polyphénoliques des différents organes de la plante (racines, tiges et feuilles).

Par ailleurs, le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussions relatifs aux teneurs en composés phénoliques et aux activités (antioxydante, antibactérienne et antifongique) de ces derniers. Le manuscrit se termine par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I:
Synthèse bibliographique

Première partie :
Généralités

1 Plante médicinale et extrait

1.1 Généralités

Les remèdes naturels, en particulier les plantes médicinales, sont la principale ou la seule promesse des remèdes oraux traditionnels. Elles peuvent même être utilisées comme matière première dans la médecine moderne. [4]

C'est Hippocrate qui définit le concept de dose, qui distingue l'usage interne et externe de ces plantes et permet la distinction entre médicaments et poisons. [5]

1.2 Plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante dont les organes tels que les feuilles ou les écorces sont utilisés avec une certaine dose et de manière précise pour des propriétés curatives.

D'après la Xème édition 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 ». Ces plantes médicinales peuvent également être utilisées pour la nourriture, l'hygiène ou à d'autres fins. [4]

1.3 Phytothérapie

Étymologiquement le mot « phytothérapie » se compose de deux racines grecques : « *phuton* » signifiant plante et « *thérapie* » signifiant traitement.

La phytothérapie peut être définie comme une discipline allopathique visant à prévenir et traiter certaines maladies fonctionnelles et / ou pathologiques en utilisant des plantes, des parties de plantes ou des préparations à base de plantes. [6]

1.4 Extraits

Selon la Pharmacopée européenne (2013), l'extrait est une formulation liquide de consistance semi-solide ou solide, généralement obtenu à partir des plantes médicinales ou de matières premières animales.

1.5 Extraction végétale

L'extraction végétale est un procédé visant à extraire des composants présents dans les plantes. Il s'agit d'une opération de séparation solide/liquide, le solide (la plante) est mis en contact avec le liquide (solvant). Ensuite le solvant est éliminé pour obtenir l'extrait brut de la plante. Comme il est montré dans la **figure 1**.

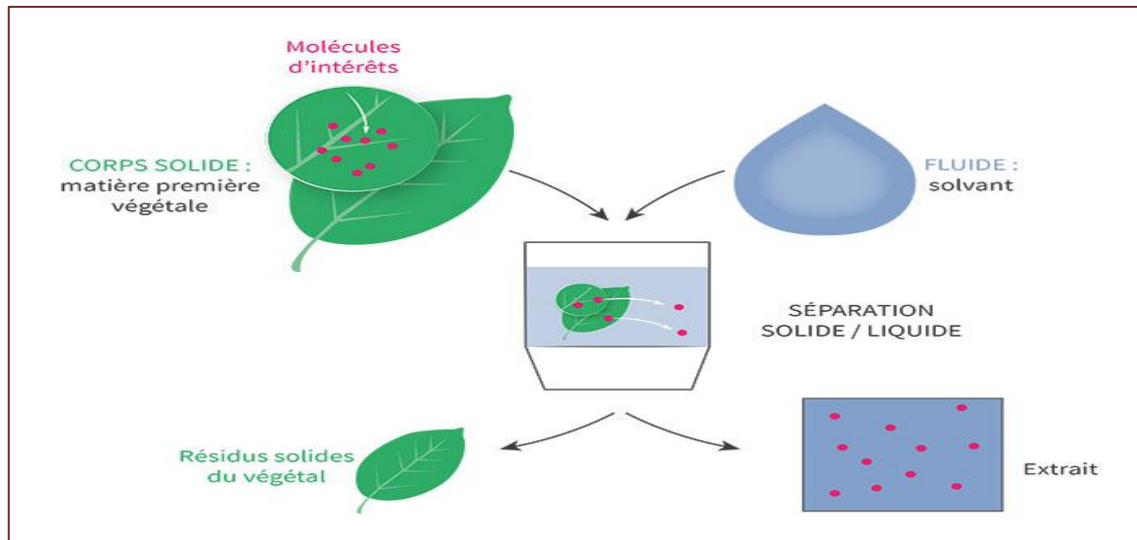


Figure 1 : schéma général d'une extraction végétale solide/liquide. [7]

Le schéma général de l'extraction solide/liquide est déclinable de cinq manières différentes: [7]

La macération : la phase de contact est maintenue à température ambiante.

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.

2 Métabolites secondaires des plantes médicinales

Les métabolites secondaires sont des molécules produites par les plantes, ce sont des produits intermédiaires issus du métabolisme. Ils servent de défense contre les agressions extérieures, au contraire d'autres qui permettent d'attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques tels que les pollinisateurs.

Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes ou mutagènes. [8]

Le nombre de métabolites secondaires est très important, définissant plus de 200 000 structures. [9] Ils peuvent être divisés en trois grandes familles de composés naturels : les terpénoïdes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (**figure 2**).

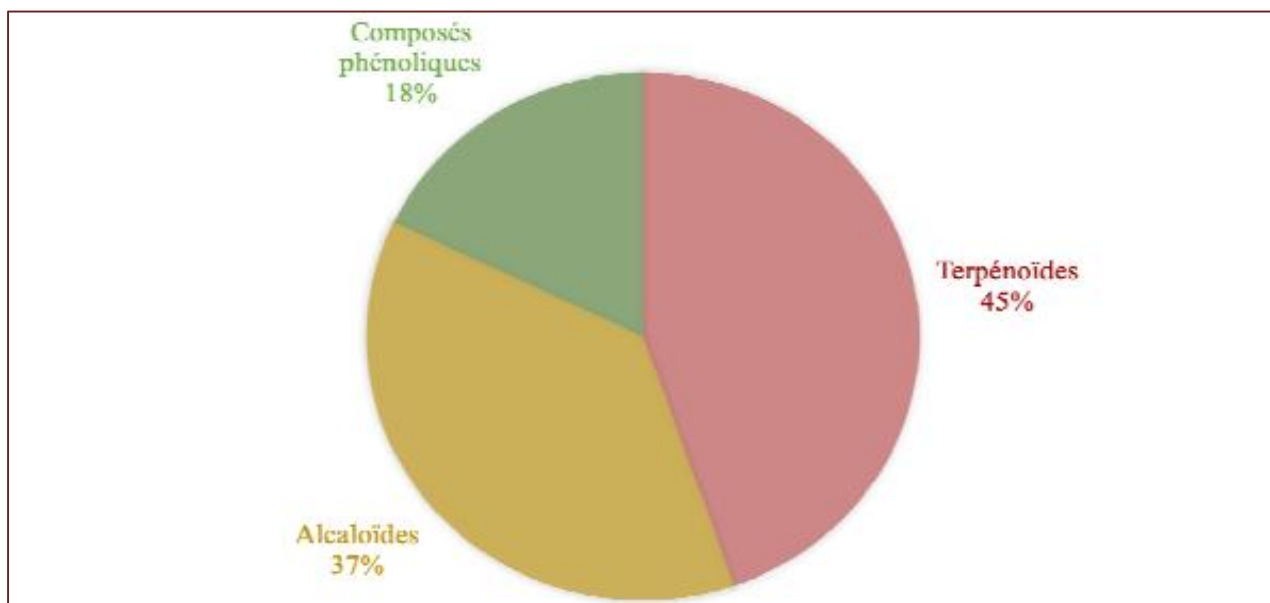


Figure 2 : distribution des métabolites secondaires dans le règne végétal.

2.1 Composés phénoliques

Ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. Ils sont présents dans presque toutes les plantes s'accumulant dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et les fruits. [10]

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'en moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ester, éther, hétéroside. [11]

Donc 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 (**voir annexe 1, tableau 1**).

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, et parmi elles, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont été classés selon leur source d'origine, leur fonction biologique et leur structure chimique. [12] On considère, les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tannins comme les principaux composés phénoliques. [13]

La structure de base d'un composé phénolique est présentée dans la **figure 3**

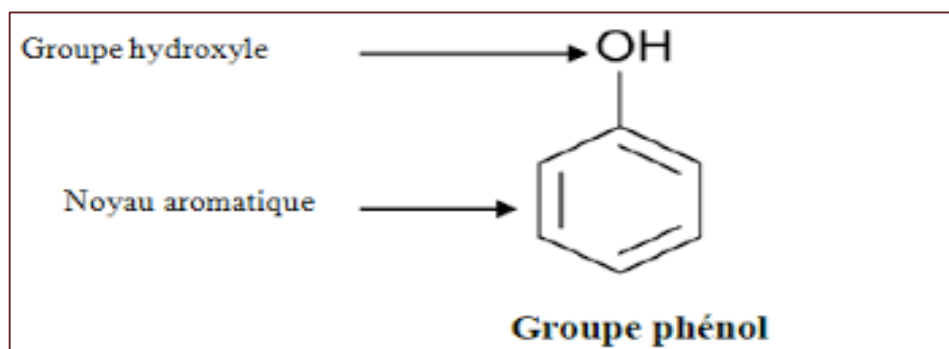


Figure 3 : noyau de base des composés phénoliques.

2.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques ou acides phénols sont des composés organiques possédant en moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont classés en deux principales classes : les hydroxybenzoïques et les hydroxycinnamiques. Ces derniers sont très présents dans l'alimentation, par contre les hydroxybenzoïques sont assez rares. [14]

Les hydroxybenzoïques : avec une structure de C6-C3 en commun qui contient plusieurs molécules, parmi elles : l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le *p*-hydroxybenzoïque (**voir annexe 1, figure 1**).

Les hydroxycinnamiques : possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C6-C3, on cite : l'acide caféique, l'acide férulique, *p*-coumarique, et l'acide sinapique (**voir annexe 1, figure 2**). [13]

2.3 Flavonoïdes

Ce sont des molécules largement distribuées dans le règne végétal. Ils sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et parfois des feuilles, [14] et représentent une source importante d'antioxydants, d'anti inflammatoires, d'anti mutagènes, d'anti carcinogènes et une activité anti virale potentielle. [15]

La structure de base d'un flavonoïde est présentée dans la **figure 4**.

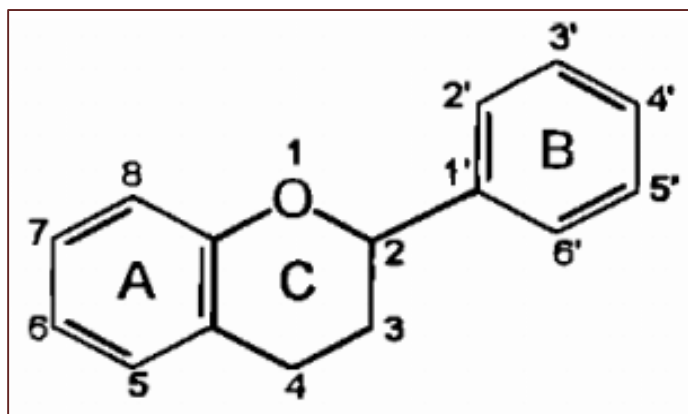


Figure 4 : structure de base d'un flavonoïde. [13]

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes, de conformation de la structure centrale différente. On distingue alors : les flavones, les flavonols, les flavonones, Flavan-3-ols, isoflavones etc (**voir annexe 1, figure 3**). [9]

2.4 Tanins

Les tanins sont présents dans toutes les plantes à un degré plus ou moins élevé, ils provoquent l'amertume dans l'écorce et les feuilles des arbres. [16]

Ceux sont des polyphénols avec un grand poids moléculaire et sont subdivisés en deux classes différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. [17]

2.4.1 Tanins condensés

Ce sont des polyphénols de masses molaires élevées. Ils sont constitués des unités de flavane-3-4-diols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type C4-C8, ou de type C4-C6. [9]

2.4.2 Tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique concentré sur des dérivés glycolyse, ils comprennent l'acide gallique et ses dimères hexahydroxybiphényle. Comme son nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et alcaline. [9]

2.5 Saponines

Les saponines ou les saponosides sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes, elles sont composées de deux parties : une chaîne

glucidique hydrosoluble et une structure liposoluble généralement triterpénique ou stéroïde (**figure 5**).

Les saponines sont caractérisées par leurs propriétés tensioactives et elles se dissolvent dans l'eau en formant une solution moussante en raison de leur activité de tension.

Plusieurs saponosides sont utilisés par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de médicaments ou par l'industrie cosmétique pour leur propriété détergente. [18]

Ils sont présents dans tous les organes surtout dans les racines. [19]

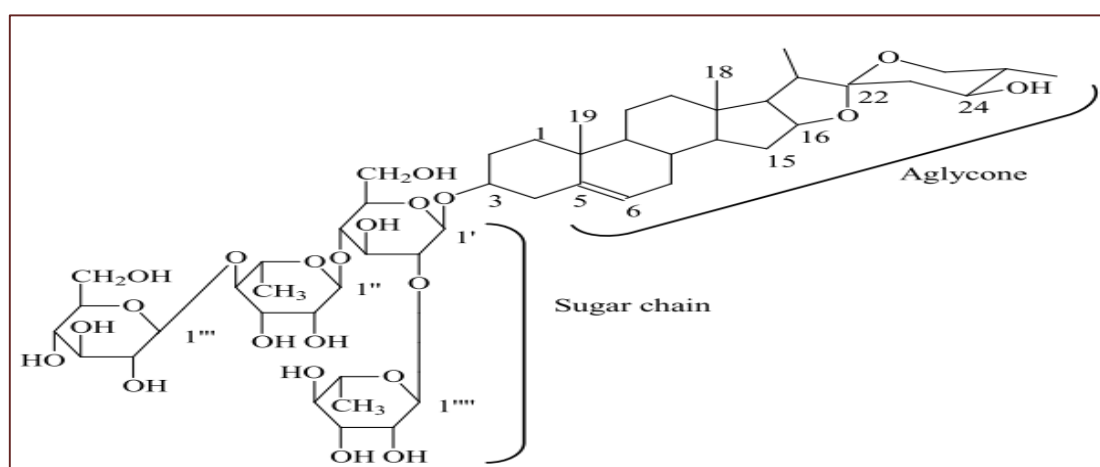


Figure 5 : exemple de saponine stéroïdienne à 4 chaînes de sucre. [18]

2.6 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques le plus souvent d'origine végétale. Ils sont basiques, azotés, généralement hétérocycliques, peu solubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques. Ils sont fortement toxiques et ils donnent des poisons, ou bien des médicaments. [20]

Sur le plan chimique, ils constituent un groupe très hétérogène possédant cependant quelques propriétés physicochimiques communes. Ils portent tous la terminaison « INE » (**voir annexe 1, figure 4**).

2.7 Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels produits par de nombreuses plantes, généralement conservés dans les épinés ; racines, ou encore les feuilles. Ils constituent le

principe odoriférant des végétaux. Leur odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. [20]

Leur structure de base est composée d'un nombre variable d'unités de cinq carbones, appelées unités isoprènes (**figure 6**). Le nombre de carbone d'un terpène est alors un multiple de 5.

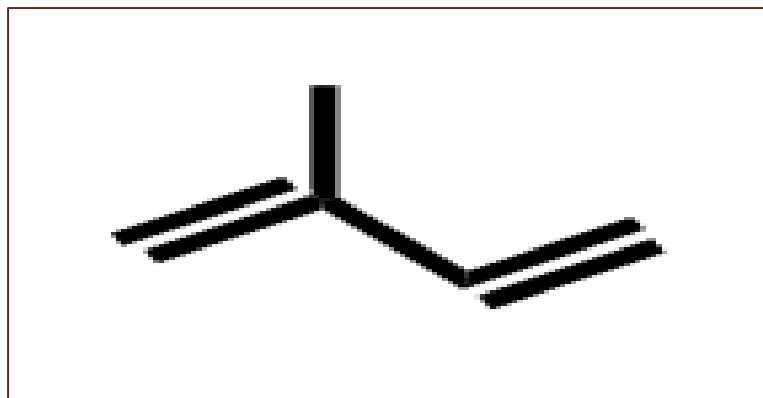


Figure 6 : structure de base d'isoprène.

Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités à cinq carbones présentes dans leur structure chimique. Ce sont: les hémiterpènes en C5, les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les sesterpènes en C25, les triterpènes en C30, les tétraterpènes en C40 et les polyterpènes tels qu'ils sont présentés dans la **figure 7**. [21]

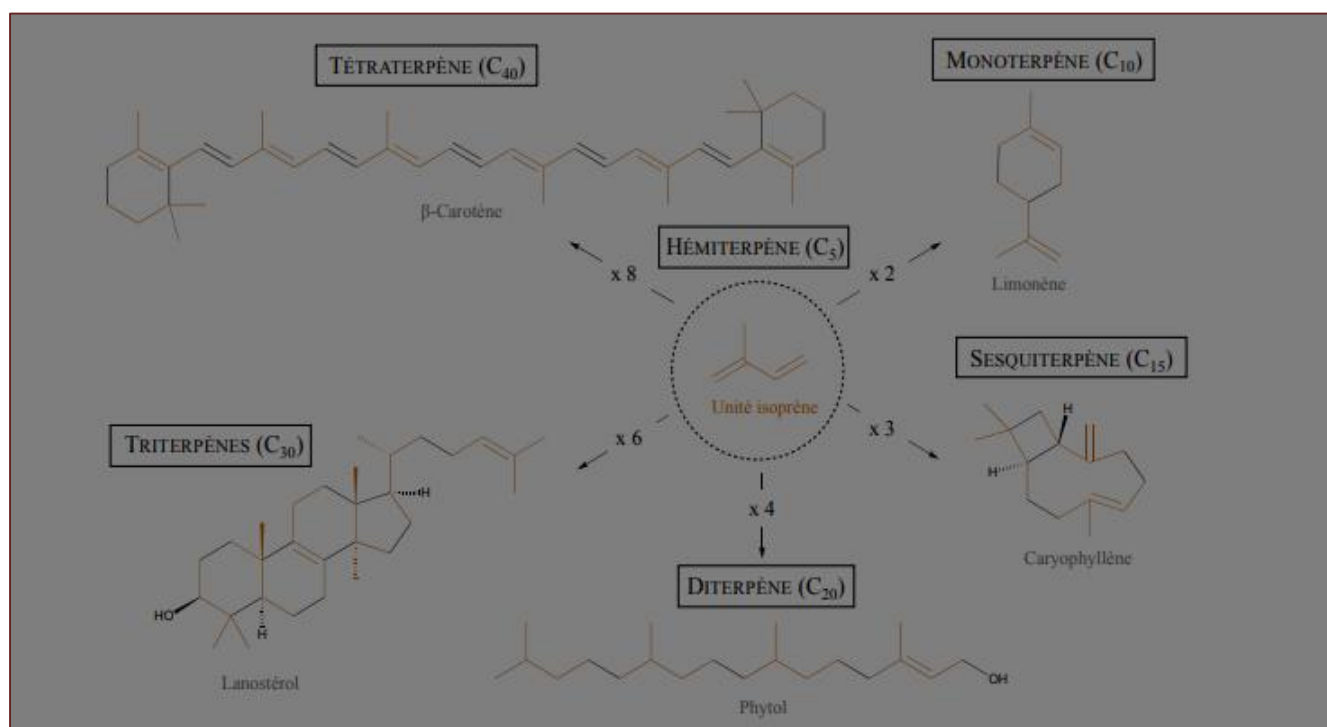


Figure 7 : différentes classes de terpénoides.

3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante du composé correspond à la capacité de résister à l'oxydation. En fait, la plupart des antioxydants synthétiques provenant de sources naturelles ont des groupes hydroxyles phénoliques dans leurs structures, et leurs propriétés antioxydantes sont en partie attribuées à la capacité de ces composés naturels à piéger et à naturaliser les radicaux libres.

3.1 Radical libre

Un radical libre est une substance chimique qui a un ou plusieurs électrons non appariés, extrêmement instable, à haute énergie, qui avant d'être neutralisé détruit tout ce qu'il rencontre. Ce dernier apparaît soit au cours d'une rupture symétrique d'une liaison covalente (chaque atome conserve son électron), soit au cours d'une réaction redox avec une perte ou un gain d'électron à partir d'un composé non radical. [22]

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène. [19]

3.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif fait référence au problème de l'équilibre du métabolisme cellulaire, durant lequel, la production d'oxydants a submergé le système de défense antioxydant, En augmentant la production d'oxydants et / ou en diminuant la défense antioxydante.

L'accumulation d'antioxydants dans l'organisme cause l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique. [23]

3.3 Antioxydant

Un antioxydant est toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou évite l'oxydation de ce substrat.

L'antioxydant peut agir par de nombreux mécanismes différents qui peuvent être l'élimination direct de l'oxygène, le piégeage des espèces oxygénées ou azotées réactives (ROS et RNS), l'inhibition de la formation de ces ROS et RNS, la chélation des ions métalliques nécessaires à la génération des ROS ou la stimulation des défenses antioxydants endogènes. [23]

Les formules chimiques des principales espèces réactives de l'oxygène sont présentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : principales espèces réactives de l'oxygène. [22]

<i>ROS</i>	<i>Formule chimique</i>
Radical anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Trioxygène moléculaire	O_3
Oxygène singulet	1O_2
Radical hydroxyle	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical alkoxyde	RO°
Radical oxyde nitrique	$^{\circ}NO$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Hypochlorite	ClO^-
Radical peroxyde	ROO°
Peroxyde et hydroperoxyde	$ROOR'$ et $ROOH$

4 Activités biologiques

Selon de nombreuses études, les plantes médicinales contiennent de nombreux principes chimiques qui exercent diverses activités biologiques. Comme les activités antioxydantes, analgésiques, antivirales, antibactériennes, et antifongiques.

4.1 Activité antibactérienne

Les bactéries et les virus sont les principales causes de maladies qui existent dans l'environnement. Par conséquent, les agents antibactériens sont définis pour leurs capacités à tuer des populations microbiennes.

L'activité antibiotique fait donc référence à la capacité d'une substance à agir sur les micro-organismes nocifs principalement dans le corps humains. [24]

4.2 Activité antifongique

Les antifongiques ou fongicides sont des médicaments possédant la capacité de traiter les mycoses, c'est à dire des infections causés par des champignons microscopiques et levures.

Deuxième partie:
Bupleurum fruticosum

1 Généralités sur la famille des Apiaceae (ombellifères)

Les Apiaceae (Ombellifères) sont déjà présentes de manière diversifiées lors de l'apparition de l'homme. En effet, elles figurent parmi les premiers écrits de l'humanité. Elles ne manquent pas de se faire remarquer et d'être utilisées dans divers domaines dont l'alimentaire et le médicinal.

Cette vaste famille a été classée par Antoine Laurent de Jussieu en 1789 sous le nom d'Umbelliferae. De nos jours, c'est la terminologie de John Lindley qui fait autorité. [25] Elle donne la préférence au terme d'Apiaceae (basé sur le genre *Apium*). Cette famille se distribue dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord. [26]

La **figure 8** et le **tableau 2** illustrent la répartition géographique et mondiale des genres des Apiaceae.

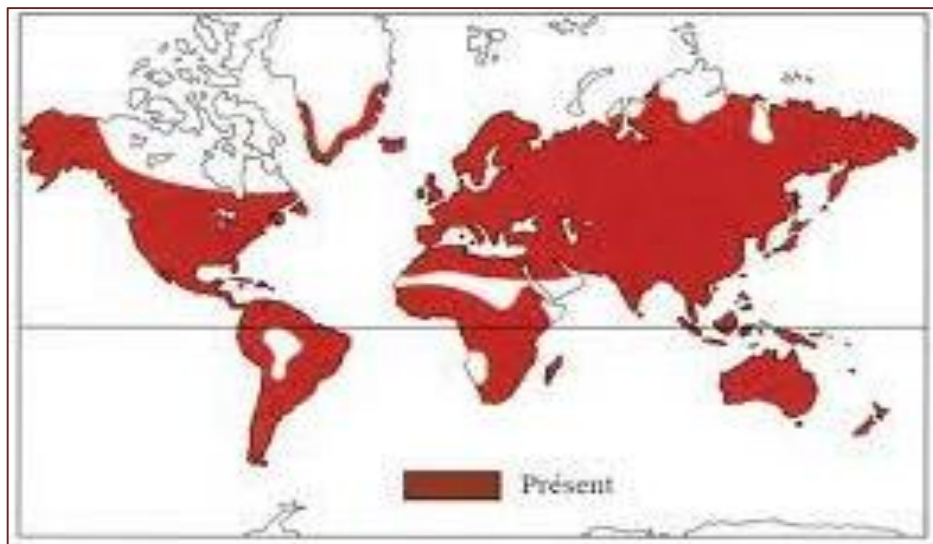


Figure 8 : répartition géographique mondiale des Apiaceae.

Tableau 2 : répartition mondiale des genres Apiaceae.

<i>Continent</i>	<i>Genres</i>	<i>Endémiques</i>
Afrique	126	50
Amérique	197	52
Asie	265	159
Australie	36	11
Europe	139	29

Les plantes de la famille des Apiaceae sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles, ou le plus souvent vivaces. Elles occupent une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces. [25] (**tableau 3**)

Tableau 3: quelques genres d'Apiaceae rencontrés en Algérie.

<i>N°</i>	<i>Genre</i>	<i>Nombre d'espèces</i>	<i>Espèces endémiques</i>
1	<i>Bunium</i>	7	(<i>B. fontanesii</i> , <i>B. chaberti</i> , <i>B. elatum</i> , <i>B. cassifolium</i>)
2	<i>Bupleurum</i>	14	(<i>B. plantagineum</i> , <i>B. atlanticum</i> , <i>B. montanum</i> , <i>B. balansae</i> , <i>B. oligactis</i>)
3	<i>Daucus</i>	11	(<i>D. reboudii</i>)
4	<i>Eryngium</i>	7	
5	<i>Ferula</i>	5	(<i>F. cossoniana</i> , <i>F. versceritensis</i>)
6	<i>Oenanthe</i>	6	(<i>Oe. vergata</i>)
7	<i>Caucalis</i>	4	(<i>C. bifrons</i>)

D'après ce tableau, on constate que Les genres *Bupleurum* et *Daucus* sont les plus riches au niveau spécifique avec respectivement 14 et 11 espèces. [25]

2 *Bupleurum fruticosum*

2.1 Description botanique

Le *Bupleurum fruticosum* pousse principalement dans les communautés de type maquis. [27]

Il forme un bel arbuste méditerranéen de croissance rapide pouvant atteindre 2 à 3 m de haut. C'est une ombellifère vivace à souche épaisse et ligneuse.

Cette plante persistante possède des branches très feuillues. Ses feuilles coriaces sont vert bleutées et argentées au revers, elles sont éparées, rondes, oblongues, sessiles, veinées en réseaux et munies d'une bordure étroite et transparente. [28]

En été, des ombelles de fleurs jaunes appréciées par les abeilles apparaissent en nombre. Elles sont suivies de fruits en étoile très décoratifs qui persistent longtemps sur l'arbuste en automne lui conférant un graphisme intéressant comme elle est présentée dans la **figure 11**. [29]



Figure 11 : *Bupleurum fruticosum* P.N.G.

2.2 Taxonomie

La classification du *Bupleurum Fruticosum* est la suivante : [30]

- **Règne** : Planteae
- **Division** : Tracheophyta
- **Subdivision** : Spermatophytina
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Super ordre** : Asteranae
- **Ordre** : Apiales
- **Famille** : Apiaceae
- **Genre** : Bupleurum
- **Espèce** : *Bupleurum fruticosum*.

2.3 Répartition géographique

Le *Bupleurum fruticosum* pousse en Europe du Sud, au Portugal, en Espagne, en France, en Grèce, en Italie du Sud, en Corse, en Sardaigne et en Sicile. Au-delà de l'Europe, il

a également été signalé en Afrique du Nord-Ouest, au Maroc, en Algérie et en Tunisie (**figure 12**). [27]

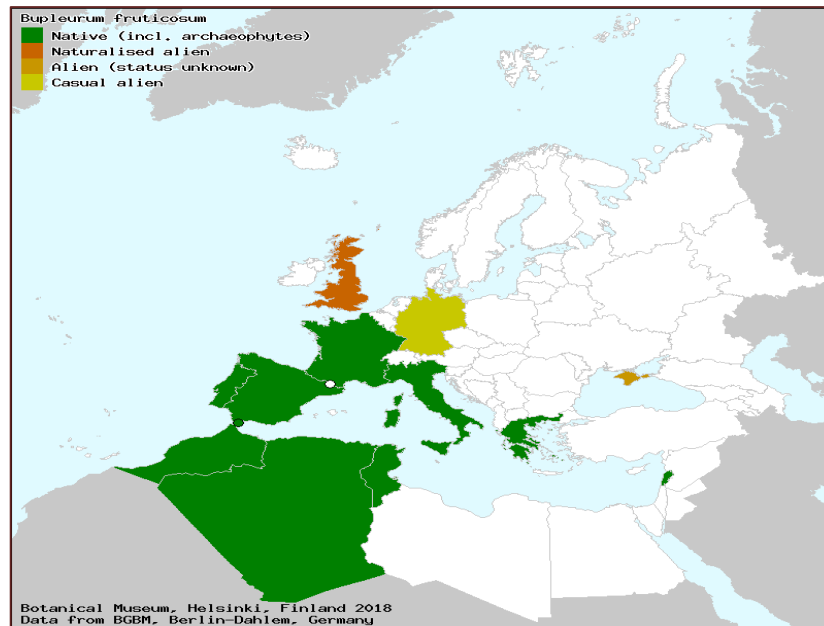


Figure 12 : répartition géographique du genre *Bupleurum fruticosum*.

2.4 Noms vernaculaires du *Bupleurum fruticosum*

- **En français** : Buplèvre ligneux
- **En valencien** : Matabou
- **En catalan** : Baladre
- **En sarde** : Lou Carbinu
- **En arabe/ berbère** : Douag
- **En Anglais** : shrubby hare's-ear

2.5 Composition chimique du *Bupleurum fruticosum*

Des 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, du polyacétylène, des huiles volatiles et des polysaccharides. [31]

2.6 Utilisation du *Bupleurum fruticosum*

Le *Bupleurum fruticosum* possède une odeur persistante due à la présence d'huile essentielle dans la tige et les feuilles et aussi un parfum et une saveur des fruits qui rappellent ceux du fenouil, c'est pour cela qu'il est parfois employé comme épice.

Cette plante est aussi employée en médecine traditionnelle comme remède anti inflammatoire et antimicrobien. [3]

Les racines et les fruits de *B. fruticosum* ont été utilisés dans de vieilles pharmacopées françaises contre l'aménorrhée. Ils sont aussi utilisés avec un certain succès contre les toux opiniâtres et la « gêne respiratoire qui oblige le malade à rester debout », pour traiter le rhume, la grippe, l'hépatite et la ménopause. [32]

Le *Bupleurum fruticosum* est l'une des plantes chinoises qui maintient l'équilibre énergétique du corps. Elle est utilisée comme tonifiant, améliorant de l'activité du tractus digestifs et la fonction du foie et contribue à un bon nettoyage des capillaires. Il fait tomber la fièvre plus particulièrement dans des cas où celle-ci s'accompagne d'un goût amer et irritant dans la bouche, et de vomissements de douleurs abdominales ou encore les vertiges. [16]

Chapitre II:
Matériels et méthodes

1 Choix et collecte du matériel végétal

La plante *Bupleurum fruticosum* a été récoltée avant la floraison (durant le mois d'Avril 2021), dans la région de Bejaïa, à une altitude d'environ 700m au parc national de Gouraya.

Le *Bupleurum fruticosum* utilisé dans cette étude expérimentale, a été identifié par le botaniste du parc Mr. DERIES Fatsah.

Le matériel végétal (les feuilles, les tiges et les racines) ont été traités comme suit :

1.1 Nettoyage

Les feuilles ont été essuyées à l'aide d'un tissu humide pour éliminer l'excès de poussière.

Les racines ont été nettoyées avec une brosse à linge pour éliminer la masse de boue.



Figure 9 : collecte des différents organes de la plante *Bupleurum fruticosum*.

1.2 Séchage

Le séchage de la plante a été réalisé dans un endroit sec, à l'air libre et à l'abri de la lumière durant un mois.



Figure 10 : séchage du *Bupleurum fruticosum*.

1.3 Broyage

Les feuilles sèches ont été concassées dans un sac en toile pour éviter le contact avec la sueur des mains et donc accumuler des impuretés, suivi par le broyage à l'aide d'un broyeur pour diminuer leurs tailles et augmenter la surface de contact avec le solvant.

Les tiges et les racines sont coupées puis broyées à l'aide d'un broyeur.



Figure 11 : feuilles, tiges, racines du *B.fruticosum* broyés.

2 Tests d'identification phytochimiques

2.1 Préparation des extraits végétaux à tester

Deux solvants de polarité différente ont été utilisés lors de l'examen phytochimiques. Eau-méthanol (solvant polaire) et le dicolorométhane (solvant apolaire).

Les extraits à tester ont été préparés comme suit :

- Deux masses de 10g de la poudre de chaque organe végétal (feuilles, tiges, racines) sont placées dans deux erlenmeyers contenant chacun 150ml de eau-méthanol (30/70 : v/v), et 150ml du dicolorométhane pendant 24h à température ambiante.

- Filtration des macéras à l'aide d'un papier **WATTMAN** et récupération des filtrats dans des erlenmeyers.

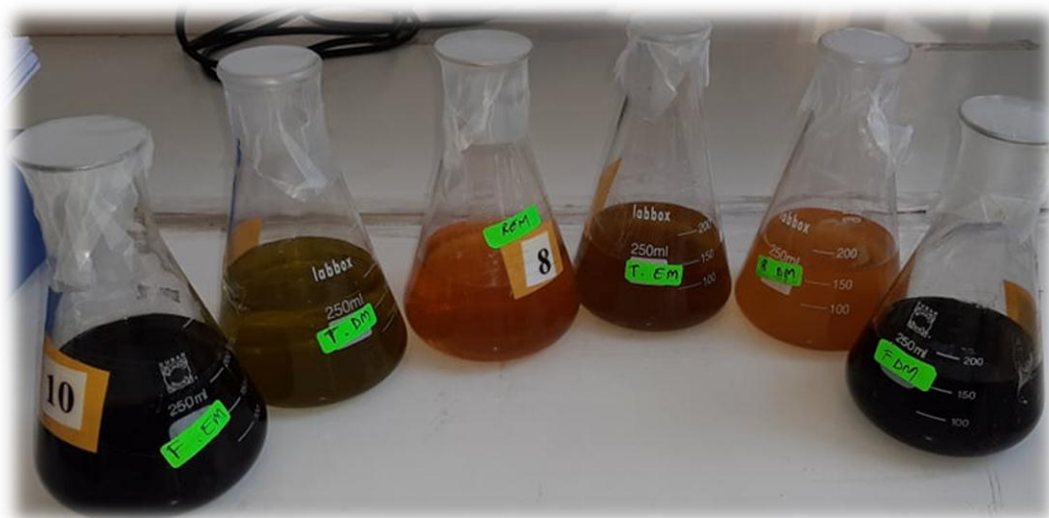


Figure 12 : filtrats hydro-méthanoliques et diclorométhaniques des trois organes de la plante.

- Les filtrats récupérés subissent une évaporation à sec sous pression réduite dans un rota vapeur de type *Heldolphlaborota 4001-efficient* à 70°C.

- Récupération des extraits secs dans des flacons en verre opaque pour une conservation à l'abri de la lumière.

L'étude phytochimique a pour but de caractériser la présence ou l'absence des constituants chimiques d'une plante. Ils sont basés sur des réactions de coloration et de précipitation.

2.2 Tests réalisés

2.2.1 Test pour les saponosides

Traiter l'extrait sec avec de l'eau bouillante, laisser refroidir puis agiter fortement (deux agitation/s) pendant 15sec jusqu'à formation d'une mousse. Laisser reposer pendant 20min.

- Pas de mousse = test négatif
- 1cm de mousse = très faiblement positif
- Mousse de 1 à 2cm = très positif
- Mousse plus de 2cm = très très positif. [33]

2.2.2 Test pour les polyphénols

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

Ajouter une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%, à 2ml de chaque extrait (hydro-méthanolique et diclorométhanique).

- L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols. [34]

2.2.3 Test pour les flavonoïdes

Quelques gouttes d'HCl concentré sont mises en contact avec 5ml de l'extrait méthanolique. Ensuite, 3 copeaux de magnésium sont ajoutés.

- La présence des flavonoïdes est déterminée par la formation d'une couleur rouge pour les flavonols, orange pour les flavones et violet pour les flavonones. [33]

2.2.4 Test pour les coumarines

Verser 3ml de NaOH à 10% dans l'extrait aqueux.

- La présence des coumarines est détectée par l'apparition d'une couleur jaune. [35]

2.2.5 Test pour les tanins

2ml de chaque extrait aqueux a été ajouté à 0.5ml de FeCl_3 à 1%.

- La présence de tanins est dévoilée par l'apparition d'une coloration verdâtres ou brune (tanins catéchiques) ou bleu noir (tanins galliques). [33]

2.2.6 Test pour les alcaloïdes

10ml d'une solution méthanolique de chaque extrait est chauffée jusqu'à évaporation totale du solvant. Le résidu obtenu est dissout dans 1.5ml de HCL à 2% ensuite 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer (**voir annexe 2**) sont ajoutées à la solution obtenue.

- La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre. [33]

2.2.7 Test pour les stéroïdes et stérols

10ml d'une solution méthanolique de chaque extrait est chauffée jusqu'à évaporation totale du solvant. Le résidu obtenu est dissout dans 0.5ml d'anhydride acétique et 0.5ml de chloroforme, puis traiter le filtrat avec le réactif de Libermann Burchardt.

- Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiens et tri-terpéniques respectivement des colorations bleue et verte violette. [33]

2.2.8 Test pour l'amidon

5ml de l'extrait est traité avec le réactif d'amidon. (**voir annexe 2**)

- La présence d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon. [33]

2.2.9 Test pour les composés réducteurs

Verser 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling dans 2ml de l'extrait et chauffer.

- Un précipité rouge brique montre la présence d'hydrate de carbone. [33]

3 Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols a été réalisée selon les étapes suivantes :

- 100g de tiges, de feuilles et de racines finement broyées ont été macérées séparément dans 1500ml d'une solution eau-méthanol (50/50 : v/v) pendant 72h à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- Filtration des extraits hydro-méthanoliques à l'aide d'un papier **WATTMAN N°1** et récupération des filtrats dans des récipients en verre.

- Ajout de l'hexane aux filtrats récupérés puis élimination de la phase hexanique (élimination des corps gras) par décantation et récupération de la phase eau/méthanol. L'opération a été effectuée deux fois. (**figure 13**)



Figure 13 : procédé de décantation des deux phases des extraits polyphénoliques.

- Elimination du méthanol par évaporation sous vide en se servant d'un évaporateur rotatif réglé à une température de 40°C.
- Mélange des phases aqueuses obtenues des trois extraits (feuilles, tiges, racines) avec le dichlorométhane pour éliminer les pigments (chlorophylle, etc.), cette étape est effectuée 2 fois pour les racines et les tiges et 3 fois pour les feuilles.
- Séparation des deux phases aqueuses et dichlorométhaniques des trois extraits par décantation et récupération des phases aqueuses.
- Elimination de l'eau par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à une température de 75°C et récupération des extraits phénoliques dans des boîtes de pétri en verre couvertes par un papier paraffiné perforé pour un séchage complet des extraits polyphénoliques.



Figure 14 : évaporateur rotatif de type *Heldolphlaborota 4001-efficient*.

4 Rendement d'extraction

Le rendement désigne le rapport entre la masse de la matière végétale sèche et la masse de l'extrait obtenue.

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

$$R(\%) = \frac{ME}{MS} \times 100.$$

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. [36]

5 Dosage des métabolites secondaires

Les dosages des principes actifs font partie des contrôles de qualité des plantes médicinales. Ils attestent du degré d'activité thérapeutique de la drogue et déterminent donc sa qualité pharmaceutique. [37]

5.1 Dosage des phénols totaux

Le principe de dosage des phénols totaux repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques et phospho-tungstique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les composés phénoliques. Il en résulte la

formation d'un complexe bleu (**voir annexe 3, figure 6**) qui accompagne l'oxydation des composés phénoliques et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium (NaCO_3) (**voir annexe 3, figure 8**). Le dosage des phénols totaux est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue. [38]

Mode opératoire :

- 1ml de chaque extrait (feuilles, tiges, racines) à 1mg/ml est mélangé avec le réactif de Folin (5ml, 1:10 dilué avec de l'eau distillée) et du Na_2CO_3 aqueux (4ml, 1M). Les mélanges ont été laissés au repos pendant 15min et les phénols totaux ont été déterminés en mesurant l'absorbance au spectrophotomètre UV de type *SHIMADZU UV-1900I* à une longueur d'onde (λ) de 765 nm.

La courbe standard a été préparée dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant des solutions d'acide gallique à différentes concentrations (0, 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, qui est un composé polyphénolique de référence. [39]

5.2 Dosage des flavonoïdes Totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium. [40] La couleur jaune de la solution apparaît lors de la formation d'un complexe flavonoïde- AlCl_3 (**voir annexe 3, figure 7**).

Mode opératoire :

- 0.5ml de chaque extrait hydro-méthanolique a été mélangé séparément avec 1,5ml de méthanol, 0,1ml de chlorure d'aluminium à 10 %, 0,1ml d'acétate de potassium 1M et 2,8ml d'eau distillée et laissé incubé à température ambiante pendant 30min. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 415nm.

La courbe d'étalonnage a été préparée dans les mêmes conditions que celles des extraits en utilisant la quercétine à des concentrations allant de 12,5 à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en termes de masse en quercétine équivalent, qui est un flavonoïde de référence (**voir annexe 3, figure 9**). [39]

6 Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques

6.1 Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire étudie les variations de transmission de radiations électromagnétiques résultant d'une absorption photonique par des molécules absorbantes. Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-Visible concernent les molécules en solution, et peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. Dans les deux cas, elles font appel à la loi de Beer-Lambert qui établit la relation entre l'absorbance, la concentration et la longueur de la solution de la cuve. [41]

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Avec :

A : absorbance

I₀ : intensité du faisceau incident

I : intensité du faisceau transmis

ε : coefficient d'extinction molaire (l.mol⁻¹.cm⁻¹)

C : concentration (mol.l⁻¹)

L : épaisseur de la cellule (cm)

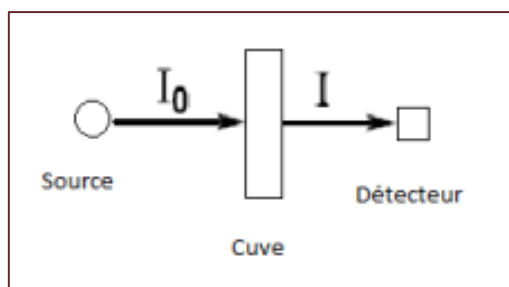


Figure 15 : faisceau incident I_0 et faisceau transmis I .

L'identification des constituants des extraits polyphénoliques a été réalisée avec un spectrophotomètre de type *SHIMADZU UV-1900I* à double faisceaux.

Un spectre est enregistré à partir d'une solution hydro-méthanolique des trois extraits (feuilles, racines, tiges), à concentration de 1mg/ml, disposée en cuve de quartz d'un centimètre d'épaisseur, dans le domaine de 200 à 400nm.

6.2 Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrophotométrie Ultraviolet

L'analyse chromatographique liquide à haute performance (HPLC) des extraits hydro-méthanoliques, a été réalisée avec un appareil de type *SHIMADZU SPD-20AV* couplé à un appareil *UV SHIMADZU RF-AXL* présenté dans la **figure 16**.



Figure 16 : 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.

Mode opératoire :

Les séparations ont été réalisées sur une colonne C18 à 30°C, avec une pré-colonne C18. La phase mobile est constituée de solvant A (0.1% (v/v) d'acide formique aqueux) et de solvant B (100% d'acétonitrile). Le gradient de solvant est réalisé comme suit : 15-20% B pendant 5min ; 20 à 44.5% de B pendant 45minutes ; 100% B pendant 1minute maintenu à 100% B pendant 9minutes, puis 15% B pendant 5minutes.

Le volume d'injection est de 100µl à un débit de 0.5ml/min. la détection est réalisé par un détecteur UV à 280nm. [42]

7 Mesure de l'activité antioxydante

7.1 Test de la réduction du fer (FRAP)

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer.

Le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduit en Fe^{2+} par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. [43]

Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage préparée en utilisant l'acide ascorbique dans les mêmes conditions à celle des extraits.

Tableau 4 : préparation de la gamme standard de l'acide ascorbique.

Tube à essai	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
A.Ascorbique(1mg/ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5
Méthanol	2.5	2	1.5	1	0.5	0
Concentrations obtenues	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

Mode opératoire :

- 2.5ml de chaque dilution est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1% (**voir annexe 4**).

- L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min ensuite, 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% (**voir annexe 4**) sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 5000 tr/min pendant 10min.

- Un aliquote (5ml) de surnageant est combinée avec 5ml d'eau distillée et 1ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1% (**voir annexe 4**).

La détermination de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par du méthanol qui permet de calibrer l'appareil UV-Visible. [44]

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. [40]

7.2 Effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH (1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl) est le radical libre le plus stable et le plus simple à analyser d'où son utilisation pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante. [45]

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH, ayant une couleur violette en un composé jaune (**figure 17**). Cette décoloration explique le pouvoir de l'extrait de la plante à piéger ce radical, qu'on peut détecter par un spectrophotomètre UV-Visible. [46]

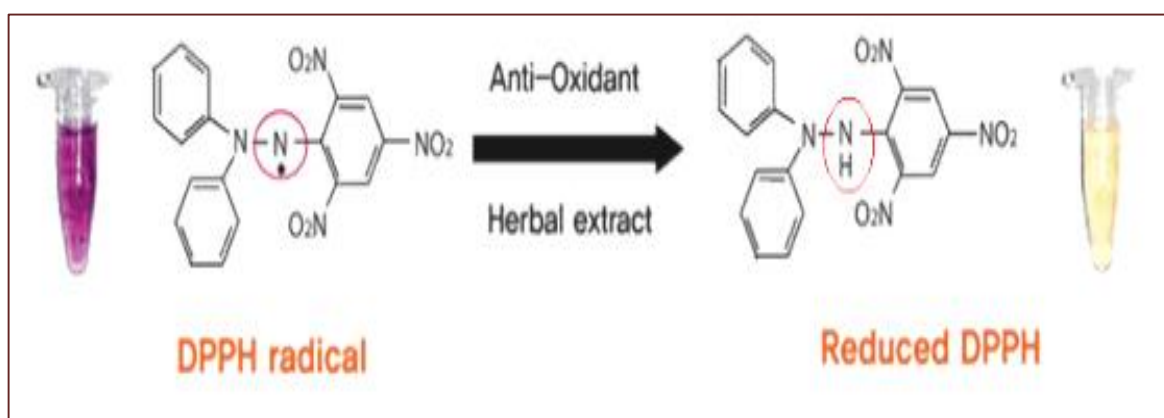


Figure 17 : réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Mode opératoire :

Pour mesurer cette activité, une prise d'essai d'1ml de chaque solution méthanolique des extraits polyphénoliques à différentes concentrations (0.125, 0.25, 0.5, 1) mg/ml est mélangée avec 40µl d'une solution de DPPH (40µg/ml). Après une agitation vigoureuse du mélange, il a été laissé au repos pendant 60min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en se référant à un témoin (acide ascorbique) préparé dans les mêmes conditions.

Détermination de l'IC50 :

La concentration inhibitrice de 50% est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de l'activité du DPPH. [47]

La valeur de la IC50 est déterminée graphiquement par la régression linéaire ou l'abscisse X est représenté par la concentration de l'échantillon testé (mg/ml) et l'ordonnée Y par le pourcentage d'inhibition (I%).

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et son calcul est effectué comme suit :

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100$$

- **Inhibition (%)** : pourcentage d'inhibition des radicaux libres.
- **Abs témoin** : absorbance du témoin.
- **Abs échantillon** : absorbance de l'échantillon.

8 Détermination des activités biologiques**8.1 Activité antibactérienne**

L'étude de l'activité antibactérienne a été faite au laboratoire de microbiologie de C.H.U Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou.

Mode opératoire :

La technique choisie est l'antibiogramme par diffusion de disques, utilisée pour étudier l'interaction entre les extraits polyphénoliques des trois organes végétaux du *Bupleurum fruticosum* avec les espèces bactériennes en inhibant la croissance de celles-ci.

- **Souches testées :**

Les souches bactériennes sur lesquelles l'activité antibactérienne a été évaluée sont des lots de l'ATCC représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : différents types de bactéries utilisées.

<i>Bactéries</i>	<i>Souches</i>
Gram -	<i>Escherichia coli</i>
Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram-	<i>Salmonella typhimurium</i>
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>

- **Ré-isolément des souches bactériennes**

Les bactéries sontensemencées sur des boîtes de pétri contenant une gélose MH et incubées pendant 24 heures dans une étuve à 37°C, afin d'obtenir une culture jeune de bactéries et des colonies isolées.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement approprié, les souches bactériennes choisies ont été raclées à l'aide d'un écouvillon et déchargées dans 5 à 10mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. Pour obtenir une suspension bactérienne homogène.

- **L'ensemencement**

L'ensemencement se fait selon les étapes suivantes :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ;
- L'essorer en le pressant fermement (et on le tournant contre la paroi interne du tube afin de décharger au maximum) ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées ;
- Répéter l'opération 3 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose ;
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- **Préparation de l'antibiogramme**

À l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen on prélève les disques stériles de 9mm de diamètre qu'on dépose sur la surface gélosée MH à un espace d'environ 20mm centre à centre de chaque disque.

- **Incubation et lecture**

Les boîtes de pétris sont ensuite fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération bactérienne à l'aide d'une règle. Les diamètres sont ainsi mesurés et comparés à des diagrammes de référence.

Tableau 6 : sensibilité des souches bactériennes en fonction des zones d'inhibition. [48]

<i>Sensibilité</i>	<i>Zones d'inhibition</i>
Non sensibles (-)	Diamètre<8mm
Sensible(+)	9mm<diamètre<14mm
Très sensible (++)	14mm<diamètre<19mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre>20mm

8.2 Activité antifongique

Les tests antifongiques ont pour objectifs la recherche de l'activité biologique de chaque extrait (feuilles, tiges, racines) vis-à-vis des souches de champignons testées.

Le test a été réalisé au niveau du laboratoire de mycologie du Centre Hospitalier Universitaire de Tizi-Ouzou.

Mode opératoire :

La technique choisie est l'antifongigramme par diffusion de disques, utilisée pour étudier l'interaction entre les extraits polyphénoliques des trois organes végétaux du *Bupleurum fruticosum* avec les champignons.

- **Matériel fongique:**

L'activité antifongique des différents extraits est évaluée sur les champignons pathogènes *Candida albicans* (*C.a*) et *l'aspergillus niger*. Ces souches sont conservées à température ambiante dans des tubes à essai gélosés.

Candida albicans est un champignon levuriforme opportuniste, responsable de la plupart des candidoses cutanées, muqueuses, phanériennes, septicémiques ou viscérales. Ces infections sont souvent mortelles pour les sujets dont l'immunodéficience est très accentuée (voir annexe 5, figure 11). [49]

Aspergillus niger est un champignon filamenteux qui apparaît sous forme de moisissure de couleur noire. C'est une espèce thermopréférante et osmopréférante avec une bonne croissance dans des milieux de culture à 25°C et 35°C (voir annexe 5, figure 12).

- **Ré-isolément des souches fongiques**

Cette étape consiste à isoler les colonies fongiques (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée puis les écouler sur un milieu gélosé sabouraud dans deux tubes à essai. Les tubes sont fermés sans serrer les bouchons puis incubés dans une étuve à 37°C pendant 48h.

- **Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme)**

Le milieu choisi pour les souches fongiques est la gélose Muller-Hinton (MH), dans des boîtes de pétri stériles. La gélose doit être séchée avant l'application.

- **Inoculum, Encensement et préparation de l'antifongogramme**

Ces trois étapes se font de la même façon que le test antibactérien.

- **Incubation et lecture**

Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et incubées à 37°C pendant 48 heures. La lecture est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération fongique à l'aide d'une règle. Les diamètres sont ainsi mesurés et comparés à des diagrammes de référence.

Chapitre III :
Résultats et discussions

1 Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques des deux extraits, hydro-méthanolique et diclorométhaniques effectués sur les trois organes (feuilles, tiges, racines) du *Bupleurum fruticosum* sont représentés dans le tableau suivant :

1^{er} organe : feuilles

<i>Extraits</i> <i>Familles des composés</i>	<i>Hydro-méthanolique</i>	<i>Diclorométhaniques</i>
Polyphénols	++	-
Stérols et stéroïdes	-	++
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	++	-
Amidon	+	-
Saponines	+	+
Tanins	++	+
Composés réducteurs	-	-
Coumarines	-	-

2^{eme} organe : tiges

<i>Extraits</i> <i>Familles des composés</i>	<i>Hydro-méthanolique</i>	<i>Diclorométhaniques</i>
Polyphénols	++	-
Stérols et stéroïdes	-	++
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+	-
Amidon	-	-
Saponines	-	+
Tanins	++	+
Composés réducteurs	-	-
Coumarines	-	+

3^{eme} organe : racines

<i>Familles des composés</i> \ <i>Extraits</i>	<i>Hydro-méthanolique</i>	<i>Diclorométhaniques</i>
Polyphénols	++	-
Stérols et stéroïdes	+	++
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+	-
Amidon	-	-
Saponines	++	++
Tanins	++	+
Composés réducteurs	-	-
Coumarines	-	-

(-) : test négatif

(+) : test faiblement positif

(++) : test positif

Les résultats des tests phytochimiques montrent l'absence des alcaloïdes et les composés réducteurs dans les trois organes végétaux du *Bupleurum Fruticosum*.

Pour les extraits hydro-méthanoliques, on distingue une forte présence de polyphénols et des tanins dans les feuilles, les tiges et les racines. Une couleur bleu noir dans les feuilles révèle la présence des tanins galliques tandis que la couleur brun verdâtre présente dans les tiges et les racines révèle la présence des tanins catéchiques. Comme on observe la présence des flavonoïdes dans les trois organes végétaux.

Les saponines sont fortement présentes dans les racines (une longueur d'environ 4cm de mousse a été formée lors du test d'identification de celle-ci).

En ce qui concerne les extraits diclorométhaniques, les trois organes du *Bupleurum fruticosum* sont riches en stérols et triterpènes.

2 Rendement d'extraction

On se référant aux tests phytochimiques effectués sur les feuilles, les tiges et les racines, on déduit que le solvant approprié pour extraire les polyphénols est le mélange eau-méthanol (50/50 : v/v). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : résultats de l'extraction des polyphénols des trois organes végétaux.

<i>Organe végétal</i>	<i>Feuille</i>	<i>Tige</i>	<i>Racine</i>
Quantité de la plante (g)	100	100	100
Volume du solvant (ml)	1500	1500	1500
Eau-méthanol (50/50)			
Rendement(%)	29.16	9.41	18.53
Aspect	Visqueux très collant		
Couleur	Verte intense	Brune	
Odeur	Douce sucré		

Le rendement est supérieur pour l'extraction des polyphénols dans les feuilles ce qui se traduit par une grande présence de polyphénols dans cet organe.

La **figure 18** montre les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.

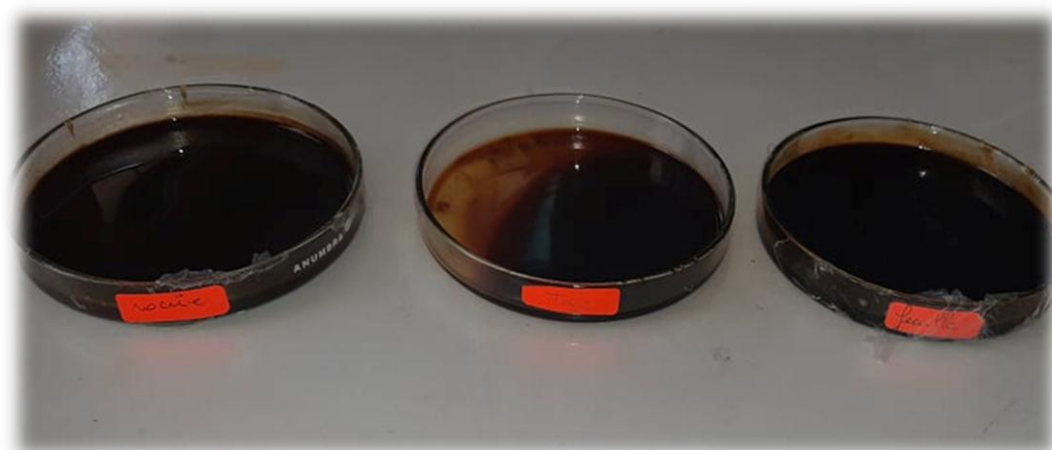


Figure 18 : extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.

3 Dosages des métabolites secondaires

3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des trois extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

L'équation de la courbe de calibration préparée par l'acide gallique est :

$$Y = 3.942x - 0.0395, R^2 = 0.9989 \longleftrightarrow C_{\text{ppt}} = (y + 0.0395) / 3.942 \text{ mg/ml}$$

Y : Absorbance mesurée par le spectrophotomètre.

X : concentration de la solution hydro-méthanolique de l'acide gallique (mg/ml) préparée dans un mélange eau-méthanol (50/50 : v/v).

C_{ppt} : concentration des polyphénols totaux recherchés dans la solution analysée des extraits des feuilles, tiges et racines.

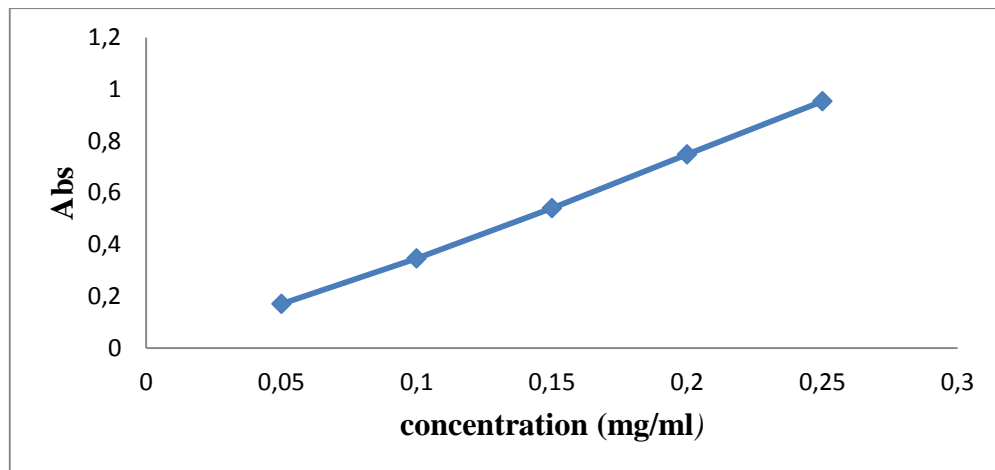


Figure 19 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La teneur en composés polyphénoliques des extraits des feuilles, tiges et racines est représentée dans la figure ci-dessous :

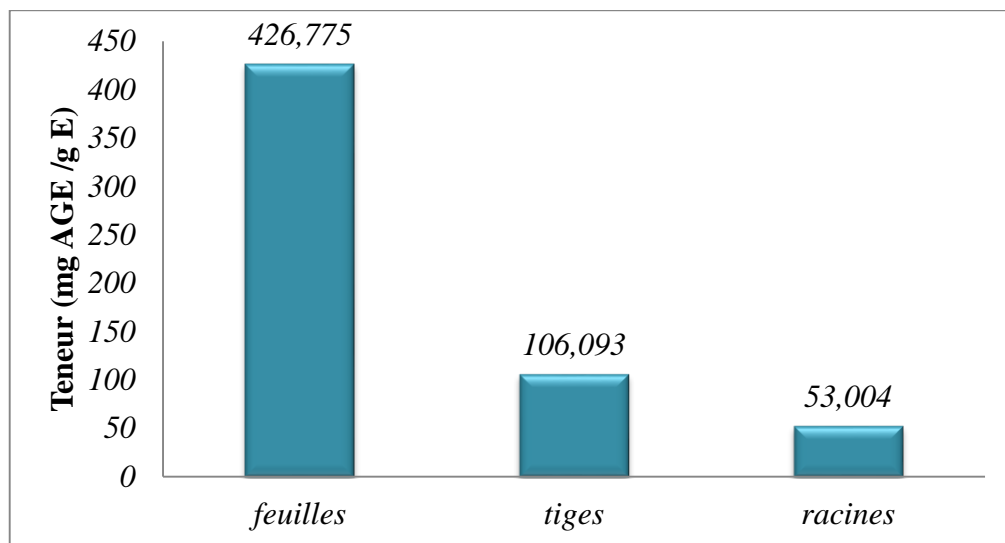


Figure 20 : teneur en composés phénoliques dans les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.

La quantité de polyphénols est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg AGE/ g E).

La **figure 20** montre que la teneur la plus élevée en composés phénoliques revient aux feuilles avec une valeur de 426,775mg AGE/g E. Cependant, la teneur la plus faible est notée pour les racines avec une valeur de 53,004mg AGE/ g E.

3.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des trois extraits est déterminée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium.

L'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine est :

$$Y = 0.0123x + 0.0086, R^2 = 0.9946 \longleftrightarrow C_{ft} = (y - 0.0086) / 0.0123 \mu\text{g/ml}$$

Y : absorbance mesurée par le spectrophotomètre

X : concentration de la solution de la quercétine ($\mu\text{g/ml}$)

C_{ft} : concentration des flavonoïdes totaux recherchés dans la solution analysée des extraits des feuilles, tiges et racines.

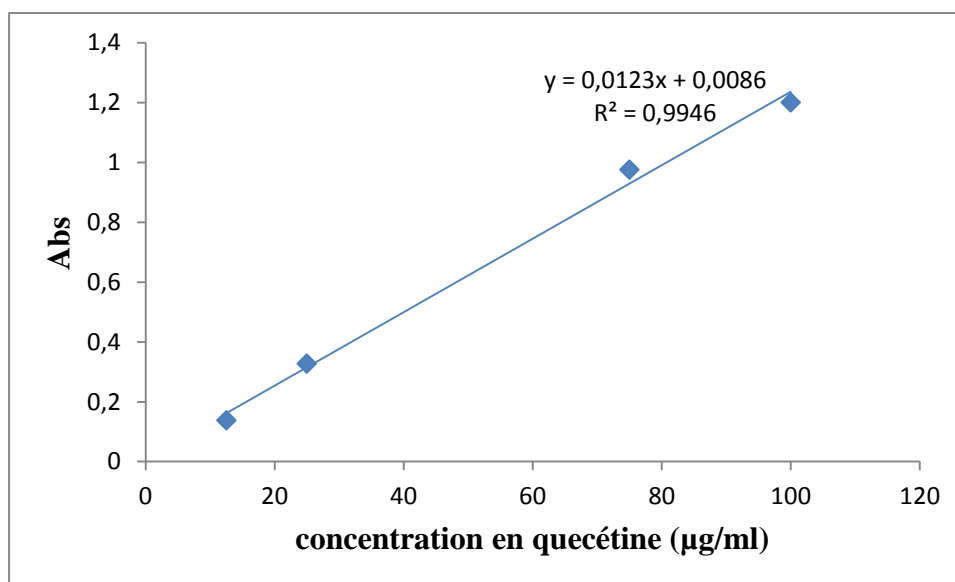


Figure 21 : Courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.

La teneur en flavonoïdes des extraits, est représentée dans la figure suivante :

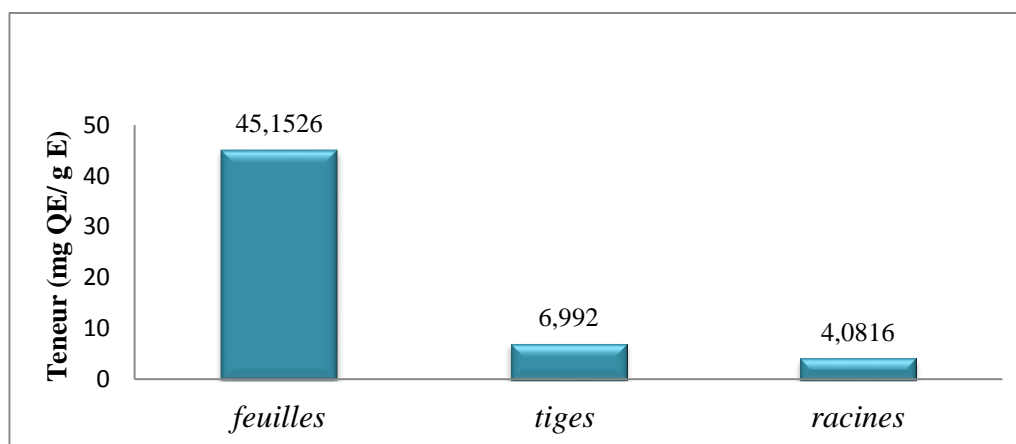


Figure 22 : teneur en flavonoïdes dans les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.

La quantité des flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg QE/ g E).

L'extrait des feuilles est celui qui révèle la plus haute teneur en flavonoïdes avec une valeur de 45,1526 mg QE/ g E, s'ensuit l'extrait des tiges avec une teneur de 6,992 mg QE / g E. La plus faible teneur a été révélée pour l'extrait des racines avec une valeur de 4,0816 mg QE / g E.

4 Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques

4.1 Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible des extraits polyphénoliques du *Bupleurum fruticosum* sont obtenus en effectuant un balayage de 190nm à 900nm. Les spectres obtenus sont représentés dans les **figures 23, 24 et 25**.

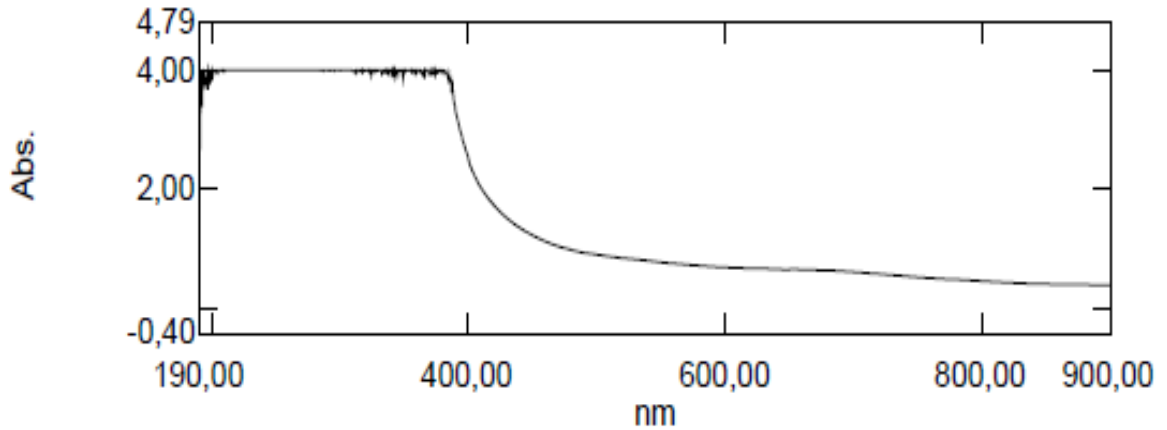


Figure 23 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des feuilles.

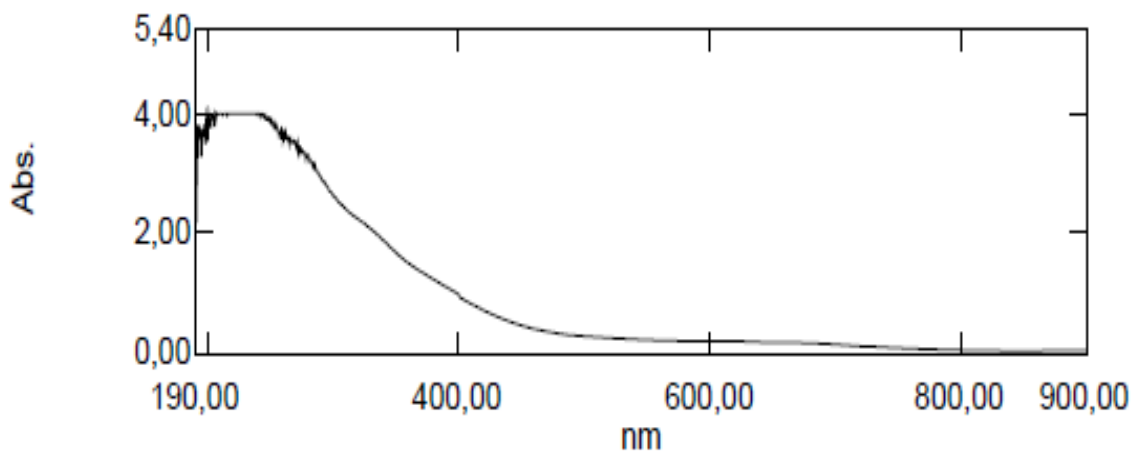


Figure 24 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des tiges.

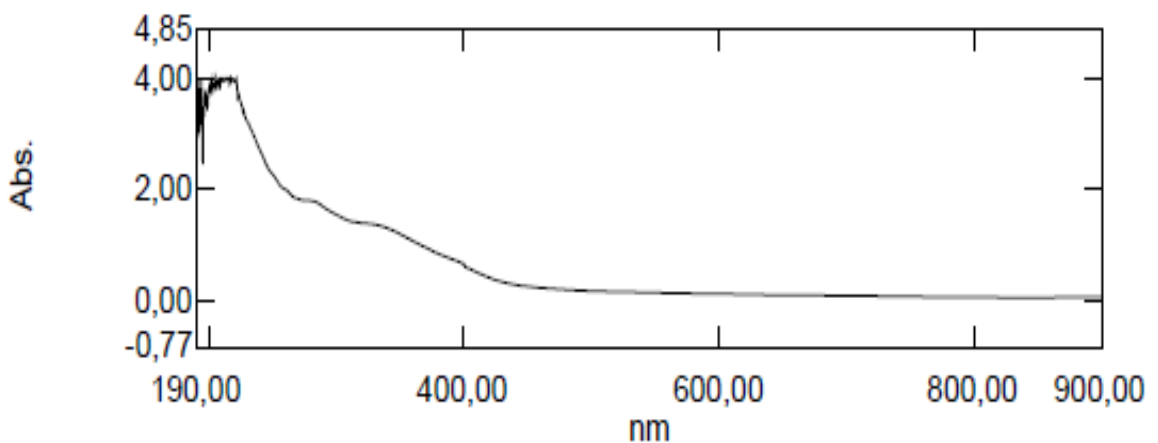


Figure 25 : spectre UV-Visible de l'extrait polyphénolique des racines.

Les spectres représentés dans les figures 23, 24 et 25 montrent que les trois extraits polyphénoliques absorbent principalement dans le domaine Ultraviolet.

Ils permettent de déduire que l'emploi récurrent de cette plante serait le fait de la manifestation de sa richesse relative en constituants polyphénoliques qui sont d'excellents boucliers pour la peau contre les rayonnements UV.

Ces extraits polyphénoliques peuvent être utilisés dans les préparations de produits de soin pour la protection contre les rayons UV, et les crèmes anti-âge vu leur capacité à protéger la peau contre les agressions des espèces oxydantes.

4.2 Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrophotométrie Ultraviolet

Les figures présentées montrent les chromatogrammes des mélanges d'étalons (acide gallique, acide caféïque, acide coumarique, acide cinnamique) utilisés et des trois extraits végétaux de concentration de 0.2mg/ml.

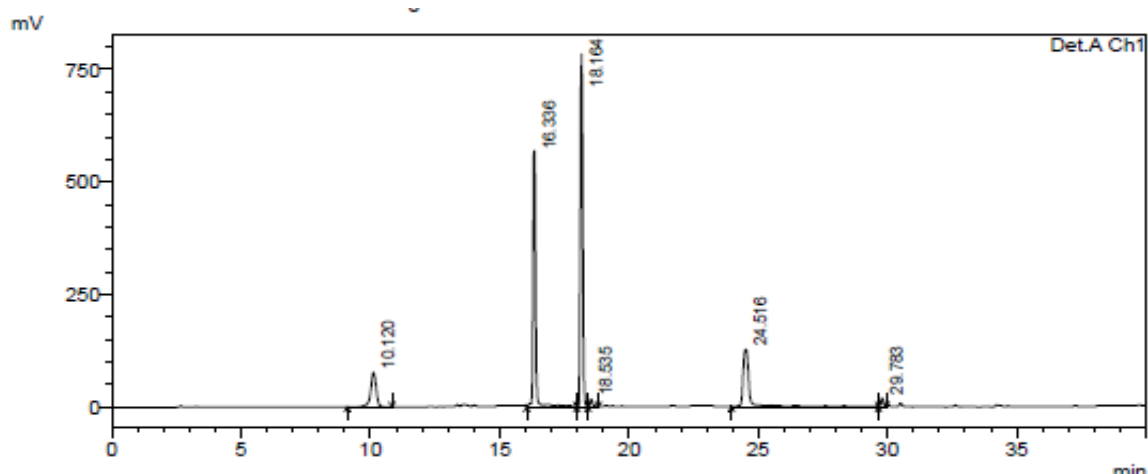


Figure 26 : chromatogramme HPLC des standards à 280nm.

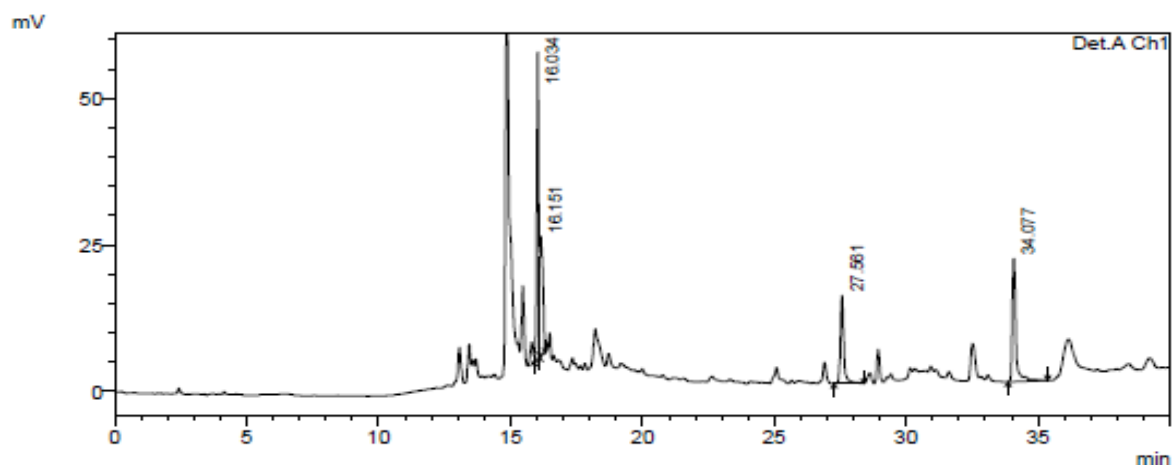


Figure 27 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des feuilles à 280nm.

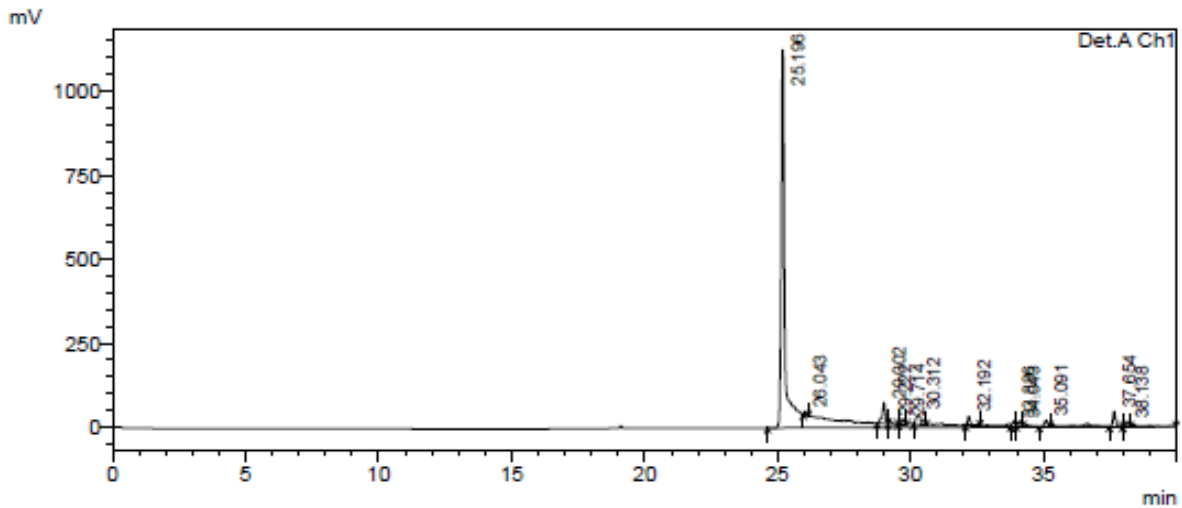


Figure 28 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des tiges à 280nm.

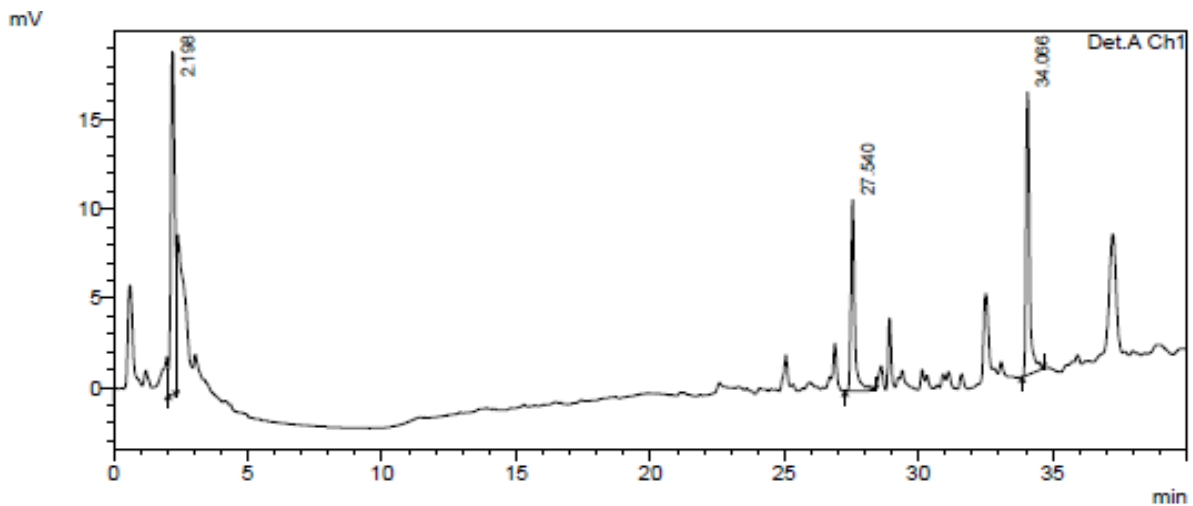


Figure 29 : chromatogramme HPLC de l'extrait polyphénolique des racines à 280nm.

D'après les chromatogrammes HPLC obtenus on constate que :

- L'extrait polyphénolique des racines présente un pic à un temps de rétention égal à 2.198min. les trois extraits polyphénoliques présentent des pics à partir d'un temps de rétention de 27.56min. Ces pics correspondent à des substances non identifiées en raison du manque d'étalons adéquats.
- L'extrait polyphénolique des feuilles possède deux pics à 16.034min et à 18.151min correspondant à la présence d'un acide caféique et acide coumarique respectivement.
- Les deux extraits polyphénoliques des tiges et des racines ne possèdent aucun pic correspondant aux étalons de référence.

5 Mesure de l'activité antioxydante

5.1 Test de la réduction du fer (FRAP)

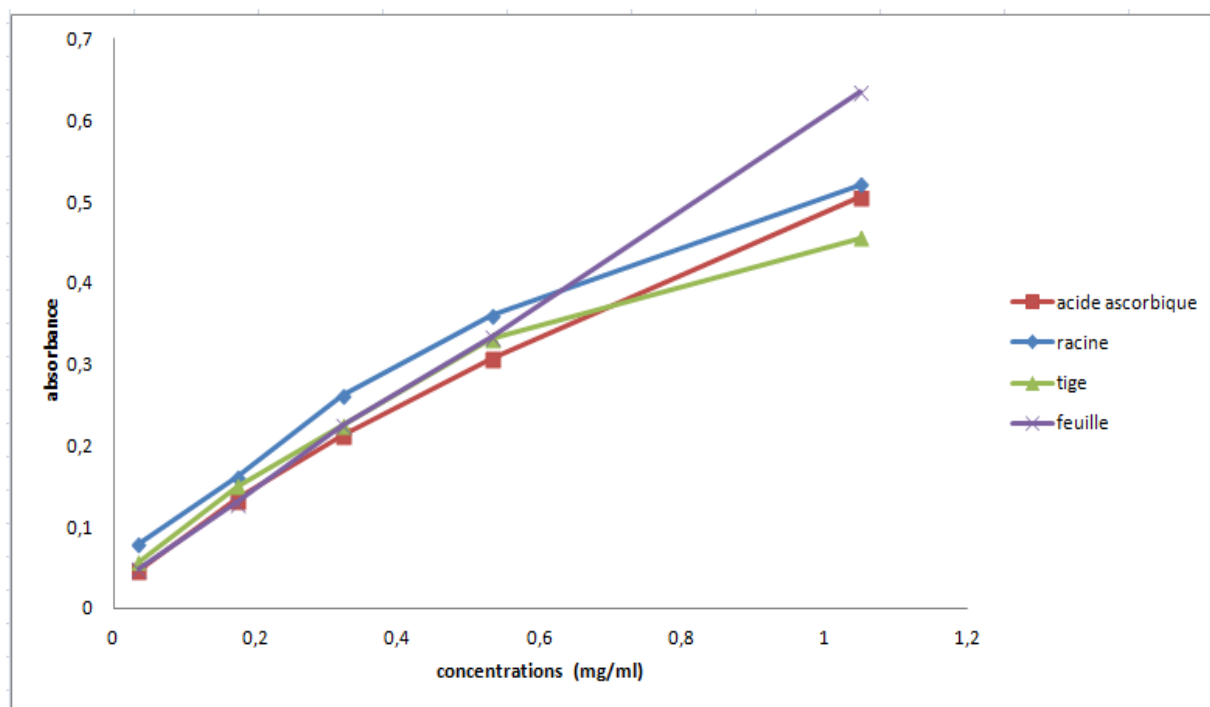


Figure 30 : pouvoir réducteur des extraits des feuilles, tiges et racines et de l'acide ascorbique.

D'après la **figure 30** : les absorbances des extraits polyphénoliques augmentent avec la concentration, on déduit donc que le pouvoir réducteur de ces derniers est à concentration dépendant.

L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur, cela peut s'expliquer par une concentration importante en composés polyphénoliques présents dans les extraits analysés. C'est le cas de l'extrait des feuilles qui présente une capacité réductrice du fer plus importante que celle de l'acide ascorbique.

Les valeurs d'absorbance des extraits des racines sont assez proches de celles de l'acide ascorbique ce qui se traduit par une capacité réductrice équivalente. La même chose peut être déduite pour l'extrait des tiges (**voir annexe 4, figure 10**).

5.2 Effet scavenger du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits polyphénoliques du *Bupleurum fruticosum* et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée avec un spectrophotomètre UV-Visible en suivant le changement de couleur du DPPH° (violette) à DPPH-H (jaune).

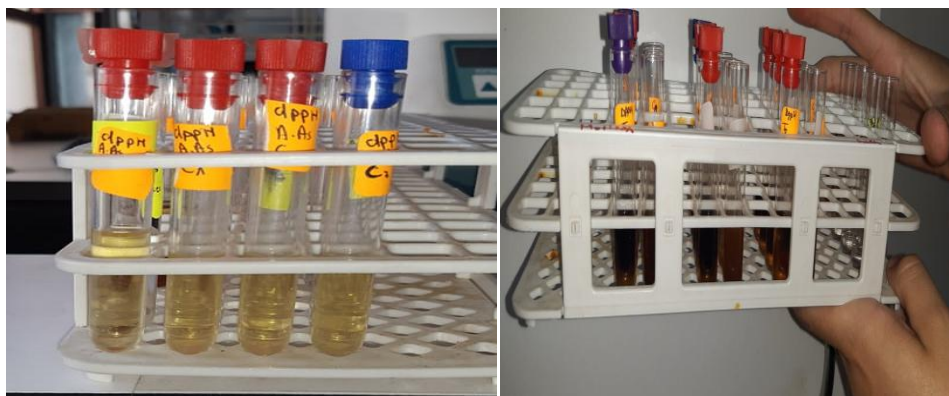


Figure 31 : test de Piégeage du radical libre DPPH sur les extraits polyphenoliques du *Bupleurum fruticosum*.

Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires.

Les concentrations C1, C2, C3 et C4 mentionnées dans le **tableau 5** sont respectivement égales à (0.125, 0.25, 0.5, 1) mg/ml.

Tableau 5: pourcentage d'inhibition des extraits polyphénoliques.

<i>Organe végétal</i>	<i>Feuille</i>	<i>Tige</i>	<i>racine</i>	<i>Acide ascorbique</i>
<i>% d'inhibition</i>				
C1	18.03%	2.52%	7.04%	23.45%
C2	48.46%	21.42%	25.11%	40.90%
C3	60.92%	51.09%	47.16%	61.81%
C4	71.12%	70.58%	63.6%	80.90%

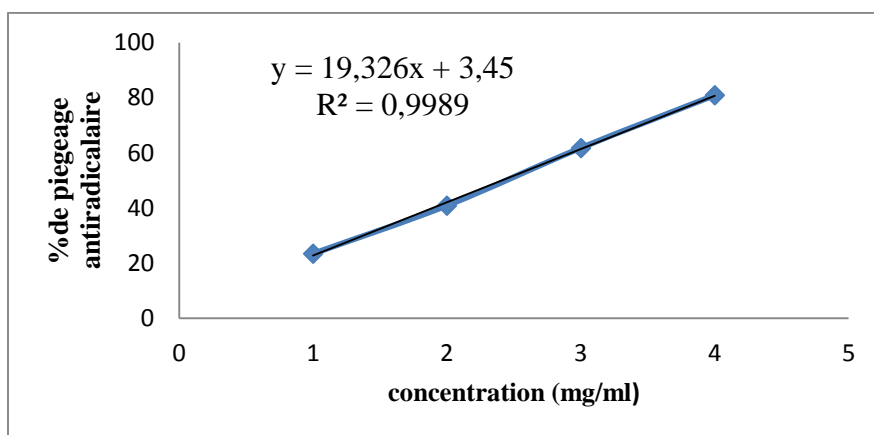


Figure 32 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

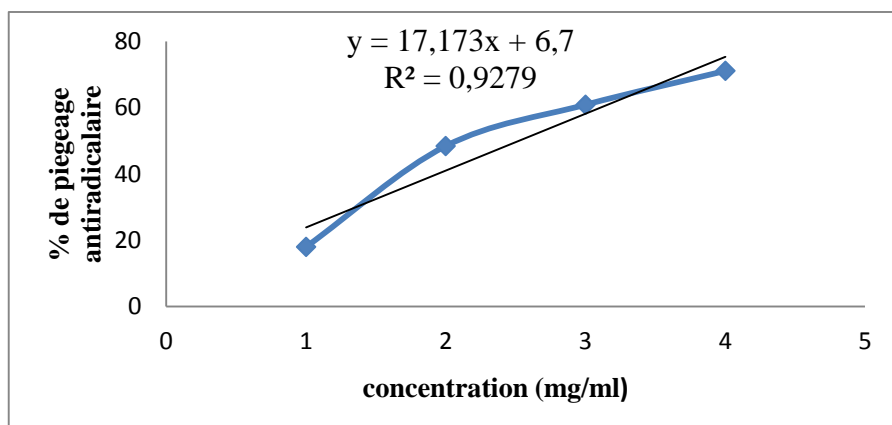


Figure 33 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique des feuilles.

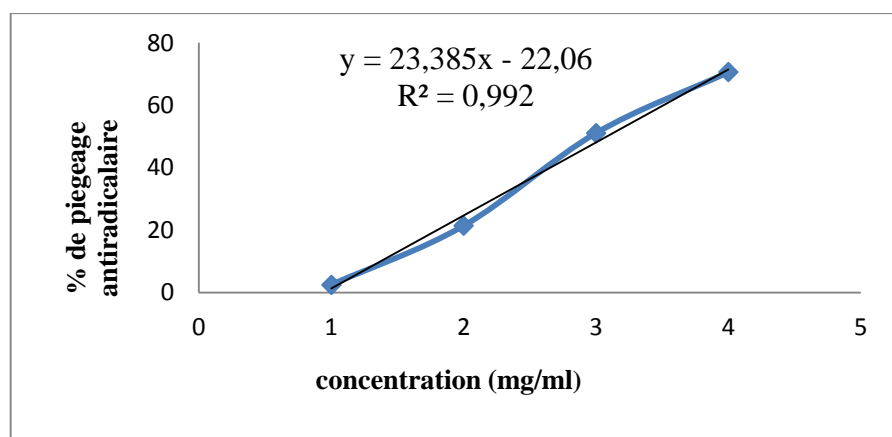


Figure 34 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique des tiges.

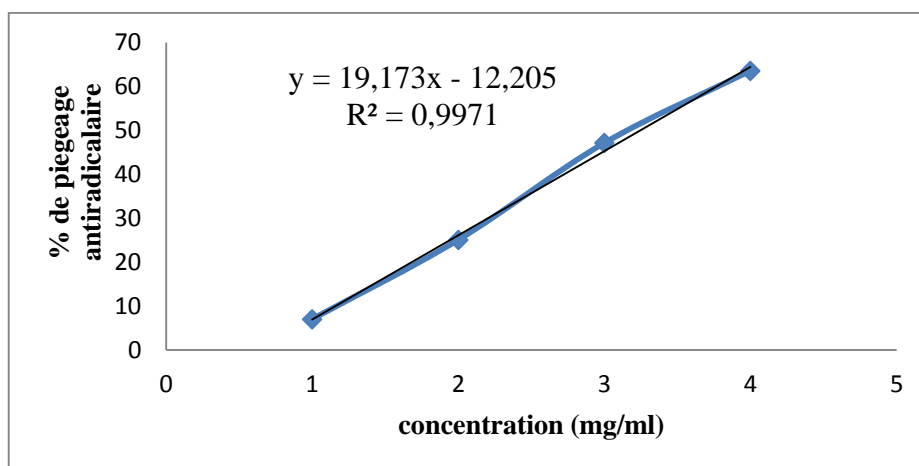


Figure 35 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations de l'extrait polyphénolique des racines.

L'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé car elle exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de IC₅₀ est petite plus l'activité antioxydante du composé est grande. [47]

Les valeurs d'IC₅₀ des extraits polyphénoliques des feuilles, tiges, racines et de l'acide ascorbique sont représentées dans la figure suivante :

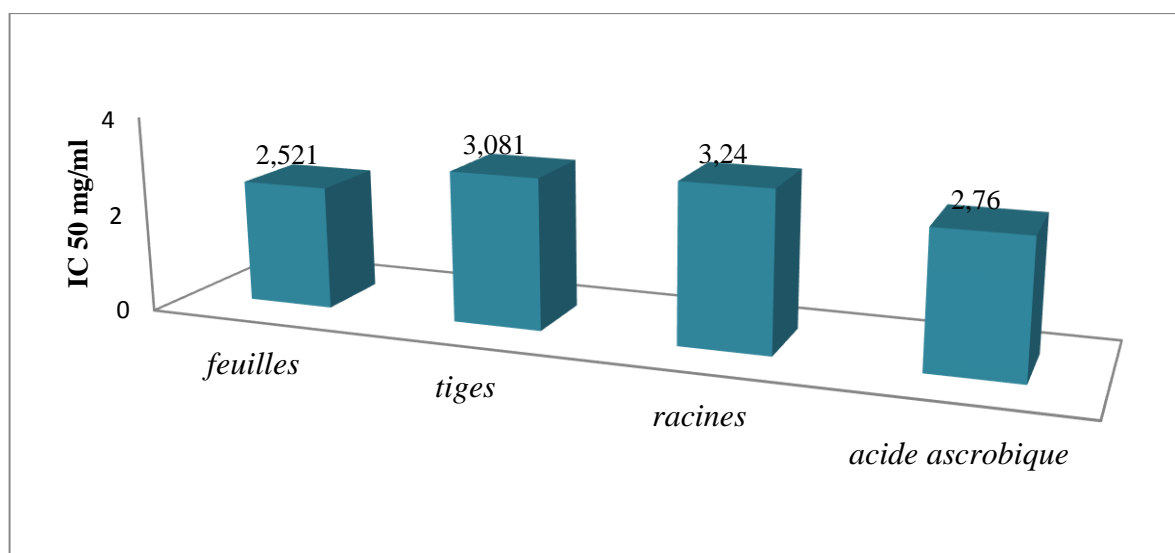


Figure 36 : valeur d'IC 50 des extraits polyphénoliques des trois organes végétaux et de l'acide ascorbique.

L'extrait polyphénolique des feuilles présente un effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH avec une IC50 de 2.521mg/ml en comparaison avec l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence d'antioxydant.

On remarque que les valeurs de l'IC50 des extraits polyphénoliques des tiges et des racines sont plus ou moins proches de celle du composé de référence. L'extrait polyphénolique des tiges (IC50=3,081mg/ml) vient en seconde position et celui des racines en 3^{ème} position (IC50=3,24mg/ml).

6 Détermination des activités biologiques

6.1 Activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien des extraits a été estimé en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des bactéries suivantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*.

Les résultats des tests antibactériens des extraits polyphénoliques sont représentés sur la figure 37.

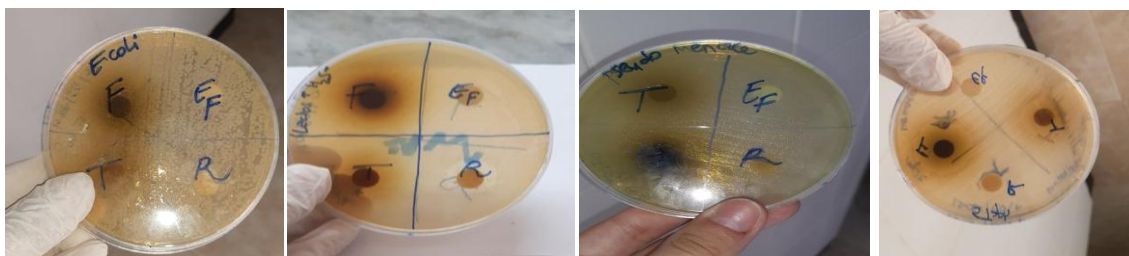


Figure 37 : aromagrammes des activités antibactériennes des trois extraits polyphénoliques.

Les diamètres des zones inhibitrices autour des disques sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 6 : effet antibactérien des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Extraits	Diamètres d'inhibition	Conclusion
Feuilles	19mm	Très sensible
Tiges	9mm	Sensible
Racines	9mm	Sensible

Tableau 7 : effet antibactérien des extraits sur *Salmonella typhimurium*.

<i>Extraits</i>	<i>Diamètres d'inhibition</i>	<i>Conclusion</i>
Feuilles	21mm	Extrêmement sensible
Tiges	17mm	Très sensible
Racines	19mm	Très sensible

Tableau 8 : effet antibactérien des extraits sur *Staphylococcus aureus*.

<i>Extraits</i>	<i>Diamètres d'inhibition</i>	<i>Conclusion</i>
Feuilles	26mm	Extrêmement sensible
Tiges	15mm	Très sensible
Racines	19mm	Très sensible

D'après ces résultats obtenus, on peut déduire les remarques suivantes :

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Les extraits des feuilles, tiges et racines ne présentent aucune activité inhibitrice contre la bactérie *Escherichia coli*.

L'extrait des feuilles présente une activité inhibitrice plus importante par rapport aux deux autres extraits (tiges et racines) que ce soit envers la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ou bien *Staphylococcus aureus*.

En vue de ces résultats, on peut déduire que les extraits polyphénoliques de la plante *Bupleurum fruticosum* ont un pouvoir antibactérien contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*.

6.2 Tests antifongiques

L'activité antifongique des extraits polyphénoliques des trois organes végétaux a été estimée en termes de diamètre d'inhibition autour des disques contenant les extraits testés vis-à-vis des deux champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*).

L'eau physiologique utilisée comme témoin positif, diffuse en indiquant un diamètre de 1.4mm.

Le potentiel antifongique de ces extraits à été jugé absent vis-à-vis de ces souches fongiques testées. La **figure 38** défend le résultat conclu.

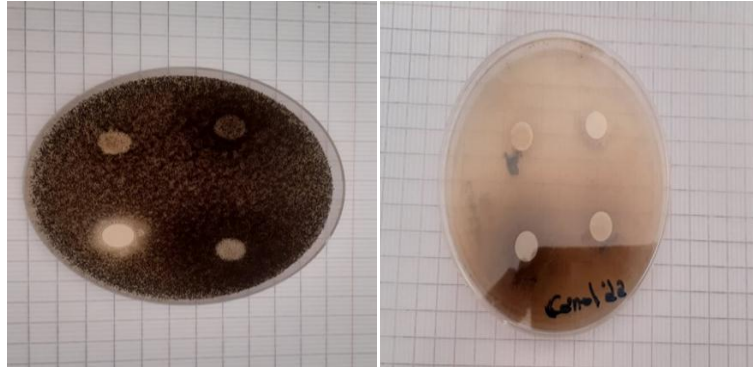


Figure 38 : aromagrammes des activités antifongiques des trois extraits polyphénoliques.

Conclusion

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Le travail présenté constitue une contribution à la connaissance phytochimique et biologique du genre *Bupleurum fruticosum* de la famille des Apiaceae, qui a des propriétés pharmacologiques utilisées en médecine traditionnelle, en raison de la présence des métabolites secondaires bioactifs tels que : les polyphénols et les flavonoïdes.

Une recherche bibliographique approfondie sur l'espèce *Bupleurum fruticosum* a révélé sa richesse en métabolites secondaires tel que les triterpènes, les lignanes, ainsi qu'un grand nombre de coumarines, de flavonoïdes, terpénoïdes et les huiles essentielles.

D'après les résultats obtenus, nous avons conclu que le *Bupleurum fruticosum* est riche en tanins, flavonoïdes et contient également des saponines, des terpénoïdes et des stéroïdes.

Le rendement d'extraction des trois organes du *Bupleurum fruticosum* montre que les feuilles sont plus riches en polyphénols avec un pourcentage de 29.16%.

Les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines du *Bupleurum fruticosum* possèdent une activité antioxydante. Ils montrent une inhibition vis-à-vis du radical DPPH et manifestent un pouvoir réducteur assez important. De plus, ils sont de bons agents antibactériens contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*.

D'un autre côté, l'analyse par UV-Visible et HPLC a mis en évidence la présence de divers composés polyphénoliques dans nos extraits.

L'évaluation de la composition chimique des différents extraits ayant recours à l'IR, la CL-SM ou à la RMN aurait pu nous fournir des données supplémentaires sur la nature des composés actifs présents dans les différents extraits étudiés.

La majorité des travaux effectués sur le *Bupleurum fruticosum* se limitent sur les huiles essentielles, et très peu de travaux sur les activités biologiques et l'activité antioxydante des extraits ont été rapportés dans la littérature, c'est pour cette raison que ce travail devrait ouvrir des horizons de recherches ciblées dans l'étude des extraits de cette plante et mettre en évidence ses principes actifs et évaluer ses activités biologiques.

Annexes

Annexe 1

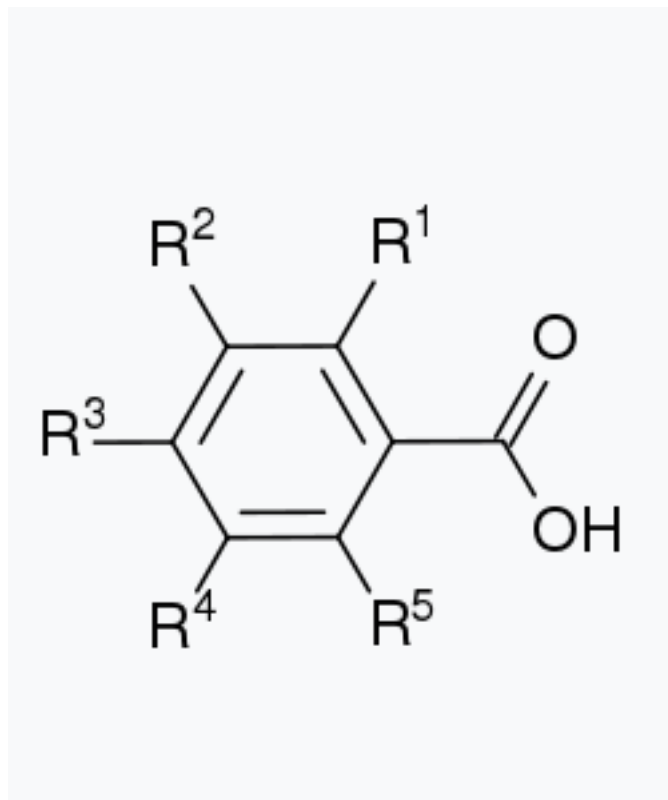


Figure 1 : structure de base d'un hydroxybenzoïque

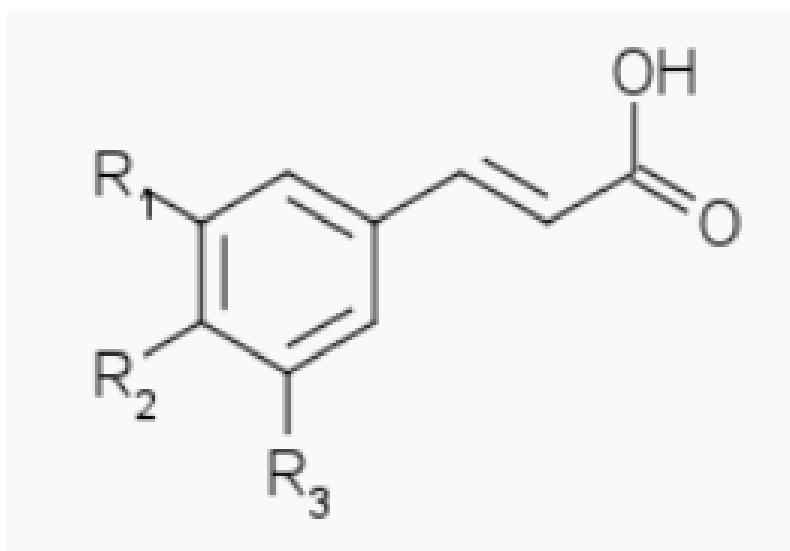


Figure 2 : structure de base d'un hydroxycinnamique

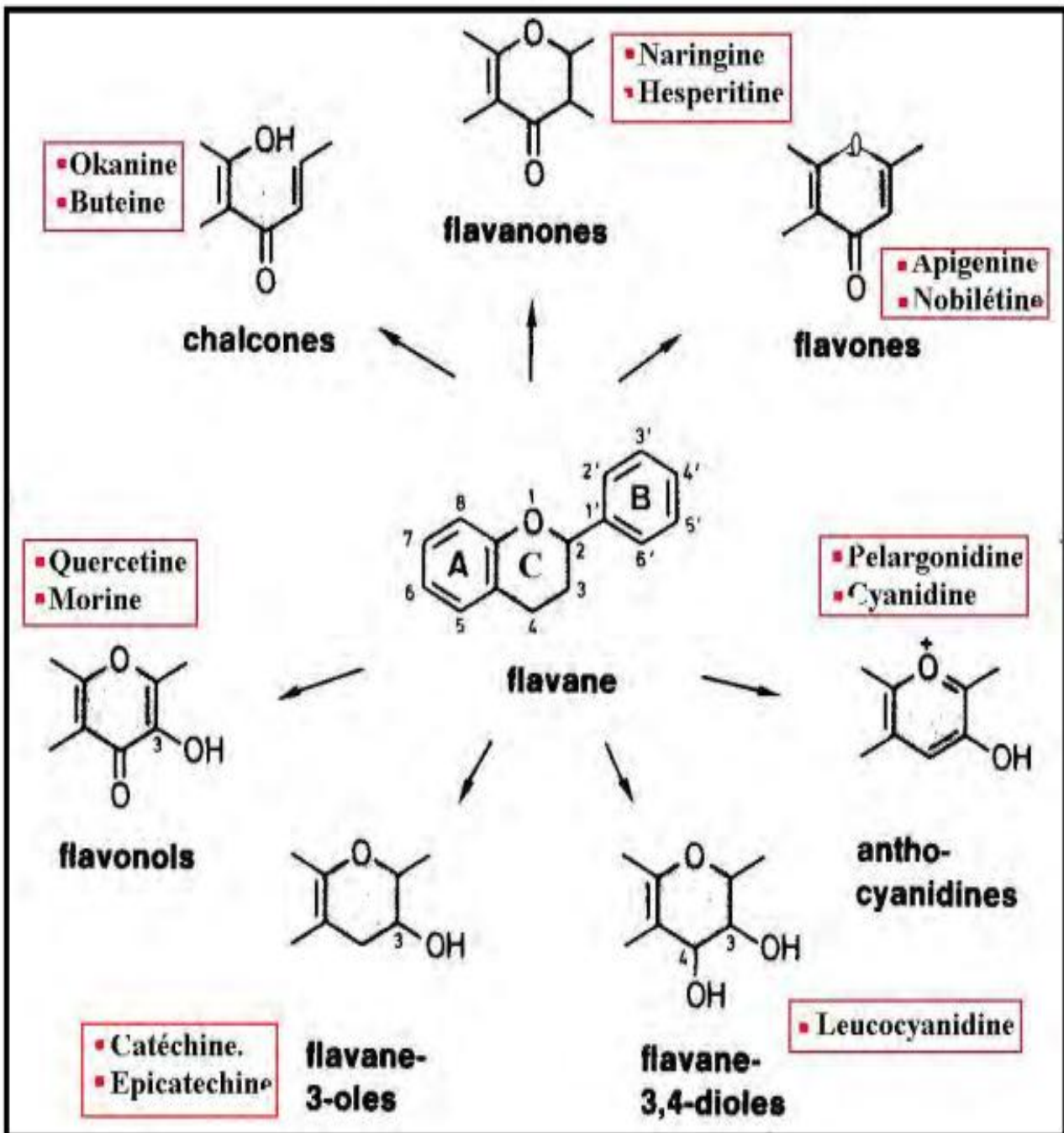


Figure 3 : différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.

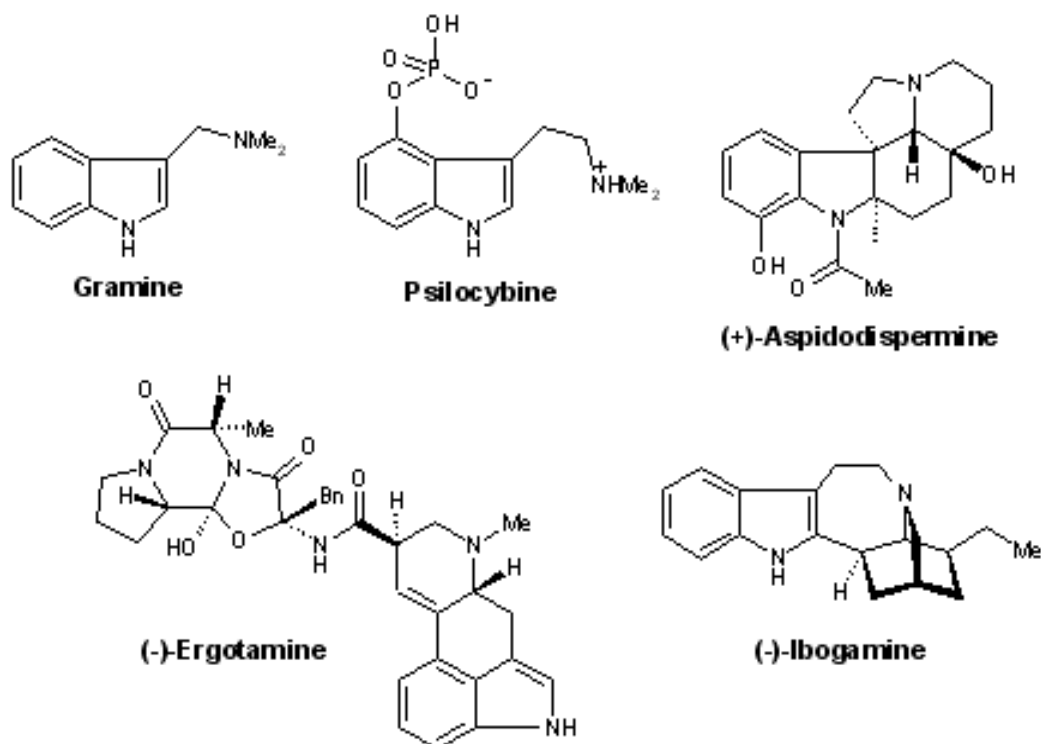


Figure 4 : quelques exemples d'alcaloïdes.

Tableau 1 : classes des polyphénols.

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C6
acide hydroxybenzoïque	C6-C1
acétophénones, acide phénylacétique	C6-C2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones)	C6-C3
flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6-C3-C6
lignanes, néolignanes	(C6-C3)*2
biflavonoïdes	(C6-C3-C6)*2
tannins condensés (proanthocyanidines, ou flavolans)	C6-C3-C6)*n

Annexe 2

Réactifs de caractérisation

- **Réactif de Mayer**

Chlorure de mercure ...1.36g

Iodure de potassium...5g

Eau distillée ...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 d'eau.

- **Réactif d'amidon**

Dissoudre 1.2g d'iode (I_2) dans 50ml d'eau distillée contenant 2.5g d'iode de potassium (KI) ensuite chauffer le mélange pendant 5minutes.

Ajuster le volume jusqu'à 500ml d'eau.

- **Réactif de Wagner**

Dissoudre 2g d'iodure de potassium dans environs 50ml d'eau distillée.

Dissoudre 1.27g d'iode (I) dans l'eau distillée.

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

- **Réactif de Folin-Ciocalteu**

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante :

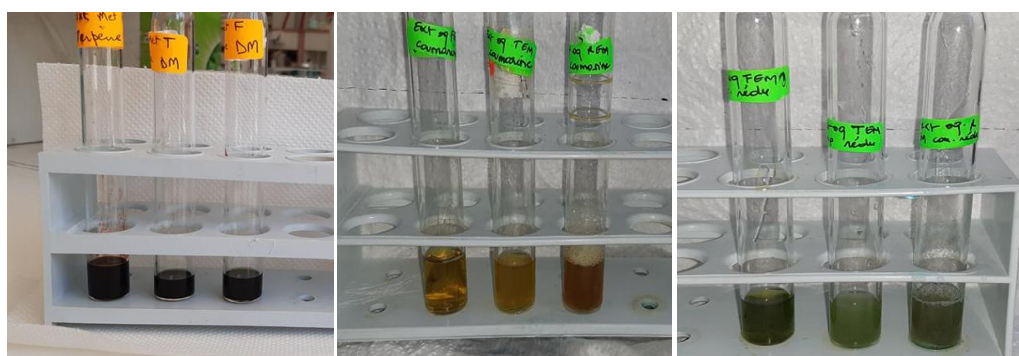
- 100g tungstate de sodium et 25g de molybdate de sodium sont dissous dans 700ml d'eau distillée.
- Ajouter 50ml d'acide phosphorique à 85% 100ml d'acide chlorhydrique concentré.
- Porter à l'ébullition sous reflux durant 10 heures.
- Ajouter ensuite 150g de sulfate de lithium, quelques gouttes de brome et porter à nouveau à l'ébullition durant 15min.
- Refroidir et compléter à 1litre avec l'eau distillée.



Saponines

tanins

polyphénols



Terpènes

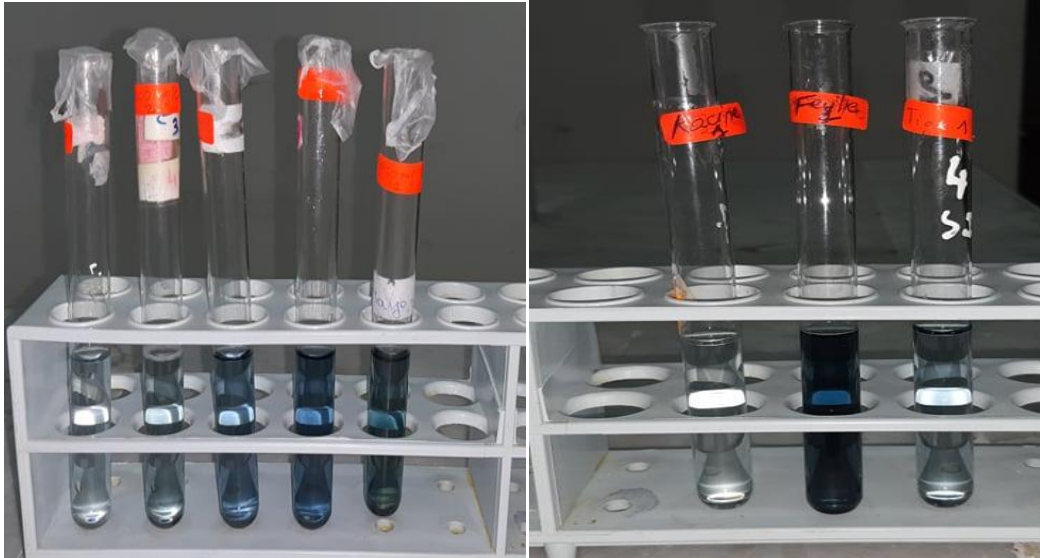
coumarines

composés réducteurs

Figure 5 : résultats des tests phytochimiques positifs.

Annexe 03

Analyse quantitative par dosage colorimétrique.



Acide gallique

extraits polyphénoliques

Figure 6 : détermination de la teneur en phénol totaux.



Quercétine

extraits polyphénoliques

Figure 7 : détermination de la teneur en flavonoïdes.

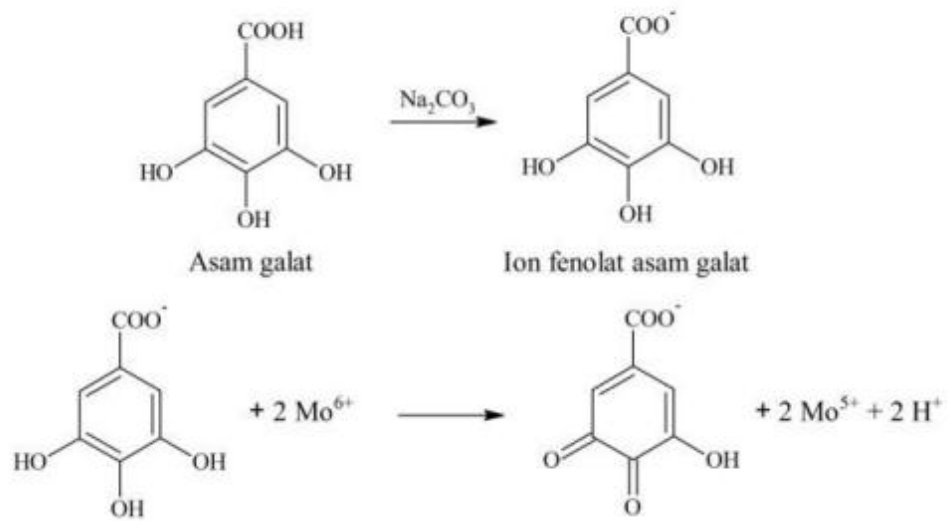


Figure 8 : réaction entre l'acide gallique et les composés de molybdènes dans le réactif Folin-Ciocalteu.

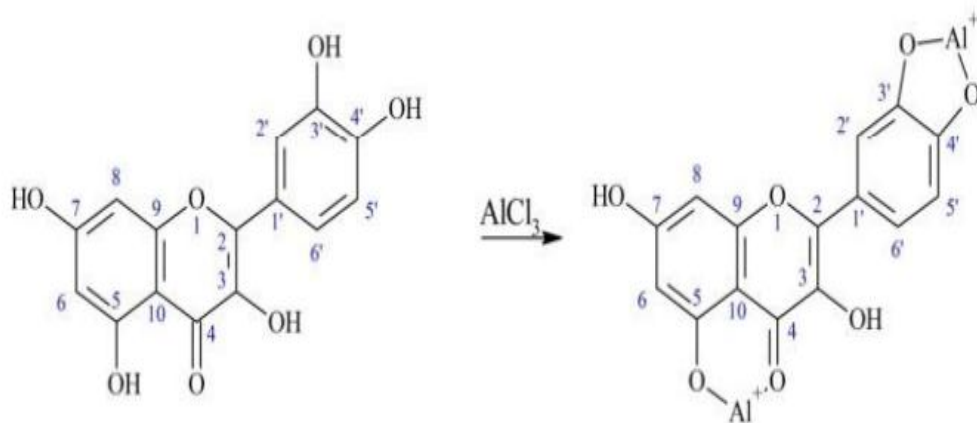


Figure 9 : formation d'un complexe quercétine- AlCl_3

Annexe 04

Solutions à préparer pour le test du pouvoir réducteur FRAP

- ✓ **FeCl₃ à 0.1%** : peser 0.1 g de FeCl₃ et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- ✓ **Ferricyanure de potassium à 1%** : peser 1g de Ferricyanure de potassium et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- ✓ **TCA à 10%** : peser 10 g de TCA et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
- ✓ **Tampon phosphate** : pour préparer une solution tampon phosphate pH=6.6, on introduit 250ml de solution de phosphate monopotassique 0.2M dans une fiole jaugée de 1000ml, ajouter un volume de 222.5ml de NaOH puis compléter jusqu'à 1000ml avec de l'eau distillée.



Figure 10 : mesure de l'activité antioxydante des extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines.

Annexe 05

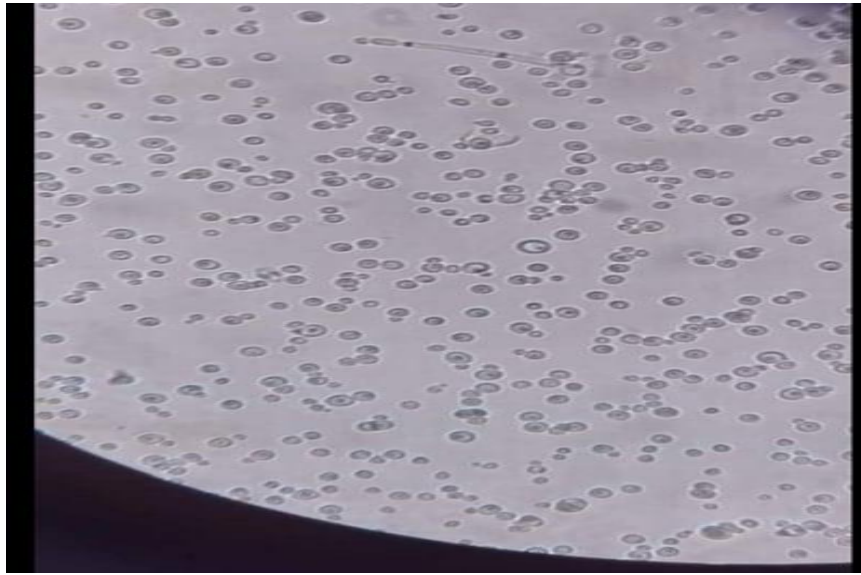


Figure 11 : *Candida albicans* sous microscope optique.

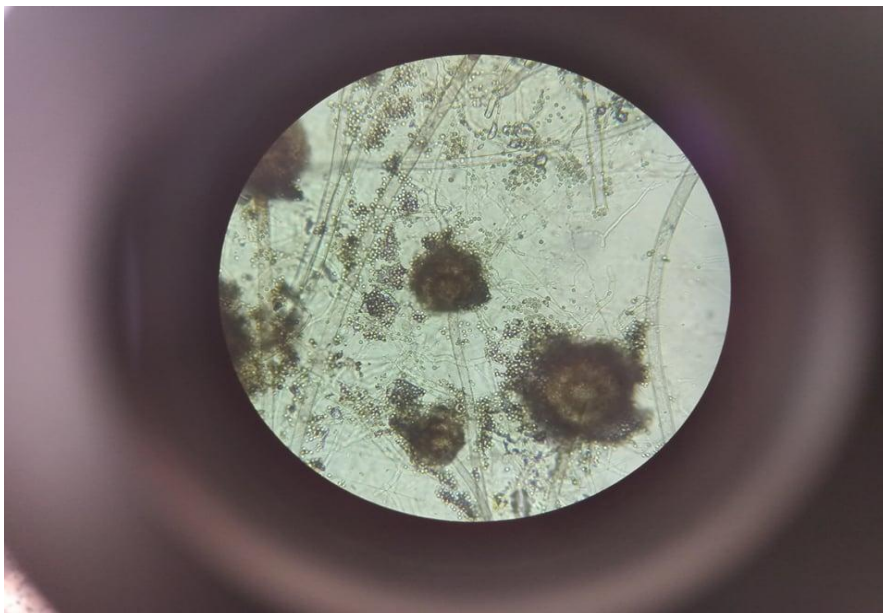


Figure 12 : *Aspergillus niger* sous microscope optique.

*Références
bibliographiques*

-
- [1] Y. KEITA, O. KONE, A. K. LY, and V. HÄKKINEN, “Étude chimique et de l’activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 7, no. 10–11, pp. 1095–1100, 2004.
- [2] M. L. ASHOUR and M. WINK, “Genus Bupleurum: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action,” 2010.
- [3] K. LIU, “La RMN du carbone-13, outil d’analyse d’étude phytochimique de *clinopodium ascendens*, *Bupleurum Fruticosum* et *Santolina Corsica*,” thèse de doctorat. Université de Corse. 2008.
- [4] M. OULD EL HADJ, H. DIDI, HADJ-MAHAMMED and ZABEIROU, “Place Des Plantes Spontanees Dans La Medicine Traditionnelle De La Region De Ouargla (Sahara Septentrional Est),” *Courr. Du Savoir*, vol. 3, pp. 47-51, 2003.
- [5] C. KELLER-DIDIER, “LES PLANTES MEDICINALES,” pp. 57-64, 2004.
- [6] “La phytothérapie: comment se soigner avec les plantes?” <https://www.passeportsante.net/portail/phytotherapie> (accessed August, 2nd, 2021).
- [7] “Extraction végétale - Berkem - Extraction végétale.” <https://www.berkem.com/fr/expertise/extraction-vegetale?fbclid=IwAR1-IrrOYk0Rq1tAcZrgkqffNZcKrU5BW1OxTT5hHxy6Z0z0wchqzj9sYuw> (accessed August, 2nd, 2021).
- [8] A. ZAÏTER, “Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines,” thèse de doctorat. Université de Lorraine. 2019.
- [9] F. KAHLOUCHE RIACHI, “Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d’Algérie,” Thèse de doctorat. Université de Constantine 1. 2014.
- [10] RAVEN, EVERT, EICHHORN, “Biologie végétale,” 2nd ed. *deboecksuperieur.a.Bruxelles*. 978-2-8041-5020-4. 2007.
- [11] J. BRUNETON, “Phytochimie, Plantes médicinales,” 4th ed. *Tec & Doc Lavoisier*. 2009.
- [12] R. Tsao, “Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols,” *Nutrients*, vol. 2, pp. 1231–1246, 2010.
- [13] A. MADI, “Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques,” thèse de Magister. Université Mentouri Constantine. 2009.
- [14] F. N. MUANDA, “Identification de polyphénols, Evaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques,” thèse de doctorat. Université de Metz. 2010.
- [15] N. SANDU, C. G. CHILOM, and A. I. POPESCU, “Structural and molecular aspects of flavonoids as ligands for serum transferrin,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol.*

- Biomol. Spectrosc.*, vol. 254, p. 119600, 2021.
- [16] Encyclopédie des plantes médicinales. 2nd Ed. *Larousse*. 2-03-560252-1. 2001.
- [17] V. CAPRARULO, C. GIROMINI, and L. ROSSI, “Review: Chestnut and quebracho tannins in pig nutrition: the effects on performance and intestinal health,” *Animal*, vol. 15, no. 1. 2021.
- [18] I. PODOLAK, A. GALANTY, and D. SOBOLEWSKA, “Review: Saponins as cytotoxic agents,” *Phytochem. Rev.*, vol. 9, no. 3, pp. 425–474, 2010.
- [19] A. SALIFOU, C. ALIDOU, F. TCHOBO, and M. SOUMANOU, “Connaissances endogènes et importance des courges (*Cucurbitacées*) pour les populations autochtones productrices des graines au Bénin,” *J. Appl. Biosci.*, vol. 92, no. 1. 2015.
- [20] L. BREMNESS, “Plantes aromatiques et médicinales,” Ed. *Larousse*. 2-03-560405-2.
- [21] D. A. NAGEGOWDA and P. GUPTA, “Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids,” *Plant Sci.*, vol. 294. 2020.
- [22] M. BENCHOUAK, “Etude de l’effet des flavonoïdes de la *Foeniculum vulgare* Mill. dans la prévention de la cardiotoxicité de la doxorubicine,” thèse de Magister. Université de Jijel. 2008.
- [23] M. BOUCHEKRIT, “Etude de la composition chimique et de l’activité biologique des huiles essentielles de deux Apiaceae *Elaeoselinum asclepium* (L.) Bertol. et *Margotia gummifera* (Desf.) Lange,” thèse de doctorat. Université de Ferhat Abbes Sétif. 2018.
- [24] F. BELKHIRI, “Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tamus communis* L. et *Carthamus caeruleus* L.,” Thèse de Magister. Université de Ferhat Abbes Sétif. 2009.
- [25] L. DJARRI, “Contribution à l’étude des huiles essentielles et métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille des Apiaceae ***Daucus rebouddi*** Coss. ex Batt. & Trab., ***Kundmannia sicula*** (L.) DC., et ***Elaeoselinum thapsioides*** Maire.” thèse de doctorat. Université de Mentouri de Constantine. 2011.
- [26] M. LEFAHAL, “Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles Plumbagina,” thèse de doctorat. Université de Constantine 1. 2014.
- [27] K. BROWICZ, “*Bupleurum fruticosum* L. and *Lonicera implexa* Ait. in the Eastern Mediterranean,” *Arboretum kórnickie*. 1982.
- [28] “Flore du Maroc, famille des Apiaceae, *Bupleurum fruticosum*.” <http://www.floramarocana.fr/bupleurum-fruticosum.html> (accessed Mai. 16th, 2021).
- [29] “*Bupleurum fruticosum*.” <https://www.pepiniere-vegetal85.fr/Arbustes/1274-BUPLEURUM-fruticosum.html> (accessed Mai. 17th, 2021).
- [30] “The Euro+Med Plantbase Project.” <http://ww2.bgbm.org/europlusmed/ptaxondetail.asp?nameid=109084&ptreffk=750000>

- 0 (accessed Mai. 20, 2021).
- [31] D. Li, D. Yue, D. Liu, X. Liu, and S. Song, "Chemical constituents from Bupleurum chinese and their chemotaxonomic significance," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 86. 2019.
- [32] A.-M. Cauwet-Marc and J. CARBONNIER, "Quelques indications sur l'utilisation des espèces rattachées au genre Bupleurum L. (Ombelliferae)," *J. d'agriculture Tradit. Bot. appliquée*, vol. 25, no. 1, pp. 51–59, 1978.
- [33] I. MEGNOUNIF, "Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydante d'Urtica Dioica (l'Ortie)," thèse de Magister. Université Aboubekr Blekaid de Tlemcen. 2011.
- [34] Assia BERRANI, L. Aicha LRHORFI, F. Z. DAHMANI, H. FKHIR, R. BENGUEDDOUR, "Criblage Phytochimique De Deux Plantes Médicinales: Vitex Agnus Castus Et Anabasis Aretioïdes", vol.7, ISSN 2111-4706. 2019.
- [35] N. E.H DAIRA, M. C. MAAZI, and A. CHEFROUR, "Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (Ammoides verticillata Desf. Briq.) de l'Est Algérien," *Bull. la Société R. des Sci. Liège*, vol. 85, pp. 276–290, 2016.
- [36] S. MAHMOUDI, M. KHALI, N. MAHMOUDI, "Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.),", *Nat. Technol.*, pp. 35–40, 2013.
- [37] J. CHABRIER, "Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie," thèse de doctorat. Université de Henri Poincaré- Nancy 1. 2010.
- [38] M. M. DIF, H. BENCHIHA, Z. MEHDADI, F. BENALI-TOUMI, M. BENYAHIA, and K. BOUTERFRAS, "Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce Papaver rhoeas L.," *Phytotherapie*, vol. 13, no. 5, pp. 314–319, 2015.
- [39] F. POURMOURAD, S. J. HOSSEINIMEHR, and N. SHAHABIMAJD, "Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants," *African J. Biotechnol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1142–1145, 2006.
- [40] N. BOUGANDOURA and N. BENDIMERAD, "Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq." *Nature et technologie*, pp. 14–19, 2012.
- [41] G. AUDE, "Développement de méthodes d'analyses permettant le screening de molécules pharmaceutiques à l'aide du Sirius T3 ®- Détermination de constante d'acidité de molécules ionisables par spectrophotométrie UV-Visible et par l'analyse des composantes principales," thèse de doctorat. Université de Limoge. 2014.
- [42] H. N. RAJHA *et al.*, "Selective multistage extraction process of biomolecules from vine shoots by a combination of biological, chemical, and physical treatments," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 21, no. 6, pp. 581–589, 2018.
- [43] A. KHADHRI, R. EL MOKNI, and S. SMITI, "COMPOSES PHENOLIQUES ET ACTIVITES ANTIOXYDANTES DE DEUX EXTRAITS DE CHARDON A GLU: Atractylis gummifera," *Rev. Soc. Sci. Nat. Tunisie*, no. May, pp. 39–44, 2012.

-
- [44] R. E. K. DIBACTO *et al.*, “Total Polyphenol and Flavonoid Content and Antioxidant Capacity of Some Varieties of *Persea americana* Peels Consumed in Cameroon,” *Scientific World Journal*. 2021.
- [45] F. KHOLKHAL *et al.*, “Etude phytochimique et évaluation et l'activité anti-oxidante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*,” *Afrique Sci.*, vol. 09, no. 1, pp. 151–158, 2013.
- [46] H. TALBI, A. BOUMAZA, K. EL-MOSTAFA, J. TALBI, and A. HILALI, “Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L.,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 1111–1117, 2015.
- [47] S. KHOUDALI, D. BENMESSAOUDLEFT, A. ESSAQUI, M. ZERTOUBI, M. AZZI, and B. BENAÏSSA, “Étude De L'Activité Antioxydante Et De L'Action Anti Corrosion De L'Extrait Méthanolique Des Feuilles Du Palmier Nain (*Chamaerops Humilis* L.) Du Maroc,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 887–898, 2014.
- [48] L. BARROS, R. C. CALHELHA, J. A. VAZ, I. C. F. R. FERREIRA, P. BAPTISTA, and L. M. ESTEVINHO, “Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 225, no. 2, pp. 151–156, 2007.
- [49] J.A.A.B. ACKAH, A.K.M. KRA, A.J.DJAMAN, and Y.G. YAYE, “Evaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminalia mantaly* (H.Perrier), une combretacée, sur la croissance in vitro de *Candida albicans*,” *Bull. la Société R. des Sci. Liège*, pp. 953–964, 2011.

Résumé

L'objectif de notre étude est l'extraction des polyphénols à partir des trois organes végétaux (feuilles, tiges et racines) de la plante *Bupleurum fruticosum* et l'évaluation de l'activité antioxydante en plus de l'activité biologique, dont l'activité antibactérienne et antifongique. Les extraits polyphénoliques des feuilles, tiges et racines ont été obtenus par macération à froid en utilisant un solvant hydro-méthanolique, suivit par des tests d'identifications phytochimiques et par dosage des polyphénols et des flavonoïdes. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante : la technique de réduction de fer (FRAP) et la réduction du radical DPPH. L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ainsi que *Salmonella typhimurium* selon la méthode des puits, et deux souches fongiques : *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été utilisées pour l'évaluation de l'effet antifongique. L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC indique l'existence de différents composés phénoliques dans les trois extraits. Ces extraits ont révélé une bonne activité antioxydante avec des IC50 proches à celle de l'acide ascorbique qui est égale à 3.76 mg/ml. Les trois extraits ont montré une activité antibactérienne envers les trois souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* et une absence de l'activité antifongique.

Mots clé : *Bupleurum fruticosum*, composés phénoliques, activité biologique, activité antioxydante.

Abstract

The objective of our study is the extraction of polyphenols from the three plant organs (leaves, stems and roots) of the plant *Bupleurum fruticosum* and the evaluation of antioxidant activity in addition to biological activity including antibacterial and antifungal activity. Polyphenolic extracts of leaves, stems and roots were obtained by cold maceration using a hydro-methanolic solvent, followed by secondary metabolites screening in addition to polyphenols and flavonoids dosage. Two methods were used to assess antioxidant activity: the iron reduction technique (FRAP) and the reduction of free radical DPPH. Antibacterial activity was determined on four bacterial stains: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* according to the cylinders method, and two fungal stains: *Candida albicans*, *Aspergillus niger* were used to evaluate the antifungal effect. Analysis by UV-Visible and HPLC indicated the presence of different phenolic compounds in the three extracts. Those extracts showed good antioxidant activity with IC50 close to that of ascorbic acid which is equal to 3.76 mg/ml. The three extracts showed an antibacterial activity to three bacterial stains including *staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* and absence of antifungal activity.

Key words: *Bupleurum fruticosum*, phenolic compounds, biological activity, antioxidant activity.

ملخص

الهدف من دراستنا هذه هو استخراج مادة البوليفينولات من الأعضاء النباتية الثلاثة (الأوراق، السيقان والجذور) لنبات الدواغ (*Bupleurum fruticosum*) وتقييم نشاط مضاد الأكسدة بالإضافة إلى النشاط البيولوجي، بما في ذلك النشاط المضاد للبكتيريا و النشاط المضاد للفطريات. تم الحصول على مستخلصات البوليفينولات للأوراق، السيقان والجذور عن طريق النقع البارد باستخدام مذيب هيدروميثانولي، تليها اختبارات كشف كيميائية نباتية ومعايرة البوليفينولات والفلافونويدات. تم استخدام طريقتين لتقييم نشاط مضاد للأكسدة : تقنية تحديد طاقة ارجاع الحديد (FRAP) و تقنية ارجاع الجذر الحر (DPPH). عملية تحديد النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات الثلاثة تمت على أربع سلالات بكتيرية : اشيريشيا كولي، بسودوموناس اريجينوزا، ستافيلوكوكوس اوريوس وكذلك السالمونيلا تيفيموريوم وفقاً لطريقة الآبار (الانتشار على القرص)، و تحديد النشاط المضاد للفطريات تم باستعمال السلالتان الفطريتان التاليتان: كانديدا البيكوس واسبرجيلوس نيجر. بينت الدراسة التحليلية للمستخلصات الثلاثة بواسطة مقياس الطيف المرئي والطيف الأشعة فوق البنفسجية وكذلك الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء، إلى وجود مركبات فينولية مختلفة فيها. أظهرت هذه المستخلصات نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة مع تثبيط التركيز ل 50% مقاربا لتثبيط التركيز ل 50% لحمض الأسكوربيك الذي يساوي 3.76 مج / مل. بينت دراسة مقاومة المستخلصات الثلاثة للسلالات البكتيرية و الفطرية المستعملة ان هذه المستخلصات لها حساسية ضد ثلاث سلالات بكتيرية بما في ذلك : بسودوموناس اريجينوزا، ستافيلوكوكوس اوريوس و السالمونيلا تيفيموريوم و غياب النشاط المضاد للفطريات.

الكلمات المفتاحية : دواغ، نشاط مضاد للاكسدة، نشاط بيولوجي، المركبات الفينولية.