

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Optimisation, analyse et étude biologique d'extraits
de *Bupleurum fruticosum L.* (Buplèvre)**

Présenté par : **KHEMAR** **Katia**

ZELLALI **Lila**

Soutenu publiquement, le 02 /07 /2019, *Devant le Jury composé de :*

KADRI	Abdelaziz	Professeur	UMMTO	PRESIDENT
BENCHOULAK	Mounir	MAA	UMMTO	ENCADREUR
DIDI	Khaled	Resident	C.H.U	CO-ENCADREUR
LAYEB	Hatem	MCB	UMMTO	EXAMINATEUR

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu de nous avoir aidé et d'avoir été avec nous tout au long de notre travail

Ce travail est réalisé au laboratoire d'organique dans une atmosphère chaleureuse et ce grâce à nos chers professeurs qui nous ont accordé la chance de travailler en groupe d'amis. Nous remercions donc l'équipe des ingénieurs de ce laboratoire Mme KACI Cylia, MmeBOUHRAOUA Souad et Mr KECHIDI Arezki

Un grand merci à nos copines : CHAOUICHI Ouardia, OUSMER Kathia, MOUHAND-SAIDI Katia, LARADI Thiziri, TEMIM Dahbia, ABDELLAOUI Ouiza, AIT-BRAHEM Lilia, TAFAT Hanane, BENSAFI Kamelia, HAMAMI Nawel, HAMI Soumer et KHALDI Fadhila

Notre plus grande gratitude va à notre promoteur Mr BENCHOU LAK Mounir pour sa totale confiance, son aide, ses conseils, son soutien moral ainsi que le temps qui nous a accordé

Nous remercions du fond du cœur Dr TOUZOUIRT pour sa sympathie, son soutien et son aide sur tous les plans ainsi de nous avoir transmis son savoir-faire. Tant de mots ne pourraient exprimer notre fierté de l'avoir à tout moment à nos côtés.

Pr M. KORD pour sa générosité et son aide

Nous tenons aussi à remercier Dr AYATI d'avoir été avec nous, nous orienté et conseillé ; pour sa gentillesse et conseils qu'elle nous a donné

Mr DRIES Fatsah du parc national de Gouraya a Bejaia pour son accueil chaleureux

Nous remercions l'équipe du laboratoire de microbiologie Du C.H.U NEDIR MOHAMED de Tizi-Ouzou spécialement le Dr ABDOUN et le Dr CHERIFI sans oublié notre Co-promoteur DIDI Khaled

Nous adressons un remerciement très chaleureux au professeur BENKACI-ALI qui par son sérieux, générosité, bienveillance et son professionnalisme nous ont permis d'apporter un grand plus dans le contenu de notre mémoire et enrichir ce dernier

Nous remercions également tous les membres du jury : Monsieur H.LAYEB d'avoir accepté d'examiner ce travail et aussi au professeur A.KADRI d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.

Dédicaces

A la mémoire de mes grands-parents qui seraient heureux de me voir réussir dans mes études

A ma très chère grand-mère YAYA, brave femme, courageuse et combattante, voici les résultats de tes prières

A mon cher papa qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis

A ma chère maman, autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi, que Dieu te garde pour nous

A mes chers frères

A ma chère binôme et copine ZELLALI Lila qui a toujours été avec moi et qui a fait preuve de patience et de bienveillance, qui a illuminé mon cursus et avec qui j'ai passé les meilleurs moments à l'université

A mes copines FEGHOUL Rosa, AMROUN Samira, CHABANI Amina qui même si loin des yeux mes proches du cœur

A mon amie AMROUCHENE Djouher

A ma cousine adorée KHEMAR Zahra

A tous les membres de ma famille qui ne cessent de croire en moi ; je ne peux les remercier assez pour tous leurs encouragements, sacrifices et amour

Enfin, à tous ceux qui m'aiment.

Katia

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes chers parents, Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous. Vous m'avez comblé avec tant de tendresse et d'affection tout au long de mon parcours. Vous n'avez pas cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, vous avez toujours été présents à mes côtés pour me consoler quand il le fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

A mes chers frères et sœurs Brahim, Meriem, Mohamed que Dieu vous garde pour moi, ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour que j'éprouve pour vous, merci de faire partie de ma vie

A ma grande sœur Fatma, qui est loin de mes yeux mais près du cœur toujours la quand j'ai besoin de toi, tu n'étais pas qu'une sœur pour moi mais plutôt une meilleure amie, une confidente et une moitié que Dieu te garde pour moi, merci de combler ma vie de bonheur je t'aime

A mon très chers oncle Aldo sur qui j'ai toujours pu compter que Dieu te garde pour nous. Merci d'être un oncle et aussi un pote pour nous

A ma binôme KHEMAR Katia, a vrai dire plus qu'un binôme mais plutôt une meilleure amie et une sœur pour moi, merci d'avoir partagé ce modeste travail avec moi, ainsi que les plus belles années de ma vie je te souhaite une grande réussite dans ta vie je t'aime que Dieu illumine ton chemin.

A mes chères copines, ZEGGANE Narimene, FEGHOUL Rosa et AMROUCHENE Djouher à qui je souhaite plein de réussite je vous aime.

A Anis qui a su me soutenir et être là quand j'en avais besoin, que Dieu t'exauce tes souhaits les plus profond.

Je dédie ce travail à toute personne qui ont contribués a de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Leila

Liste des abréviations

% : Pourcentage

± : plus ou moins

°C : Degré Celsius.

μL : microlitre

AF : avant floraison

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

ANOVA : **analysis of variance (analyse de variance)**

ATCC : American Type Culture Collection

B. fruticosum L. : Bupleurum fruticosum L.

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrophotométrie de masse

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

D : Diamètre.

D.O: densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

E. coli : Escherichia coli

F_{crit} : F critique

F_{obs} : F observé

g : Gramme

h : Heure

HD : hydrodistillation

HDMO : hydrodistillation assistée par micro-onde

HE : huile essentielle

I% : Pourcentage d'inhibition

I_A : Indice d'acide

IC₅₀ : inhibition concentration

I_E : Indice d'ester

I_s : Indice de saponification

Liste des abréviations

K+ : ions du potassium

KI : indice de kovats

M.F.: Mac Ferland

mg : Milligramme

M-H : Mueller Hinton

min : Minute

mm : Millimètre

N : Normalité

nm : nanomètre

PF : pendant floraison

pH : Potentiel hydrogène.

Pui : Puissance

R : rendement en huile essentielle

Rat : Ratio

RSM : Méthodologie des surfaces de réponses.

Staph : staphylococcus aureus

Tem : Température

T_H: Teneur en eau.

Tr : Temps de rétention

UMMTO : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

UV : Ultra-violet.

V : Volume.

λ : lambda

Liste des figures

Figure 1 : La plante de <i>B.fruticosum</i> L.	2
Figure 2 : Montage d'hydrodistillation classique.	7
Figure 3: Hydrodistillation assistée par chauffage au micro-onde.....	8
Figure 4 : Dispositif d'hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde	15
Figure 5 : Refractomètre Abbe.....	17
Figure 6: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant	19
Figure 7 : Teneur en eau de la plante	23
Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	24
Figure 9 : courbe d'étalonnage de la Quercétine	25
Figure 10 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées.	27
Figure 11: Histogramme sur l'influence des coefficients sur les rendements	28
Figure 12 : Représentation graphique de l'évolution des résidus en fonction des valeurs prévues.	29
Figure 13: HE du <i>B. fruticosum</i> L.	31
Figure 14: Résultats du test DPPH pour les extraits de <i>Bupleurum frutiocosum</i> L.....	36
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de la concentration ..	37
Figure 16 : Histogramme montrant l'activité antibactérienne des extraits aromatiques et huiles essentielle de la Buplèvre à 5 μ L.....	38
Figure 17 : Histogramme montrant l'activité antibactérienne des extraits aromatiques et huiles essentiels de la Buplèvre à 10 μ L.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Représentation des caractéristiques de la plante <i>B.fruticosum</i> L.....	2
Tableau 2 : Classification botanique de la plante <i>B.fruticosum</i> L.....	3
Tableau 3 : Domaine de variation des paramètres pour le plan composite a face centré.....	16
Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées pour les tests.....	20
Tableau 5 : Résultats des tests phytochimiques	23
Tableau 6 : Résultat de la quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux avant et pendant floraison	25
Tableau 7 : Résultat des rendements d'extraction	26
Tableau 8 : Résultats d'analyse de variance (ANOVA).....	28
Tableau 9 : Valeur souhaitée pour un rendement optimal	29
Tableau 10 : Les optimums proposé par le logiciel MODDE 6.0.....	30
Tableau 11 : L'optimum de l'extraction	30
Tableau 12 : Résultat des rendements d'extraction des différents procédés et dans différente période de récolte	31
Tableau 13 : Caractère organoleptique d'HE	31
Tableau 14 : Résultat de la caractérisation physico-chimique de l'HE.....	32
Tableau 15 : Résultat d'analyse GC-SM des huiles essentielles des feuilles du <i>Bupleurum fruticosum</i> L. par HD et HDMO	34
Tableau 16 : Pourcentage d'inhibition des extraits (avant et pendant floraison) en fonction de sa concentration.....	36
Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de sa concentration	37

Glossaire

Glossaire

- **Alambic** : est un appareil destiné à la séparation de produits par chauffage puis refroidissement
- **American Type Culture Collection (ATCC)** : est une société privée américaine sans but lucratif, centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de la norme de référence de micro-organismes.
- **Analyse de la variance** : L'analyse de la variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance est basé sur le calcul de l'écart total entre les différentes mesures y_i du plan d'expériences et la moyenne de ces mesures.
- **Anti-fongique** : qui détruit les moisissures et empêche leur développement
- **Anti-pyrétique** : combat la fièvre
- **Anti-scorbutique** : est une substance, un médicament ou une plante, qui lutte contre le scorbut provoqué par un manque d'apport en vitamine C.
- **Carminatif** : Un aliment carminatif, du latin « carminare » qui signifie « carder la laine », transformé en latin médiéval en « carminativus » signifiant « disperser en grattant », d'où « purifier, nettoyer en éliminant », est un aliment qui favorise l'expulsion des gaz intestinaux, tout en réduisant leur production
- **Chromatogramme** : c'est l'image ou le diagramme obtenu par chromatographie
- **Clevenger** : Un montage en verre, avec un ballon où on met le matériel végétal à l'ébullition et un tube ascendant qui termine avec un réfrigérant verticalement pour condenser les gouttes qui descendent dans l'essencier qui se termine par un réservoir énuméré.
- **Entomogame** : se dit de végétaux dont la pollinisation se fait par l'intermédiaire des insectes.
- **Escherichia coli** : est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie.
- **Facteur** : Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposés avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets, contrôlables ou non contrôlables.

Glossaire

- **Fongicide** : qui détruit les champignons et les parasites
- **Gram+, Gram-** : ce sont les classes des bactéries obtenues par la méthode de coloration de Gram
- **Héliophile** : qualifie une espèce végétale ayant d'importants besoins en lumière pour se développer.
- **Hermaphrodite** : Qui présente un hermaphrodisme, qui possède les organes reproducteurs des deux sexes, qu'il s'agisse d'un animal ou d'une plante.
- **Huile essentielle dermocaustique** : (dermocausticité) ce sont des huiles essentielles qui provoquent une forte irritation voire une brûlure de la peau et des muqueuses. Ce sont les huiles qui contiennent des phénols et des aldéhydes aromatiques.
- **Inoculum** : échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.
- **La phytochimie** : est une discipline scientifique de la biochimie et de la botanique avec la physiologie des végétaux dont le but est l'isolement, l'analyse, la purification, l'élucidation de la structure et la caractérisation de l'activité biologique de diverses substances chimiques produites par les plantes.
- **Magnoliophyte** : sont une division de plantes vasculaires du groupe des Spermatophytes (les plantes à graines)
- **MC Farland** : est l'unité de mesure de la densité pour préparer les suspensions des microorganismes, il est utilisé lors de la préparation des inocula bactériens pour les tests de sensibilité aux agents microbiens.
- **Neuropathique** : sont des douleurs chroniques causées par des lésions des nerfs du système nerveux périphérique.
- **Optimisation** : Déterminer quelles conditions expérimentales (les valeurs prises par les facteurs influents) permettent d'obtenir le meilleur résultat pour la réponse.
- **Plan d'expériences** : Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement.
- **Réponse** : Une réponse expérimentale est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les paramètres étudiés. Un phénomène peut être éventuellement décrit par plusieurs réponses expérimentales l'objectif fixé préalablement. Leur but est d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé.

Glossaire

- **Souche ATCC** : est une souche de référence utilisée dans le contrôle microbiologique des antimicrobiens.
- **Staphylococcus aureus** : Le staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre Staphylococcus. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. S. aureus se présente comme une coque en amas, Gram positif
- **Temps de rétention (tr)** : C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne, c'est-à-dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué.
- **Test de Fisher ou Test F** : est un test d'hypothèse statistique qui permet de tester l'égalité de deux variances en faisant le rapport des deux variances et en vérifiant que ce rapport ne dépasse pas une certaine valeur théorique que l'on cherche dans la table de Fisher.
- **Valeur-p (en anglais p-value)** : qui signifie valeur de probabilité, est une mesure statistique comprise entre 0 et 1. Elle est utilisée pour un test d'hypothèse.

Table de matière

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Introduction.....	1

Chapitre 1 : Aperçu bibliographique

1. Bupleurum Fruticosum L.....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Classification botanique	3
1.3. Distribution.....	3
1.4. Propriétés médicinales	3
2. Les extraits de la matière végétale	3
2.1. Composés phénoliques	4
2.1.1. Les acides phénoliques simples.....	4
2.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques	4
2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques	4
2.1.2. Coumarines.....	4
2.1.3. Quinones.....	4
2.1.4. Tanins	4
2.1.5. Flavonoïdes	5
2.1.6. Alcaloïdes.....	5
2.1.7. Isoprénoïdes (Terpénoïdes).....	5
3. Huile essentielle	5
3.1. Généralités	5
3.2. Usages thérapeutiques de l'huile essentielle de <i>Bupleurum fruticosum L.</i>	6
3.3. Toxicité des huiles essentielles.....	6
3.4. Technique d'extraction de l'huile essentielle	6

3.4.1.	L'hydrodistillation classique	6
3.4.2.	Extraction par du CO ₂ supercritique	7
3.4.3.	Hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde	7
3.4.4.	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	8
4.	Analyses des caractéristiques physico-chimiques	8
4.1.	Densité	8
4.2.	Indice de réfraction	8
4.3.	Indice d'acide	8
4.4.	Indice d'ester	9
4.5.	Indice de saponification	9
4.6.	Détermination de pH	9
5.	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	9
6.	Activité thérapeutique d'huile essentielle et de l'extrait de la Buplèvre	9
6.1.	Activité antibactérienne	9
6.2.	Activité antioxydante.....	9

chapitre 2 : Matériels et méthodes

1.	Préparation de la matière végétale	11
2.	Taux d'humidité de la matière	11
3.	Test d'identification phytochimique	11
3.1.	Test pour les alcaloïdes.....	11
3.2.	Tests pour les polyphénols	12
3.2.1.	Préparation de la solution à analyser	12
4.	Extrait de la plante de <i>Bupleurum fruticosum</i> L.	12
4.1.	Quantification de quelques composés de la plante végétale.....	12
4.1.1.	Préparation des échantillons.....	13

4.1.2.	Dosage des polyphénols totaux	13
4.1.3.	Dosage des flavonoïdes totaux	13
4.2.	Préparation des extraits de feuilles de <i>Bupleurum fruticosum L.</i>	14
5.	Huile essentielle de <i>Bupleurum fruticosum L.</i>	14
5.1.	Extraction de l'huile essentielle de la Buplèvre	14
5.2.	Détermination du rendement	15
5.2.	Optimisation d'extraction de l'huile essentielle de la Buplèvre	15
5.3.1.	Plan d'expérience	15
5.3.2.	Choix des facteurs	15
5.3.3.	Choix des réponses	16
5.3.4.	Construction du plan composite à face centré	16
5.4.	Etude analytique de l'huile essentielle du <i>Bupleurum fruticosum L.</i>	16
5.4.1.	Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle	16
5.4.2.	Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle	17
5.4.2.1.	Densité relative	17
5.4.2.2.	Indice de réfraction	17
5.4.2.3.	Indice d'acide	17
5.4.2.4.	Indice de saponification	18
5.4.2.5.	Indice d'ester	18
5.5.	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	18
6.	Activité biologique d'extraits de <i>Bupleurum fruticosum L.</i>	19
6.1.	Evaluation du pouvoir antioxydant	19
6.1.1.	Principe du test au radical DPPH°	19
6.1.2.	Mode opératoire	20
6.2.	Etude de l'activité antibactérienne	20
6.2.1.	Méthode	20
6.2.2.	Souches testées	20

6.2.3.	Ré-isolément des souches bactériennes.....	21
6.2.4.	Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme).....	21
6.2.4.1.	Préparation de l'inoculum.....	21
6.2.4.2.	L'ensemencement	21
6.2.4.3.	Test de l'aromatogramme	21
6.2.4.4.	Incubation et lecture.....	22

Chapitre 3 : Résultats et discussions

1.	Contrôle du taux d'humidité	23
2.	Test phytochimique.....	23
3.	Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	24
3.1.	Dosage des polyphénols totaux	24
3.2.	Dosages des flavonoïdes totaux.....	24
4.	Huile essentielle du <i>Bupleurum fruticosum</i> L. (Buplèvre).....	26
4.1.	Etude statistique des résultats du plan d'expérience	26
4.1.1.	Validation du modèle	27
4.1.1.1.	Adéquation du modèle	27
4.1.1.2.	Facteurs significatifs	28
4.1.1.3.	Analyse de la variance	28
4.1.1.4.	Etude des résidus.....	28
4.1.2.	Estimation des coefficients.....	29
4.1.3.	Optimisation du rendement	29
4.2.	Étude comparative des rendements d'extraction d'HE de <i>B. fruticosum</i> L.	30
4.3.	Etude analytique	31
4.3.1.	Caractère organoleptique.....	31
4.3.2.	Caractérisation physico-chimique	31
4.2.	La chromatographie en phase gazeuse (CG-MS)	32

5. Activité anti radicalaire d'extraits de Buplèvre	36
6. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait Buplèvre.....	37
Conclusion	40
Références	
Annexes	
Resumé	

Introduction

Depuis toujours, l'homme a compté sur les richesses que la nature lui confère afin de subvenir à ses besoins : abri, nourriture ainsi que ses soins médicaux.

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires.

L'Algérie possède une richesse en plantes aromatiques et médicinales utilisées dans divers domaines tel que la pharmacie, parfumerie, cosmétique et en agro-alimentaire et ce pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes.

Le *Bupleurum fruticosum L.* est une plante médicinale appartenant à la famille des apiaceae du genre *Bupleurum* qui est localisée sur le pourtour du bassin méditerranéen. Cette dernière possède plusieurs effets thérapeutiques (antioxydant, anti-inflammatoire, antivirale...) d'où l'intérêt de son étude.

Dans notre travail, nous avons choisis d'étudier les propriétés biologiques et la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait de *Bupleurum fruticosum L.*

Une étude statistique a été réalisée pour optimiser le rendement de l'extraction de l'huile essentielle. Le travail sera présenté comme suite :

Chapitre 1 : (partie bibliographique), où nous aborderons quelques connaissances bibliographiques sur la plante *Bupleurum fruticosum L.* (Buplèvre), son huile essentielle, ses extraits aromatiques et les méthodes d'extractions et d'analyse de ces derniers.

Chapitre 2 : représente la partie expérimentale qui porte sur l'extraction et l'amélioration du rendement en huile essentielle en utilisant les plans d'expériences, l'étude comparative des rendements d'extraction par la méthode hydrodistillation HD et HDMO hydrodistillation par micro-onde, la détermination de ses propriétés physico-chimiques, ainsi que l'étude de leurs activités antibactériennes et antioxydantes.

Chapitre 3 : englobera tout ce qui concerne l'interprétation et la discussion de chaque expérimentation de ce travail. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale qui résumera l'ensemble de ces résultats ainsi que les perspectives dégagées.

Chapitre 1

Aperçu bibliographique

1. *Bupleurum Fruticosum* L.

1.1. Définition

Bupleurum fruticosum L. est un arbuste appartenant au genre *Bupleurum* ayant des feuilles persistantes, mesurant jusqu'à 2m de hauteur avec de simple feuille obovale de couleur bleu-vert et des grappes de minuscules fleurs jaunes.

Il fleurit de juin à septembre et les graines mûrissent d'août à octobre. Son fruit est appelé : Akène.



Figure 1 : La plante de *B.fruticosum* L.

On mentionne quelque caractéristique de la plante *Bupleurum fruticosum* L. dans le tableau suivant [1] :

Tableau 1 : Représentation des caractéristiques de la plante *B.fruticosum* L.

Organes reproducteurs	
Couleur dominante des fleurs	Jaune
Période de floraison	Mai-Septembre
Inflorescence	Ombelle d'ombellules
Sexualité	Hermaphrodite
Pollinisation	Entomogame
Graine	
Fruit	Akène
Dissémination	Barochore
Habitat et répartition	
Habitat type	Matorrals mésoméditerranéens , Héliophiles, acidoclines
Aire de répartition	Méditerranéen

1.2. Classification botanique

Le classement du *B. fruticosum* L. est regroupé dans le tableau 1 [2] :

Tableau 2: Classification botanique de la plante *B.fruticosum* L.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	Bupleurum
Nom binominal	<i>Bupleurum fruticosum</i> L., 1753

1.3. Distribution

Cette espèce, poussant à l'état spontané, est particulièrement répandue sur le pourtour du bassin méditerranéen, notamment dans les régions à garrigue et lieux stériles : Provence, Languedoc, Roussillon, Italie, Corse, Afrique du Nord, Syrie, Liban. En Corse, il est assez fréquemment trouvé depuis le bord de mer jusqu'à une altitude d'environ 800m. Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée, sa répartition semble liée à la présence de sols schisteux (Castagniccia, Cortenais, Cap corse). Une seule station, qui comprend moins d'une trentaine de pieds, est localisée dans le sud de la Corse sur un sol granitique [2].

1.4. Propriétés médicinales

La décoction des racines et des tiges est utilisée contre les rhumatismes dans la médecine populaire sarde. Les feuilles sont considérées comme antiscorbutiques, et le fruit est carminatif. La décoction de racine aurait aussi des effets anti-pyrétiques, anti-névralgiques, anti-inflammatoires, détoxifiants et antimicrobiens, efficace contre les névralgies, la sciatique, les douleurs neuropathiques, les contractures de stress, les spasmes et les tensions musculaires [3].

2. Les extraits de la matière végétale

Ce sont des produits obtenus par le traitement d'une matière première d'origine naturelle par un solv ant. Après filtration, le solvant est éliminé par distillation. Ces composés contenus dans les plantes (responsables du goût brûlant ou piquant, de la couleur ou de la protection vis-à-vis de l'oxydation) sont des substances non entraînaibles par la vapeur d'eau et donc absents de l'huile essentielle. Par contre ils sont extractibles par certains solvants organiques. En utilisant ces solvants, nous obtiendrons des extraits beaucoup plus complets renfermant les substances volatiles. Le solvant sera ensuite éliminé avec le plus grand soin de manière à ne pas faire disparaître les substances les plus volatiles. Par ailleurs, la plupart des solvants utilisés sont l'objet d'une réglementation stricte dictée par des considérations de santé [4].

Pour la préparation d'extraits on utilise des techniques courantes : macération à froid, décoction à ébullition, infusion...

Les extraits naturels issus des plantes utilisées en médecine traditionnelle contiennent une variété de molécules biologiquement actives appelés les métabolites secondaires parmi lesquels on cite :

2.1. Composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans toutes les plantes vasculaires. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante.

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre... [5].

Les principales classes des composés phénoliques sont :

2.1.1. Les acides phénoliques simples

2.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, ils ont une structure générale de base de type (C₆-C₁), ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides [6].

2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ces acides dérivent de l'acide cinnamique, ils ont une structure générale de base de type (C₆-C₃), ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules [6].

2.1.2. Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Ils ont fréquemment un rôle écologique ou biologique [7].

2.1.3. Quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouge, jaune ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides [8].

2.1.4. Tanins

On les retrouve dans les écorces d'arbre et les fruits. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation.

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides.

Les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [9].

2.1.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, auronnes, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (noyau 2-phényl-1-benzopyrane). La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines [9].

2.1.6. Alcaloïdes

Ce sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. Ils ont des propriétés toxiques ou médicamenteuses [10].

2.1.7. Isoprénoïdes (Terpénoïdes)

Ce sont des composés issus de la condensation d'unités de base à carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpénoïdes [11].

3. Huile essentielle

3.1. Généralités

Selon la pharmacopée européenne l'huile essentielle est définie comme suite « une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche ou par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparé par la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

- Selon les normes internationales, les huiles essentielles doivent être liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est souvent inférieure à celle de l'eau, volatiles, insolubles dans l'eau, et solubles dans

les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage, et de polarité moyenne.

La qualité et la composition de l'huile essentielle dépend de [11] :

- Origine géographique sélectionnée ;
- Sélection de la partie de la plante qui détient l'activité recherchée. Les diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, écorce, racine, etc.) peuvent produire des essences différentes. Il est donc important de préciser l'organe végétal ;
- Période de récolte pour obtenir les meilleurs extraits et définir si elle est cultivable ;
- Méthode d'extraction de l'huile essentielle.

3.2. Usages thérapeutiques de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* L.

L'huile essentielle du *B. fruticosum* L. entre dans divers traitements comme [12] :

- Troubles de la sphère respiratoire : toux, gêne respiratoire, bronchite, pneumonie, asthme ;
- Troubles de la sphère gastro-intestinale : inappétence, indigestion, diarrhée, constipation, ulcère gastrique et/ou intestinal ;
- Troubles de la sphère gynécologique ;
- Troubles locomoteurs : crampe, courbature, élongation, tétanie musculaire, hypertonie musculaire, foulure, entorse, tendinite, sciatique, arthrite ;
- Rétention urinaire, maux de tête, grippe, fièvre ;
- Fatigue physique et intellectuelle, insomnie, déprime.

3.3. Toxicité des huiles essentielles

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées [13].

3.4. Technique d'extraction de l'huile essentielle

3.4.1. L'hydrodistillation classique

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait-là plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène, le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes vont se condenser dans un réfrigérant

se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système est équipé généralement par un Clevenger [14].

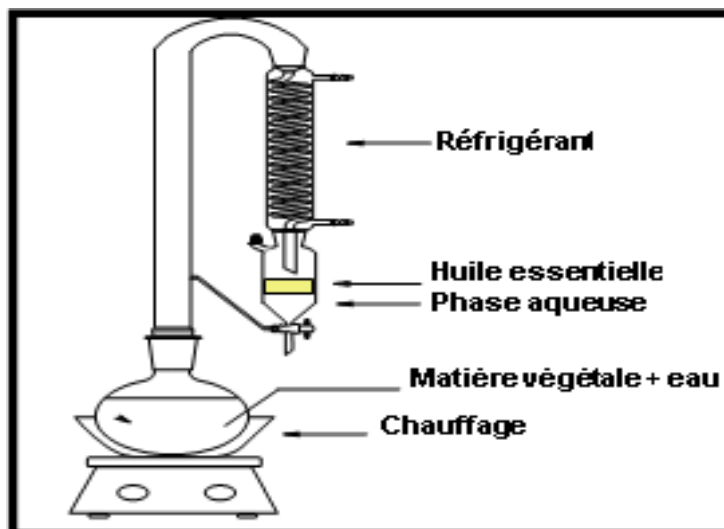


Figure 2 : Montage d'hydrodistillation classique.

3.4.2. Extraction par du CO₂ supercritique

C'est une méthode très moderne qui n'est pas très développée car elle est très coûteuse. Le solvant utilisé est le CO₂ qui est d'origine naturelle en phase supercritique. Lorsqu'il est supercritique le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, ce qui lui confère un excellent pouvoir d'extraction [13].

3.4.3. Hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde

Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes (Figure 3). Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes.

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel puisque le volume traité devient lui-même source de chaleur.

Les avantages sont la rapidité de l'extraction et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique [14].

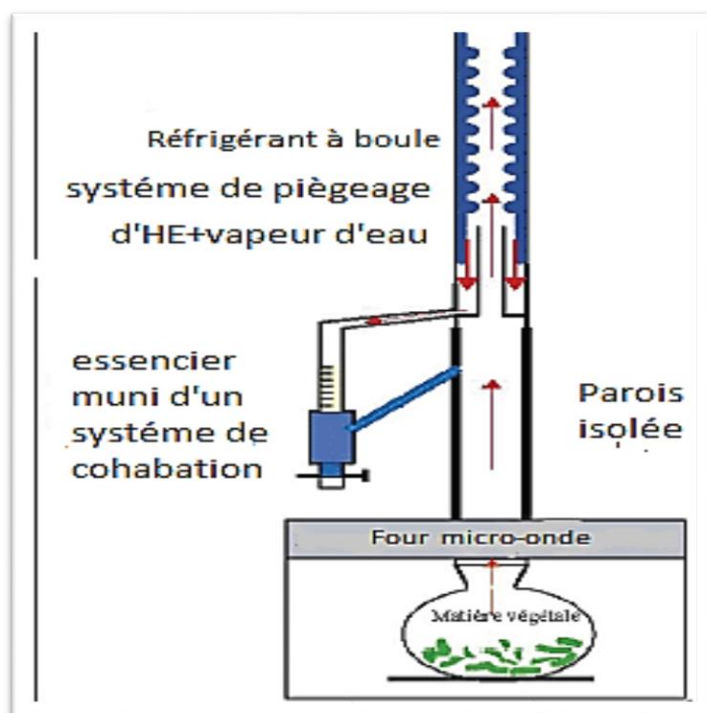


Figure 3: Hydrodistillation assistée par chauffage au micro-onde

3.4.4. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic [14].

4. Analyses des caractéristiques physico-chimiques

Ces analyses concernent essentiellement les paramètres suivants :

4.1. Densité

La densité relative est le rapport de la masse d'un volume de liquide par la masse du même volume d'eau. La densité n'a pas d'unité, elle varie avec la température [15] :

4.2. Indice de réfraction

La réfraction est le changement de direction subi par un rayon lumineux lorsqu'il passe d'un milieu optique donné (l'air) à un autre milieu (HE). L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et dans la substance à analyser, il n'a donc pas d'unité [15].

4.3. Indice d'acide

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE [15].



4.4. Indice d'ester

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'HE [16].



4.5. Indice de saponification

C'est le nombre de KOH nécessaire pour neutraliser l'acide libre et saponifier à chaud les esters de 1g de lipide [16].

4.6. Détermination de pH

Le potentiel hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H^+ en solution [16].

A ces paramètres, on peut aussi ajouter les caractéristiques organoleptiques telles que : l'aspect, la couleur et l'odeur.

5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces [17].

6. Activité thérapeutique d'huile essentielle et de l'extrait de la Buplèvre

6.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne consiste à déterminer la capacité des substances étudiés (HE et extrait) à éliminer ou bien à réduire la prolifération des bactéries en évaluant sa sensibilité vis-à-vis aux souches utilisés pour cette étude. Plusieurs méthodes sont envisageables telles que la méthode de diffusion sur disque [18].

6.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'une substance correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxylphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres [19].

➤ Antioxydants

Un antioxydant désigne toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces derniers [20].

L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes :

- ✓ Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- ✓ Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres [20].

➤ **Radical libre**

On définit par le terme de radicaux libres, tout atome, groupe d'atomes ou molécules qui possèdent sur son orbital externe un électron célibataire non apparié. Les radicaux libres sont des substances chimiques très instables, de durée de vie très courte (10^{-9} à 10^{-6} s) et très réactives par rapport à leur électron célibataire qui va chercher à se réappairier. Un radical libre va, en effet, chercher à se stabiliser : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [21].

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Préparation de la matière végétale

L'échantillonnage de feuilles du *Bupleurum fruticosum L.* a été fait avant floraison (Avril 2019) et pendant la période de floraison (mi-mai 2019), dans une région propre, loin de tout impact de pollution à une altitude de 660m au Parc National de Gouraya qui se situe au mont de Gouraya à la ville de Bejaia.

L'identification de l'espèce végétale est réalisée au sein du Parc National de Gouraya par le botaniste Monsieur DERIES Fatsah.

Le matériel végétal recueilli (feuille) a été séché à une température ambiante à l'ombre et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2. Taux d'humidité de la matière

1g de la matière végétale a été pesé dans un verre de montre, puis séché à l'étuve à 100°C durant 2h par la suite on calcul la perte en masse selon la formule suivante [22] :

$$T_H(\%) = \frac{P_f - P_s}{P_f} * 100$$

Avec :

T_H : taux d'humidité en pourcentage

P_f : Poids frais de l'échantillon (g)

P_s : Poids sec de l'échantillon (g)

3. Test d'identification phytochimique

Le criblage phytochimique est un moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Toutefois, il ne renseigne pas sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisations phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit par formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration [23].

3.1. Test pour les alcaloïdes

10g de poudre végétale (feuilles) sont introduites dans un erlenmeyer de 250mL, 50mL d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% sont ajoutés. Après une macération de 24h à température ambiante, le macéré est filtré et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 50ml de filtrat.

- 1mL de filtrat est prélevé et introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes du réactif de Mayer (**annexe 1**) sont ajoutées ;

- 1mL de filtrat est prélevé et introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes du réactif de Wagner (**annexe 1**) sont ajoutées.

La présence d'alcaloïdes est caractérisée par la formation d'un précipité de couleur blanc-jaunâtre pour la première réaction et brun pour la deuxième [23].

3.2. Tests pour les polyphénols

3.2.1. Préparation de la solution à analyser

5g de poudre végétale (feuilles) sont introduites dans 100mL d'eau distillée bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250mL. Après une infusion de 15min, la suspension est filtrée et rincée avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100mL d'infusé à 5%. Avec cet extrait nous avons identifié les composés suivants [23] :

➤ Test des tanins

5mL d'infusé sont introduits dans un tube à essai auquel 1mL d'une solution aqueuse diluée de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à 1% est ajouté. La présence de tanins est caractérisée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

➤ Test des flavonoïdes

5mL d'infusé sont introduits dans un tube à essai auquel 1mL d'acide chlorhydrique (HCl) est ajouté puis 4mL d'éthanol. On ajoute quelques copeaux de magnésium et on remarque une coloration rouge orangé.

➤ Test des Saponosides

5mL de l'infusé a été agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde (soit 30 agitations). Après un temps de repos de 15min, la hauteur de la mousse dans chaque tube est mesurée.

4. Extrait de la plante de *Bupleurum fruticosum L.*

4.1. Quantification de quelques composés de la plante végétale

Afin de quantifier les composants des feuilles de la plante du *Bupleurum fruticosum L.* avant et pendant la floraison, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu [24], L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la Quercétine [25].

Le protocole utilisé nous permet d'un côté de déterminer les concentrations en métabolites secondaires mais aussi de déduire quel est le bon solvant donnant un meilleur résultat.

4.1.1. Préparation des échantillons

Pour analyser les polyphénols et les flavonoïdes totaux, nous avons effectué trois macérations de 100mg de notre plante sèche pulvérisée dans 10ml d'un mélange méthanol-eau (80-20V/V), de méthanol et d'éthanol pendant 24h.

4.1.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu [26].

- **Préparation de la solution mère** : préparer une solution de 10% (dilué 10fois) ;
- **Préparation de la solution de Folin-Ciocalteu** : prendre 1mL du réactif de Folin et le dilué 10fois ;
- **Préparation de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3** : 1,5g de Na_2CO_3 hydraté dans 20mL d'eau distillé. Ce qui permet d'obtenir une concentration de 75g/mL ;
- **Préparation de l'échantillon** : dans un tube à essai 0,2mL de chaque solution mère ont été introduit + 1mL de solution de Folin, agité pendant 3min puis 0,8mL de Na_2CO_3 est ajouté et laissé incubé pendant 2h à l'abri de la lumière. (trois essais pour chaque extrait ont été réalisés).
- **Essai à blanc** : le même procédé de préparation de l'échantillon en remplaçant le volume extrait par le même volume de méthanol.
- Après incubation, la lecture pour chaque extrait est faite sur l'UV-Visible à une longueur d'onde de 765nm.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est utilisée pour la détermination des flavonoïdes.

4.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïde totaux dans les différents extraits est mesurée par la méthode calorimétrique de chlorure d'aluminium. Elle est basée sur les propriétés chélatrices de l'ion d'aluminium [26].

- **Préparation de la solution mère** : 1ml de chaque extrait est dilué 10 fois ;
- **Préparation de la solution chlorure d'aluminium** : une solution d' AlCl_3 à 2% dilué dans le méthanol ;

- **Préparation de l'échantillon** : un volume de 1mL de la solution $AlCl_3$ à 2% est introduit dans un tube à essai + 1mL de la solution mère, tout en agitant bien le mélange et laisser incuber pendant 10min à l'abri de la lumière (3 essais pour chaque extrait ont été réalisé) ;
- **Préparation à blanc** : le même procédé de préparation de l'échantillon en remplaçant le volume d'extrait par le même volume de solvant. Effectuer l'essai à blanc pour régler l'absorbance de l'appareil à zéro ;
- La lecture est faite sur l'appareil l'UV-Visible à 430 nm.

La courbe d'étalonnage de la Quercétine est utilisée pour la quantification des flavonoïdes.

4.2. Préparation des extraits de feuilles de *Bupleurum fruticosum L.*

La méthode d'extraction que nous avons adopté est la macération à froid par solvant polaire (méthanol). Dans notre cas on a préparé deux extraits de matière végétale (feuilles) qui ont été cueillis dans deux périodes différentes (avant et pendant la floraison). Les feuilles ont été broyées (80g) et soumis dans un bécher en ajoutant un volume de solvant qui doit être appropriée à la quantité de matière végétale (immersion total), Le système est recouvert par un papier d'aluminium (à l'abri de la lumière) à une température ambiante pendant 48h. Les macéras sont alors filtrés et évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Les extraits sont récupérés à l'aide d'une spatule et conservés dans des viales hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière.

5. Huile essentielle de *Bupleurum fruticosum L.*

5.1. Extraction de l'huile essentielle de la Buplèvre

L'extraction de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum L.* a été réalisée par hydrodistillation du genre clevenger par chauffage micro-onde en introduisant une quantité de la matière végétale dans un ballon de 1L puis un volume approprié d'eau distillé y sont versés (une petite quantité de l'huile est extraite par clevenger au moyen d'un chauffage classique afin de comparer le rendement et la différence de composition des huiles).Le dispositif d'hydrodistillation assistée par chauffage au micro-onde sont représenté dans la figure 4 :



Figure 1 : Dispositif d'hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde

5.2. Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traitée.

$$R\% = \frac{m}{m_0} * 100$$

m : représente la masse en gramme de l'huile essentielle.

m₀: représente la masse en gramme du matériel végétal sec.

5.2. Optimisation d'extraction de l'huile essentielle de la Buplèvre

Nous avons choisi d'optimiser le rendement d'extraction de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation assistée par chauffage micro-onde en fixant le volume d'eau distillé (375mL).

5.3.1. Plan d'expérience

Le choix d'un plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction de l'HE de *Bupleurum fruticosum L.* repose sur un outil mathématique qui permet d'organiser les essais afin d'obtenir une meilleure planification d'extraction pour un maximum de précision. La matrice d'expérience ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été faites au moyen du logiciel Modde 6.0.

5.3.2. Choix des facteurs

Les trois facteurs jugés susceptibles d'affecter l'opération d'extraction de l'HE de *Bupleurum fruticosum L.* sont tous des facteurs quantitatifs, c'est à dire des facteurs dont on peut maîtriser le réglage et qui peuvent adopter toutes les valeurs numériques réelles dans l'intervalle choisi. Les facteurs choisis pour cette étude sont : le temps d'extraction ; la puissance du micro-onde et le ratio (matière végétale/ eau).

Le tableau (3) regroupe les niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées (-1 désignant le niveau bas, 0 le niveau moyen, 1 le niveau haut) et en valeurs réelles.

Tableau 1 : Domaine de variation des paramètres pour le plan composite à face centré

Facteur		Niveau		
		-1	0	1
Temps (min)	X ₁	30	45	60
Puissance (W)	X ₂	450	600	800
Ratio (ml/g)	X ₃	5	4,28	3,75

5.3.3. Choix des réponses

La réponse choisie pour notre étude est l'optimisation du rendement de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum L.*

5.3.4. Construction du plan composite à face centré

Le plan composite à face centré a été conçu pour assurer une précision uniforme des estimations de réponse Y dans la totalité du domaine expérimenté, avec le plus petit nombre d'essais possible [27].

Pour notre étude, le nombre de facteurs (k) est égal à 3. Le nombre d'essais à réaliser équivaut au nombre d'essais du plan factoriel ($N_F=2^k$) auquel on ajoute 3 points supplémentaires au centre (N_0) pour évaluer la reproductibilité des mesures et l'erreur expérimentale et six points « axiaux » pour le facteur quantitatif (N_α), avec $\alpha = 1$.

Le nombre total d'essai dans ce cas-là est calculé par la formule suivante :

$$N_F + N_0 + N_\alpha = 2^3 + 3 + 6 = 17$$

La réponse étudiée en fonction des facteurs expérimentaux est donnée par une équation du second ordre de la forme :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3$$

x_1 , x_2 , et x_3 : les niveaux des facteurs 1, 2, 3

a_{ij} : sont les coefficients du modèle. Avec $i = 0, 1, 2, 3$ et $j = 1, 2, 3$

5.4. Etude analytique de l'huile essentielle du *Bupleurum fruticosum L.*

5.4.1. Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle

Cette caractérisation porte sur trois volets :

- L'aspect ;
- La couleur ;

- L'odeur.

5.4.2. Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle

5.4.2.1. Densité relative

A une température ambiante, on pèse séparément et successivement à l'aide d'un eppendorf, des volumes égaux d'HE et d'eau distillé tout en tenant compte du poids de l'eppendorf vide. La densité de l'HE est calculée par la formule [15] :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Avec :

m_0 : Masse de l'eppendorf vide (g)

m_1 : Masse de l'eppendorf rempli d'eau distillé (g)

m_2 : Masse de l'eppendorf rempli d'HE (g)

5.4.2.2. Indice de réfraction

A l'aide du refractomètre d'Abbe, on mesure l'indice de réfraction de l'HE à une température de 21°C (indiquée par le thermomètre intégré de l'appareil). Pour cela, on place une goutte d'HE sur le prisme du refractomètre, puis on effectue le réglage à l'aide de la micro visse et on lit la valeur [15].



Figure 2 : Refractomètre Abbe

La mesure de pH a été effectuée

5.4.2.3. Indice d'acide

On introduit 0,5g d'HE dans une fiole où on ajoute 2,5mL d'éthanol et environ 5 gouttes de phénolphaléine, puis on agite et on titre avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,1N. La couleur jaune claire du liquide (la couleur d'HE) vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette. L'indice d'acide est exprimé par la formule [16] :

$$IA = \frac{(56,1 * N * V)}{m}$$

Avec :

N : normalité de KOH.

V : volume en ml de la solution éthanolique de KOH utilisé pour le titrage.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

5.4.2.4. Indice de saponification

Une quantité de 0,5g d'huile est saponifiée à reflux par 12,5mL de KOH éthanolique (0,5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par de l'acide hydrochlorique (HCl) (0,5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile [16].

L'indice de saponification est calculé par la relation suivante :

$$IS = \frac{28.05 * (V_0 - V)}{m}$$

V : Volume de HCl en mL nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse

IS : Indice de saponification

V₀ : volume de HCl en mL dans le test à blanc en mL

V : Volume de HCl en mL nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse

m : Masse d'huile prise en gramme.

5.4.2.5. Indice d'ester

L'indice d'ester est calculé par la formule suivante [16] :

$$IE = IS - IA$$

IE : indice de saponification

IA : indice d'acide

5.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'huile essentielle a été injectée dans un chromatographe (HP 6890) couplé à un spectromètre de masse de type MSD 5973A (Agilent-HP) à courant ionique total avec une énergie d'ionisation de 70eV à balayage automatique m/z de 50 à 550. La pression et la température de la source sont respectivement de 35×10^{-3} torr et 230°C. La colonne capillaire du chromatographe est de type HP5 (longueur 30m et de 0,32mm, 0,25µm épaisseur de film). La température de la colonne est programmée en isotherme à 60°C pendant 8 minutes puis elle augmente de 4°C/mn jusqu'à 250°C et reste à cette température durant 30minutes. Le débit du gaz vecteur de l'hélium est de 0,5 mL/mn. L'injection est effectuée en mode splitless. Le volume d'injection est de 1µL (5% d'HE dans de l'hexane).

Un mélange d'alcane (C₅-C₃₄) a été injecté en GC/MS sous les mêmes conditions afin de calculer les indices de rétention des différents constituants.

L'analyse qualitative est effectuée par la comparaison des indices de rétention calculés selon Van Den Dool (équation ci-dessous) et les spectres de masse donnés par la banque de données d'Adams [28].

$$KI = 100z + 100n \frac{tr(x) - tr(z)}{tr(z+n) - tr(z)}$$

tr(x) : temps de rétention du soluté étudié

tr(z) : temps de rétention de l'alcane à (z) atomes de carbone qui précède (x).

tr(z+n) : temps de rétention de l'alcane à (z+n) atomes de carbone qui suit (x).

n : différence du nombre d'atomes de carbone entre les 2 alcanes (n=1 généralement).

6. Activité biologique d'extraits de *Bupleurum fruticosum L.*

6.1. Evaluation du pouvoir antioxydant

Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et de l'extrait de *Bupleurum fruticosum L.* a été évalué par le Test de DPPH°.

6.1.1. Principe du test au radical DPPH°

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants qui sont des donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H(2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et vire au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance [29].

La réaction peut être représentée par l'équation suivante (figure 6) :

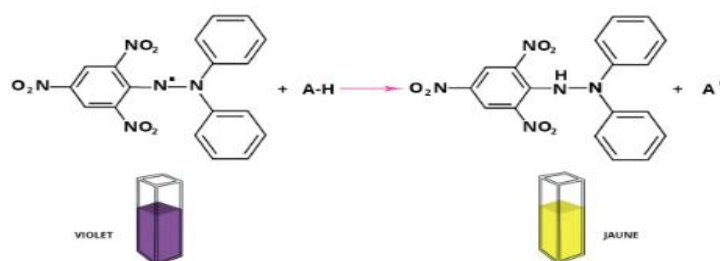


Figure 3: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant

6.1.2. Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée par dissolution de 4mg de DPPH dans 100mL de méthanol, ensuite diluée jusqu'à obtention d'une absorbance allant de 0,7 à 0,9.

Nous avons évalué l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits d'avant et pendant floraison :

Avec les huiles essentielles, nous avons préparé des solutions mères de concentration 50mg/mL et 100mg/mL.

Pour les extraits les solutions mères préparées sont de concentration de 5mg /mL.

Après la préparation des solutions mères nous avons procédé à la dilution de ces dernières afin d'avoir des concentrations de 75 %, 50%, 25%, 12,5% (solutions filles).

50µL de chacune des solutions mères et solutions filles sont additionnées à 2mL de DPPH, après 30min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances ont été lues.

L'acide ascorbique est utilisé comme témoins positif (référence).

L'activité antioxydante est calculée par l'équation suivante :

$$I\% = 100 \times (A_0 - A_e) / A_0$$

Avec:

I% : le pourcentage d'inhibition.

A₀ : l'absorbance du blanc sans huile essentielle.

A_e : l'absorbance de l'échantillon.

6.2. Etude de l'activité antibactérienne

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

6.2.1. Méthode

La technique choisie est l'antibiogramme par diffusion des disques utilisée pour étudier l'interaction entre l'huile essentielle et l'extrait aromatique de *Bupleurum fruticosum L.* avec les espèces bactériennes en inhibant la croissance de celles-ci.

6.2.2. Souches testées

Les souches bactériennes sur lesquelles l'activité antibactérienne a été évalué sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection) représentés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées pour les tests

Bactérie	Souches	Référence	Famille
Gram +	Escherichia coli	ATTC25922	Enterobacteriaceae
Gram -	Staphylococcus aureus	ATTC 29213	Staphylococcaceae

6.2.3. Ré-isolément des souches bactériennes

Cette première étape consiste à isoler les différentes colonies bactériennes sur gélose puis sur des milieux sélectifs (gélose ordinaire) à l'aide d'une pipette pasteur puis les incubent dans une étuve à température allant de 35°C pendant 18 à 24h.

6.2.4. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme)

Le milieu choisi pour les souches bactériennes est la gélose Muller-Hinton (MH), dans des boîtes de pétri stérile en y versant 20mL de gélose par boîte, soit 4mm d'épaisseur. La gélose doit être séchée avant l'application.

6.2.4.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, les colonies bactériennes choisies ont été raclées à l'aide d'un écouvillon et déchargées dans 5 à 10mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. On obtiendra une suspension bactérienne.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

6.2.4.2. 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 2 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.

6.2.4.3. Test de l'aromatogramme

Les disques ont été préparés à partir de papier wattman N°3, les disques doivent avoir un diamètre de 6mm avec un contour bien régulier, sont mis dans un tube à essai et stérilisé à l'autoclave pendant 20min à 120°C. À l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen (ou même à l'étuve), les disques sont déposés sur la surface gélosée MH à un espace de 20mm centre à centre de chaque disque.

Nous avons effectué le test antibactérien pour les extraits ainsi que les huiles essentielles de *Bupleurum fruticosum L.* (avant et pendant floraison) avec deux volumes de 5 μ L et 10 μ L afin de déterminer l'influence de ces derniers sur les résultats de l'activité inhibitrice.

6.2.4.4. Incubation et lecture

Les boîtes de pétries 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'un pied à coulisse ou une simple règle. Les diamètres sont ainsi mesurés et comparés à des diagrammes de référence (**annexe 2**).

Les bactéries sont classées en trois catégories : Résistante (R), sensible (S), intermédiaire (**annexe 2**).

Chapitre 3 :

Résultats et discussions

1. Contrôle du taux d'humidité

La masse de la plante avant séchage : 1,1722g

La masse de la plante après séchage : 0,4369g

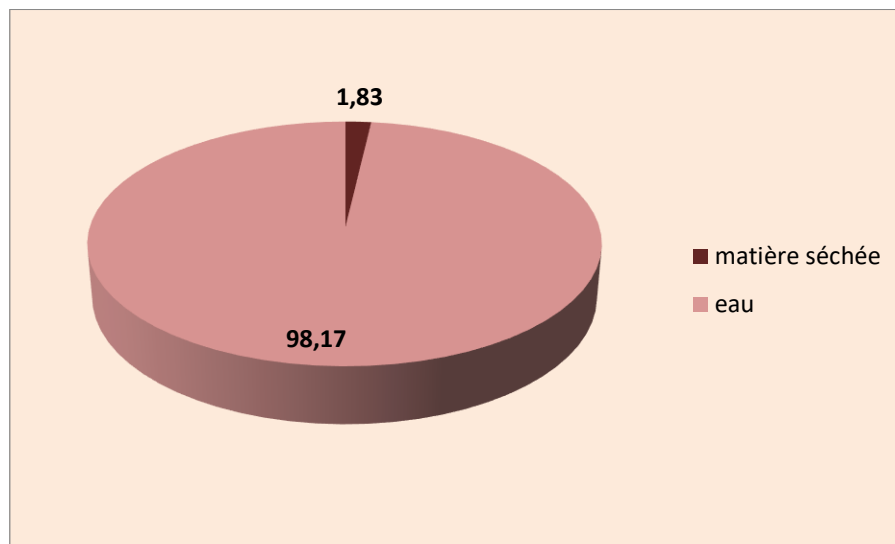


Figure 7 : Teneur en eau de la plante

Discussion

On peut constater que notre plante a une très grande teneur en eau.

2. Test phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de la partie aérienne récoltée avant la floraison est traitée par des réactions qualitatives de caractérisation qui a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes chimiques. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des tests phytochimiques

Test phytochimique		
Alcaloïdes	+	
Polyphénols totaux	Tanin	Flavonoïde
	+++	+++
Saponoside	+++	

Les résultats obtenus par les tests phytochimiques ont montré que notre matière végétale est riche en composés phénolique tels que les tanins et les flavonoïdes.

Les composés phytochimiques sont connus pour posséder diverses propriétés biologiques qui peuvent contribuer à l'utilisation de la plante Buplèvre comme remèdes en médecine traditionnelle. Nous citons les alcaloïdes qui ont été rapportés comme étant cytotoxiques, anti-hypertensifs et anti-arythmiques. Les tanins peuvent exercer des effets astringents, anti-diarrhéiques, diurétiques, hémostatiques, antioxydants, anti-inflammatoires et antimicrobiens [29]. Les flavonoïdes, en plus des trois dernières propriétés suscitées, sont connus pour être des anti-allergiques, cytotoxiques, hépato-protecteurs, antispasmodiques, antiviraux et cytotoxiques [30].

3. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Pour déterminer le meilleur solvant d'extraction de ces composés non volatil, nous avons procédé au dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les différents solvants comme il a été cité dans le protocole.

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. La lecture des absorbances des échantillons par l'UV a été faite à $\lambda = 765\text{nm}$. L'acide gallique a été utilisé comme standard, l'équation de la courbe d'étalonnage de ce dernier est la suivante :

$$Y = 0,0082x + 0,0971 ; (R^2=0.9919)$$

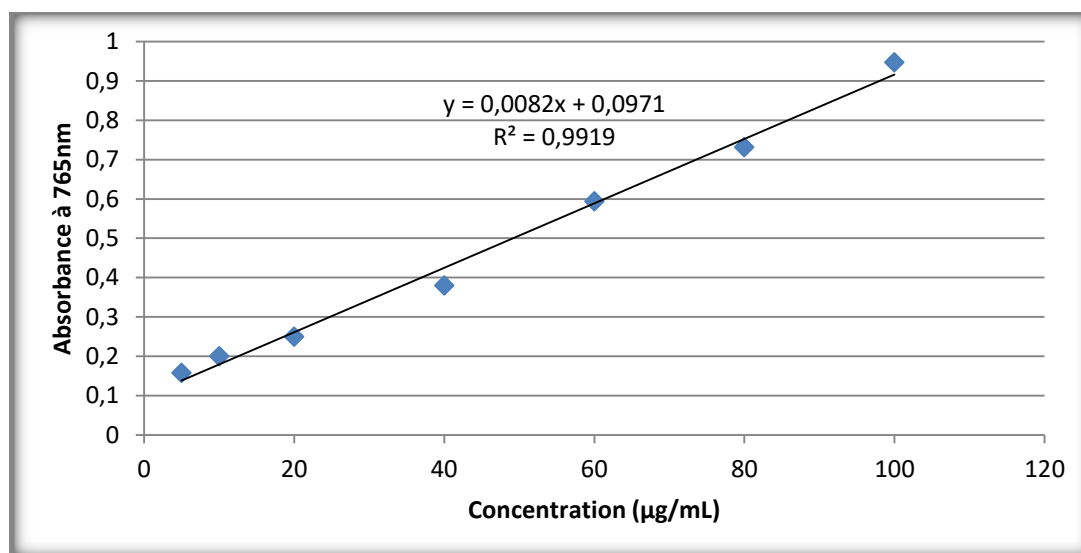


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

3.2. Dosages des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3). La lecture des absorbances des échantillons à été faite sur l'appareil UV-Visible à une

longueur d'onde de 430nm. La Quercétine a été utilisé comme étalon pour tracer une courbe d'étalonnage dont l'équation est :

$$Y = 0,0438x + 0,0296 ; (R^2 = 0,9924)$$

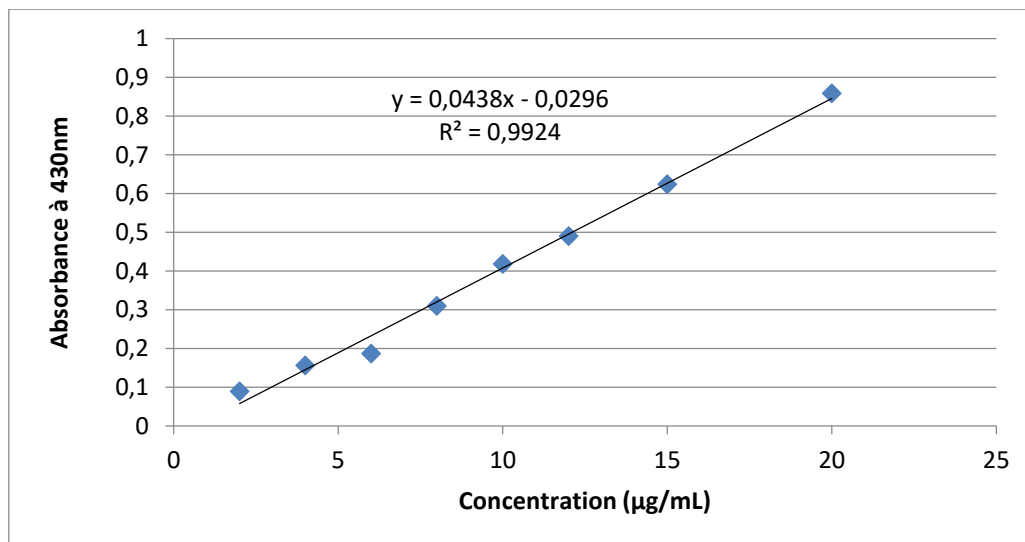


Figure 9 : courbe d'étalonnage de la Quercétine

Discussion

Les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Résultat de la quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux avant et pendant floraison

Dosage	Avant floraison		Pendant floraison	
	Polyphénol ^(a)	Flavonoïde ^(b)	Polyphénol ^(a)	Flavonoïde ^(b)
Ethanol	28,40	6,40	15,39	7,62
Méthanol	45,35	9,64	52,79	16,31
Méthanol+Eau	32,58	8,47	34,25	12,38

(a) : la quantité de polyphénol est exprimée en µg équivalent d'acide gallique par ml d'extrait.

(b) : la quantité des flavonoïdes est exprimée en µg e équivalent de Quercétine par ml d'extrait.

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables et variables en polyphénols et flavonoïdes pour les feuilles du *Bupleurum fruticosum L.* dans les deux périodes de récolte (avant et pendant la floraison). Les taux les plus élevés de polyphénols avant et pendant la floraison ont été obtenus avec le solvant d'extraction méthanol (45,35µg/mL et 52,79µg/mL respectivement) puis dans le méthanol+eau (30,96µg/ml et 45,35µg/ml respectivement) tandis

que dans l'éthanol des teneurs plus faibles (15,35 $\mu\text{g/ml}$ et 28,52 $\mu\text{g/ml}$, respectivement) ont été enregistrés.

Cependant, pour les flavonoïdes, les taux les plus élevés ont été remarqués dans deux solvants d'extraction méthanol (9,64 $\mu\text{g/mL}$ et 16,31 $\mu\text{g/mL}$ respectivement) suivi du méthanol+eau (8,47 $\mu\text{g/mL}$ et 12,38 $\mu\text{g/mL}$ respectivement), en revanche, les quantités les plus faibles en flavonoïdes ont été extraites dans le solvant d'extraction éthanol (6,4 $\mu\text{g/mL}$ et 7,61 $\mu\text{g/mL}$, respectivement). Les résultats du dosage prouvent que ces métabolites (polyphénols et flavonoïdes) se trouvent dans les différentes périodes de récolte (feuilles) avec des proportions différentes variable qui diffèrent d'un solvant à un autre, cette quantité dépend de la nature des substances phénolique dans chaque extrait brut et de leur solubilité dans le solvant choisi. À partir de ces résultats, nous pouvons conclure que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols et les flavonoïdes pour notre plante et que ces derniers sont élevés dans la période de floraison ce qui est confirmé par la littérature [31]

4. Huile essentielle du *Bupleurum fruticosum* L. (Buplèvre)

4.1. Etude statistique des résultats du plan d'expérience

Le tableau 7 représente la matrice d'expériences en valeurs réelles ainsi que les résultats des rendements obtenus après l'extraction.

Tableau 7 : Résultat des rendements d'extraction

N°	Temps (min)	Puissance (W)	Rapport (mL/g)	Rendement (%)
1	30	450	5	0,1186
2	60	450	5	0,1765
3	30	800	5	0,1102
4	60	800	5	0,2152
5	30	450	3,75	0,1123
6	60	450	3,75	0,1859
7	30	800	3,75	0,1223
8	60	800	3,75	0,2175
9	30	600	4,28	0,1584
10	60	600	4,28	0,1948
11	45	450	4,28	0,1476
12	45	800	4,28	0,1601
13	45	600	5	0,1921
14	45	600	3,75	0,2246
15	45	600	4,28	0,2053
16	45	600	4,28	0,2011
17	45	600	4,28	0,2156

4.1.1. Validation du modèle

Pour valider le modèle obtenu dans le domaine étudié, Il faut tout d'abord vérifier l'adéquation du modèle mathématique, analyser les coefficients du modèle qui permettent de déterminer les facteurs significatifs ainsi que les interactions, puis l'analyse de la variance (ANOVA) et enfin l'étude des résidus.

4.1.1.1. Adéquation du modèle

L'adéquation permet de savoir si les valeurs expérimentales se rapprochent des valeurs théoriques estimées par la matrice. Selon Goupy [32] le coefficient de corrélation R^2 et le coefficient de détermination Q^2 de la réponse représentent la capacité du modèle à prédire la réponse. Pour que le modèle soit adéquat, ces conditions doivent être vérifiées :

$$R^2 > 0.8, Q^2 > 0.5$$

La figure10 représente les valeurs observées en fonction des valeurs estimées du rendement

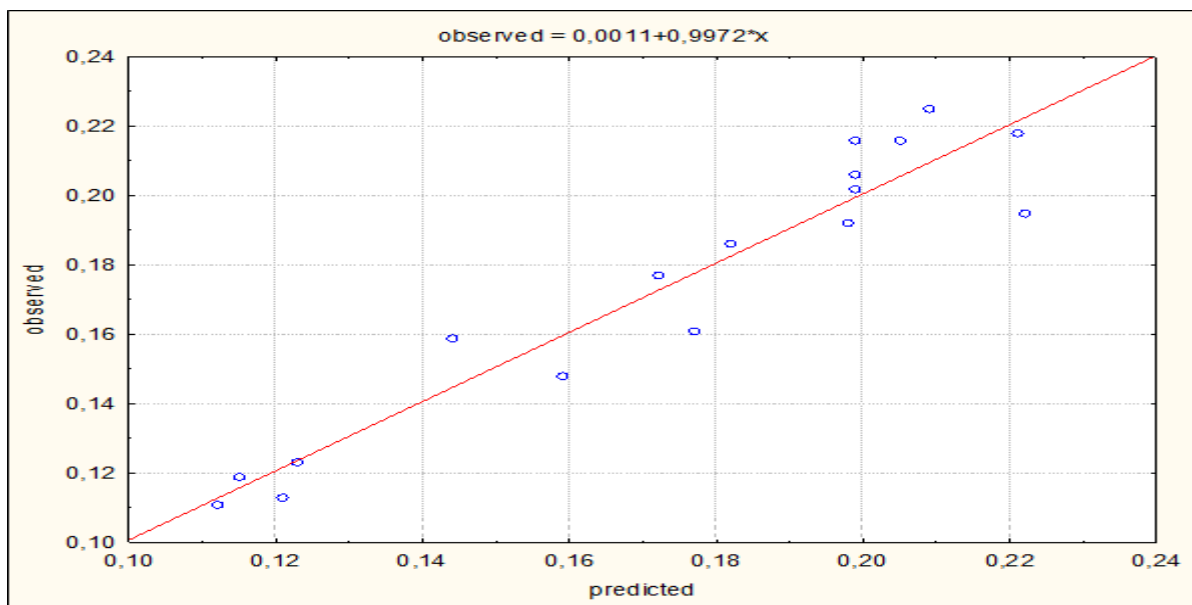


Figure 10 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées.

La figure10 montre que les points se rapprochent de la droite de régression et donc une bonne corrélation entre les valeurs observées et estimées du modèle. Ceci est confirmé par la valeur de $R^2=0,914$ qui est supérieur à 0,8 ainsi que celle de $Q^2=0,508$ qui est supérieur à 0,5. Le modèle choisi est adéquat.

4.1.1.2. Facteurs significatifs

D’après l’histogramme présenté dans la figure 11, les deux facteurs influents sur le rendement sont : le temps d’extraction dans son terme linéaire qui influe positivement contrairement à la puissance du micro-onde qui influe négativement dans son terme quadratique.

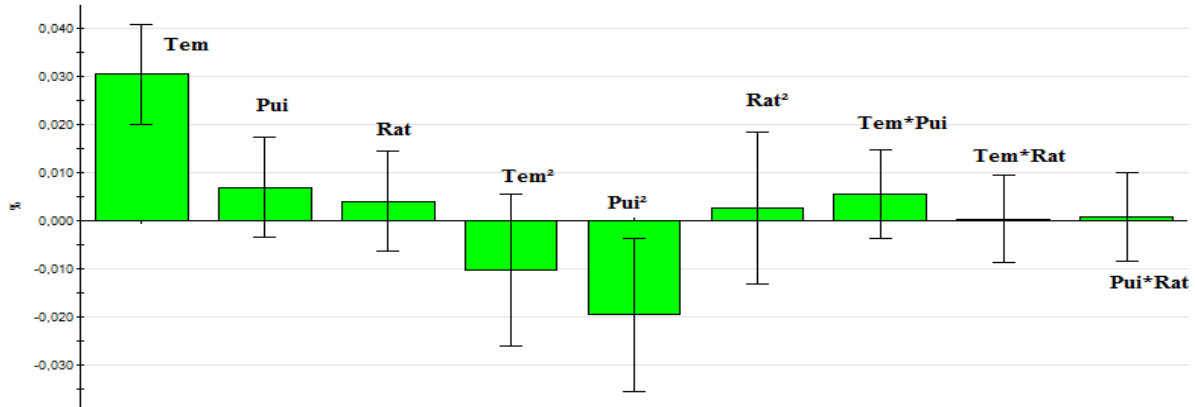


Figure 11 : Histogramme sur l'influence des coefficients sur les rendements

4.1.1.3. Analyse de la variance

Les résultats de l’analyse de la variance sont donnés par le **tableau 9**

Tableau 8 : Résultats d'analyse de variance (ANOVA).

	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F _{observé}	F _{critique}	P-value
Régression	0,0230848	9	0,00256498	8,27072	3,293	0,005
Résidus	0,00217089	7	0,000310127	/	/	/
Total	0,0252557	16	0,00157848	/	/	/

p-value =0,005

F_{obs}= 8,27072

F_{crit} (0,05 ; régression, résidus) =**F** (0,05 ;9,7) =3,293 avec **α**=0,05

F_{obs}> **F_{crit}** et **P**< 0,05 donc le modèle est validé pour cette réponse.

4.1.1.4. Etude des résidus

La figure12 représente l’évolution des résidus estimés en fonction des réponses prévues par le modèle estimé.

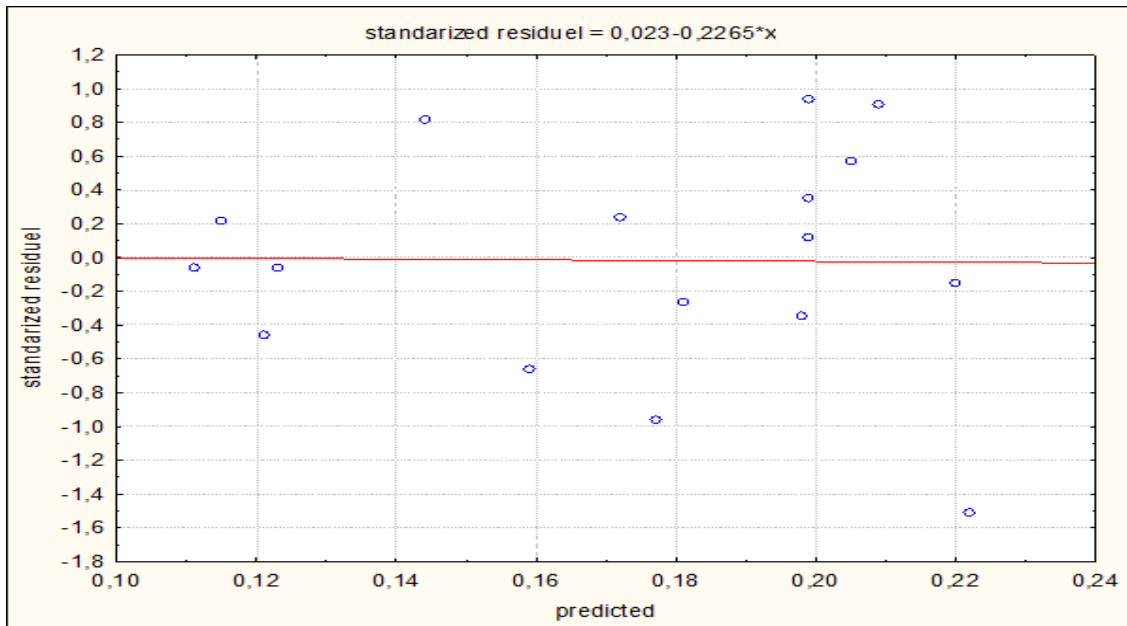


Figure 12 : Représentation graphique de l'évolution des résidus en fonction des valeurs prévues.

Nous remarquons que le nuage de point est aligné aléatoirement le long d'une droite, on conclut que les résidus sont normalement distribués.

Conclusion : Après avoir étudié les différentes étapes de validation, nous pouvons conclure que le modèle choisi pour notre étude est validé.

4.1.2. Estimation des coefficients

La réponse étudiée en fonction des facteurs expérimentaux est donnée par l'équation suivante qui est une équation du second ordre de la forme :

$$Y = 0,19925 + 0,0305774 X_1 - 0,01938 X_2^2$$

4.1.3. Optimisation du rendement

Les propriétés souhaitées pour l'optimisation sont :

Tableau 9 : Valeur souhaitée pour un rendement optimal

Réponse	Critère	Valeur Cible	Min
Rendement	Maximum	0,227184	0,21617

Les solutions proposées par le Logiciel sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Les optimums proposé par le logiciel MODDE 6.0

Temps(min)	Puissance(w)	Rapport(mL/g)	Rendement(%)
60	668	3,77	0,2343
60	778,03	3.77	0,2253
60	679	4,42	0,2228
51	660	3,75	0,2236
60	695	4,28	0,2239

Parmi les optimums donnés par le logiciel, nous avons choisi la solution donnée par le tableau 13 et ceci en prenant en considération le coté économique et écologique :

Tableau 11 : L'optimum de l'extraction

Temps(min)	Puissance(w)	Rapport(mL/g)	Rendement(%)
51	660	3,75	0,2236

4.2. Étude comparative des rendements d'extraction d'HE de *B. fruticosum L.*

Dans le tableau 14 nous résumons le temps et le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum L.* récolté dans la région de Bejaia (Algérie) pendant deux périodes de récolte avant floraison (Avril 2019) et pendant floraison (Mai 2019) et nous avons trouvé que les rendements varient entre 0,1% et 0,6 %

L'extraction par HDMO a permis l'obtention des HEs avec des rendements supérieurs à ceux obtenus par HD. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes). L'extraction s'effectue en deux étapes de durée inégale. L'étape de chauffage, traduit l'augmentation de la température au sein du ballon jusqu'à la température de distillation sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau. Cette période de chauffage est de l'ordre de 6 minutes pour l'HDMO avec une puissance de 600w et de l'ordre de 35minutes pour l'HD.

Tout comme il a été constaté que les rendements, calculés par rapport à la masse de la plante végétale sont particulièrement élevés en période de floraison tandis qu'ils sont notoirement plus faibles lorsque la plante est récoltée avant la floraison cela peut être expliqué par différents facteurs. En effet, le rendement d'extraction, tout comme la qualité d'HE, sont influencés par la nature du sol et le climat sur lequel la plantation est effectuée, la période de récolte, le matériau des appareils utilisés, la propreté du matériel, la pression de fonctionnement, la régularité de la chauffe, le refroidissement du distillat et la régularité de sa coulée, la méthode utilisé pour l'extraction et la durée de distillation etc. [33].

Tableau 12 : Résultat des rendements d'extraction des différents procédés et dans différente période de récolte

Rendement	HD	HDMO
Avant floraison (%)	0,1966	0,2246
Pendant floraison (%)	0,3908	0,402
Temps (min)	180	45

4.3. Etude analytique

La caractérisation physico-chimique a été faite pour l'huile essentielle de la Buplèvre extraite avant floraison

4.3.1. Caractère organoleptique

L'huile essentielle de la plante Buplèvre est liquide et d'une couleur jaune claire. Les caractères organoleptiques sont reportés dans le tableau 13

Tableau 13 : Caractère organoleptique d'HE

Caractère	HE
Odeur	Forte
Couleur	Jaune claire
Aspect	Liquide mobile

**Figure 13 :** HE du *B. fruticosum* L.

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, en remarque que les HE sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

4.3.2. Caractérisation physico-chimique

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle de l'HDMO pendant floraison sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Résultat de la caractérisation physico-chimique de l'HE

Indice	Valeur	Valeur de référence	Discussion selon AFNOR
Densité	0,8986	Inferieur a 1	Conforme
pH	5.5	Entre 5-6,5	Conforme
Indice de réfraction	1,502(21° C)	Supérieur à 0.13356	Conforme
Indice d'acide	1,122	Inferieur a 2	Conforme
Indice de saponification	112,2	Supérieur à 100	Conforme
Indice d'ester	111,078	Supérieur à 100	Conforme

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'acide, indice de réfraction...) est une étape primordiale mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques.

4.2. La chromatographie en phase gazeuse (CG-MS)

Les résultats obtenus par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse nous montre qu'il y'a une différence de composition de nos huiles obtenues par HD et HDMO.

On remarque qu'il y'a plus de composés identifiés dans l'huile obtenue par HD (49 composés) que dans la méthode HDMO (38 composés).

Les composés : Tricyclène (0,037%) , Thuja-2,4(0)-diene (0,025%) , solillionene <trans-> (17,270%) , Terpinolene (0,025%) , Méthyl but yl isovalerate<2-> (0,038%) , Mentha-2,8-dien-1-ol<cis-p->(0,031%),Menth-2-en-I-ol<trans-p>(0,058%),Isopulegol<neo-> (0,054%), Isoborneol (0,032%), Isocitral<(E)-> (0,083%),Piperitol<trans->(0,039%) , Tetrahydrojasmon<trans->(0,089%),Octanediol<2,4->(0,110%),Acetophenone<4'-methoxy-> (0,091%) , Jasmone<iso-> (0,111%),Jasmonylacetate<(E)-> (0,105%) , Muurola-3,5-diene <cis-> (0,041%) , Muurolene<GAMMA> (2,263%) , Elemenone<trans-BETA> (impure) (6,568%) , Endesmol<10-epi-GAMA-> (0,859%) , Khusinol (0,687%) et le Bisabolol<aLPHA> (0,165%) sont présents dans le spectre de HD et totalement absents dans l'autre spectre.

Le Thujene<α>, Fenchene<α>, Sabinene, Myrcene, Phellandrene<α>, Carene<δ-3->, Terpinene<α>, Ocimene «(Z)-β>, Ocimene<(E)-β>, Terpinene<γ>, Terpinolene, Sabinene

hydrate <trans->, Fenchol<endo->, Menth-2-en-1-ol <cis-p->, Campholenal< α >, Pinocarveol<trans->, Verbenol<trans->, Sabina ketone, Pinocarvone, Cresolacetate< ρ >, Terpinen-4-ol, Cryptone, Terpineol< α >, Myrtenal, Muurolo-4(4),5-diene <trans-> et l'Atlantol< β > sont présents dans les deux huiles essentielles à des teneurs faibles inférieures à 2,5 % .

Dans les deux méthodes, l'huile obtenue présente les mêmes composants dominants avec des pourcentages légèrement différents : α -Pinène (20.033% pour l'HD et 23.709% pour l'HDMO), β - phéllandrène (33,859% par HD et 29,758% par HDMO).

Nous avons constaté un pourcentage très élevé en monoterpènes (78,807% pour l'HD ; 83,215% pour l'HDMO) d'où la forte odeur de ces huiles essentielles.

Pour le spectre de l'HD (**Annexe3**), nous remarquons la présence de isolimonène<trans-> avec un pourcentage élevé de 17,27f% et totalement absents dans l'autre spectre. C'est une molécule potentiellement allergisante, il est donc nécessaire de diluer ces huiles essentielles dans une huile végétale avant toute application afin d'éviter la dermocausticité [34].

Dans le spectre de l'HDMO (**Annexe3**) la présence de β -pinène a été révélé avec un pourcentage de 18,877%, ce dernier est totalement absent dans l'autre spectre, sachant que cette substance possède des activités antibactériennes [35].

-Trois composés sesquiterpéniques sont identifiés pour la méthode HD contre deux pour l'HDMO avec des pourcentages proches respectivement de (2,905% et 2,446%).

-L'HE obtenue par HDMO est beaucoup plus riche en composés hydrocarbonés (83,215%) par rapport à la méthode HD (78,807%) ceci dit notre HE selon la littérature a une activité antibactérienne sachant que les principaux composés responsables de cette dernière sont bien les monoterpènes [36], mais aussi ils sont responsables de la forte odeur de nos huiles.

Ces pourcentages sont légèrement inférieurs à des résultats obtenus pour la même plante (88,61% pour l'HD contre 85,65% pour l'HDMO) [37] récoltés dans la même région mais a une période de récolte différentes (après floraison), ceci est justifié par la chémotype de la matière végétale et le climat. Ces résultats sont conformes à la littérature qui affirme que les taux de composés sont plus élevés après la période de floraison [31].

La teneur la plus haute en composés oxygénés a été obtenue par la HD qui est deux fois plus grande que celle de la méthode HDMO avec des pourcentages respectivement 10,841% et 4,892% nettement inférieur à une étude déjà faite après floraison qui présente des pourcentages

0,92% avec l'HD et 2,22% pour l'HDMO. La différence de pourcentage de ces composés oxygénés dans les deux méthodes réside sur la différence de temps de contact matière végétale/eau.

Les cétones (7,371% pour l'HD ; 2,162% pour l'HDMO), les aldéhydes (0,21% HD ; 0,428% HDMO) et les alcools (2,903% HD ; 1,766%). On remarque que les cétones pour l'HD sont présentes avec une proportion nettement supérieure à celle de l'HDMO. Sachant que les cétones sont des substances toxiques, nous pouvons dire que l'huile obtenue par HDMO serait une huile de meilleure qualité que celle obtenue par HD puisque cette dernière contient moins de composés cétoniques.

Vu ces résultats, nous avons constaté que la technique HDMO est la meilleure méthode qui nous a permis d'économiser le temps ainsi que l'énergie nécessaire pour l'extraction et nous a procuré une HE d'une meilleure qualité. Les résultats d'analyse GC-SM des huiles essentielles de *Bupleurum fruticosum* L. sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultat d'analyse GC-SM des huiles essentielles des feuilles du *Bupleurum fruticosum* L. par HD et HDMO

N°	Nom des composés	tr (X) (min)	KI calculé	KI (Adams)	HD	HDMO
1	Tricyclène	7,841	926	926	0.037%	/
2	Thujene< α >	8,118	931	931	1.096%	1.025%
3	Pinène < α ->	8,625	940	930	20.033%	23.709%
4	Fenchene< α >	9,194	951	951	0.465%	0.419%
5	Thuya-2,4(10)-diene	9,481	956	952	0.025%	/
6	Sabinene	10,499	975	960	1.063%	2.322%
7	Pinene< β >	10,664	978	979	/	18.877%
8	isolimonene<trans->	10,768	980	980	17.270%	/
9	Myrcene	11,407	992	984	1.869%	1.360%
10	Phellandrene< α >	12,007	1003	1003	2.551%	1.460%
11	Carene< δ -3->	12,268	1009	1011	0.441%	0.260%
12	Terpinene< α >	12,605	1016	1017	0.142%	0.260%
13	Cymene< α >	12,993	1025	1026	/	0.518%
14	Phellandrene< β >	13,484	1035	1029	33.859%	29.758%
15	Ocimene «(Z)- β >	13,75	1041	1037	1.674%	0.868%
16	Ocimene<(E)- β >	14,181	1050	1050	0.555%	0.324%
17	Terpinene< γ >	14,612	1059	1059	0.219%	0.104%
18	TerpinoIene	15,92	1088	1088	0.245%	0.145%
19	Sabinene hydrate <trans->	16,488	1100	1098	0.121%	0.133%
20	Méthyl but yl isovalerate<2->	16,67	1104	1104	0.038%	/
21	Fenchol<endo->	17,022	1113	1116	0.026%	0.046%

22	Menth-2-en-1-ol <cis-p->	17,358	1121	1121	0.083%	0.106%
23	Campholenal< α >	17,547	1126	1126	0.034%	0.081%
24	Mentha-2,8-dien-1-ol <cis-p->	17,929	1135	1137	0.031%	/
25	Pinocarveol<trans->	18,065	1139	1139	0.045%	0.247%
26	Menth-2-en-1-ol <trans-p->	18,12	1140	1140	0.058%	/
27	Verbenol<trans->	18,28	1144	1144	0.039%	0.263%
28	Isopulegol<neo->	18,324	1145	1148	0.054%	/
29	Sabina ketone	18,553	1151	1159	0.075%	0.117%
30	Pinocarvone	19,041	1163	1164	0.049%	0.124%
31	Isoborneol	19,187	1166	1160	0.032%	/
32	Cresolacetate< ρ >	19,371	1171	1170	0.092%	0.215%
33	Necrodol<cis-a->	19,554	1175	1173	/	0.104%
34	Isocitra1<(E)->	19,558	1176	1180	0.083%	/
35	Terpinen-4-ol	19,653	1178	1177	0.245%	0.199%
36	Cryptone	20,001	1186	1185	0.388%	1.511%
37	Terpineol< α >	20,201	1191	1188	0.095%	0.125%
38	Myrtenal	20,386	1196	1195	0.094%	0.239%
39	Tetrahydrojasmane<trans->	20,864	1310	1310	0.089%	/
40	Hexenyl3-methyl butanoate «3Z)->	21,783	1238	1235	/	0.096%
41	Octanediol<2,4->	21,787	1338	1341	0.110%	0.092%
42	Hexylisovalerate	21,936	1243	1244		/
43	Car-3-en-2-one	22,057	1247	1248	/	0.238%
45	Acetophenone<4'-methoxy->	22,059	1347	1350	0.091%	/
46	Jasmane<iso->	23,324	1386	1389	0.111%	/
47	Terpinen-7-al < α >	23,326	1286	1285	/	0.162%
48	Acetophenone<3'-methoxy->	23,661	1296	1298	/	0.172%
49	Jasmonylacetate<(E)->	23,72	1398	1398	0.105%	/
50	Muurola-3,5-diene <cis->	25,916	1450	1450	0.041%	/
51	Neocallitropsene< α >	26,804	1477	1476	/	1.938%
52	Muurolene< γ >	26,882	1479	1479	2.263%	/
53	Muurola-4(4),5-diene <trans->	27,278	1491	1493	0.601%	0.508%
54	Elemenone<trans-> (impure)	30,712	1600	1602	6.568%	/
55	Atlantol< β >	30,939	1608	1608	0.246%	0.231%
56	Cubenol<1-epi->	31,424	1624	1628	/	0.644%
57	Endesmol<10-epi- γ >	31,432	1625	1623	0.859%	/
58	Khusinol	33,06	1680	1680	0.687%	/
59	Bisabolol< α >	33,226	1686	1685	0.165%	/
Alcools					2,903	1,766
Aldéhydes					0,211	0,428
Cétones					7,371	2,162
Sesquiterpènes					2,905	2,446
Monoterpènes					78,807	83,215
Esters					0,356	0,536
Composés oxygénés (alcools+cétones+aldéhydes+esters)					10,841	4,892

5. Activité anti radicalaire d'extraits de Buplèvre

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC₅₀ exprimées en mg/ml sont comparable entre elles et non pas seulement à celle d'une référence. L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour chaque extrait de plante avant floraison **A.F** et pendant floraison **P.F**, les résultats des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés sont présentés ci-dessous :

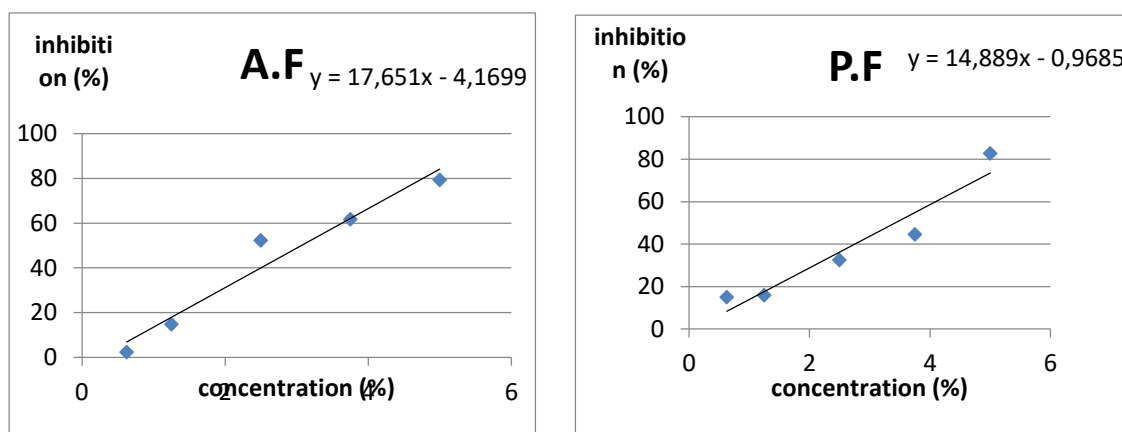


Figure 14 : Résultats du test DPPH pour les extraits de la Buplèvre

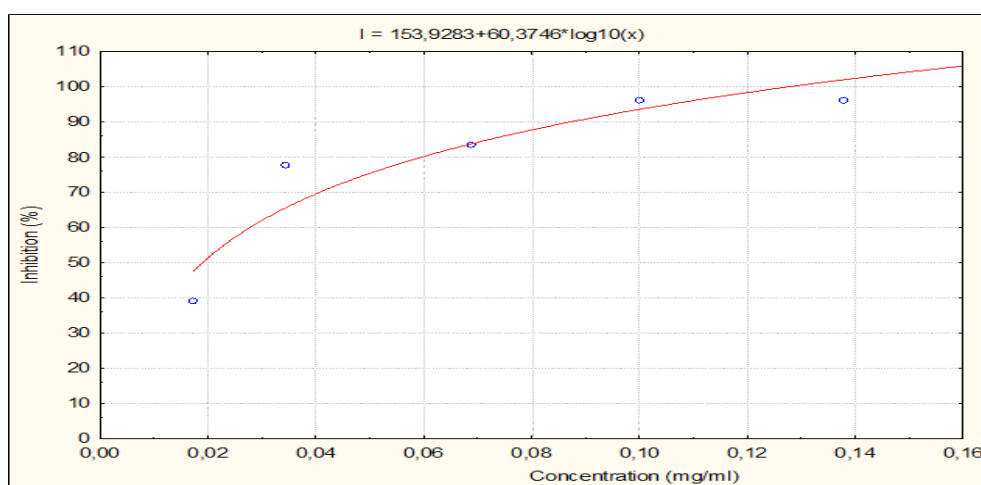
Tableau 16 : Pourcentage d'inhibition des extraits (avant et pendant floraison) en fonction de sa concentration

Extrait A.F		IC ₅₀ mg/mL	Extrait P.F		IC ₅₀ mg/mL
[C] mg/mL	I (%)		[C] mg/mL	I (%)	
5	79,36	3.069	5	82,75	3.423
3,75	61,77		3,75	44,51	
2,5	52,39		2,5	32,44	
1,25	14,93		1,25	15,92	
0,625	2,37		0,625	14,95	

Les absorbances de la substance de référence étant l'acide ascorbique a été mesuré et le pourcentage d'inhibition a été calculé et représenté dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de sa concentration

acide ascorbique		IC ₅₀ mg/mL
[C] mg/mL	I (%)	
0,1378	96	0,1378
0.1	96	
0,0689	83.53	
0,03445	77.8	
20,01725	39.02	

**Figure 15** : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de la concentration

Le tableau 14 montre que l'acide ascorbique d'IC₅₀=0,1378 utilisé comme standard s'avère plus actif par rapport à tous les extraits de *Bupleurum fruticosum L.* testés. L'extrait des feuilles avant floraison est le plus actif comme antioxydant puisqu'il donne la valeur la plus faible d'IC₅₀ comparée à l'extrait après floraison.

En ce qui concerne les deux huiles essentielles de Buplèvre (avant et pendant floraison), nous avons constaté qu'elles n'ont pas une activité vis-à-vis du DPPH même en doublant la concentration de la solution mère à 100mg/mL. Ce qui nous a permis de déduire que notre huile essentielle n'a pas d'activité antioxydante.

6. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait Buplèvre

On remarque que nos extraits avant floraison (E.A) et pendant floraison (E.P) sont résistantes (annexe 2) aux deux souches bactériennes.

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles obtenue avant floraison (H. A) et pendant floraison (H.P) avec la méthode d'hydrodistillation a des volumes de 5µL ont montré un

diamètre d'inhibition qui est inférieur à 8mm ce qui nous permet de déduire que les deux souches E. coli et Staph ne sont pas sensibles (résistantes).

En augmentant le volume des HEs à 10 μ L, les résultats ont montré quelques changements dans les activités de ces derniers. En effet, avec 10 μ L, les huiles H.P. HD et H.P. HDMO ont pu développer une plus grande activité vis-à-vis d'E. Coli et de Staph. Le plus grand diamètre d'inhibition remarqué dans ces tests est attribué à l'H.P. HDMO contre le Staph avec un diamètre de 20mm. Ce qui nous permet de dire que le staph est sensible vis à vis de l'huile essentielle obtenue par L'HDMO pendant floraison.

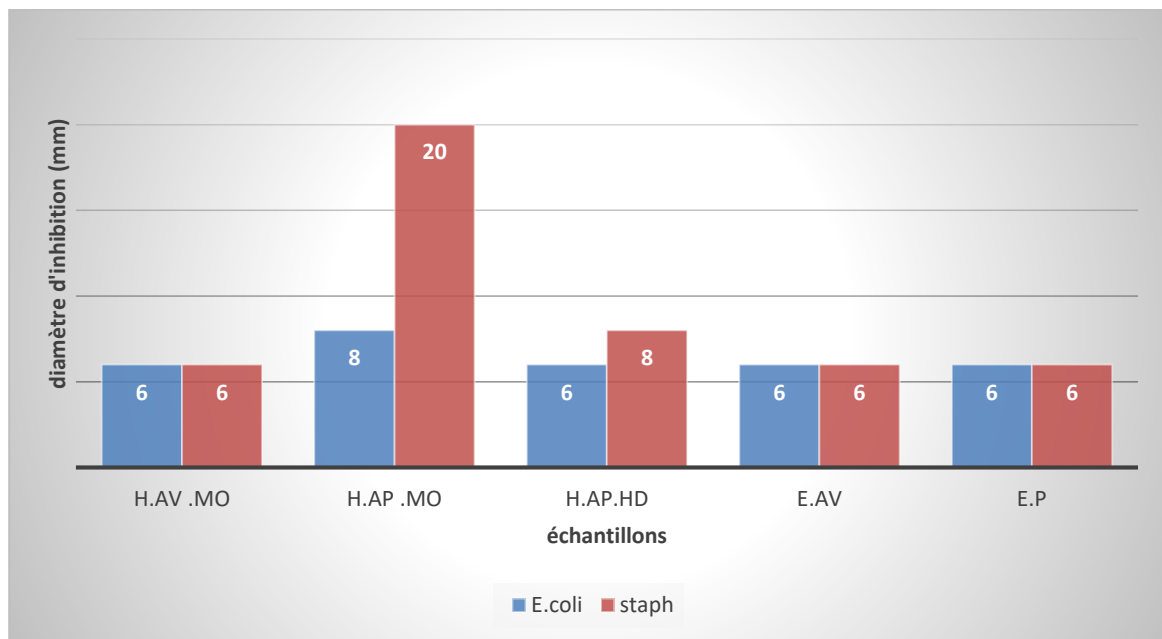


Figure 16 : Histogramme montrant l'activité antibactérienne des extraits aromatiques et huiles essentielles de la Buplèvre à 5 μ L

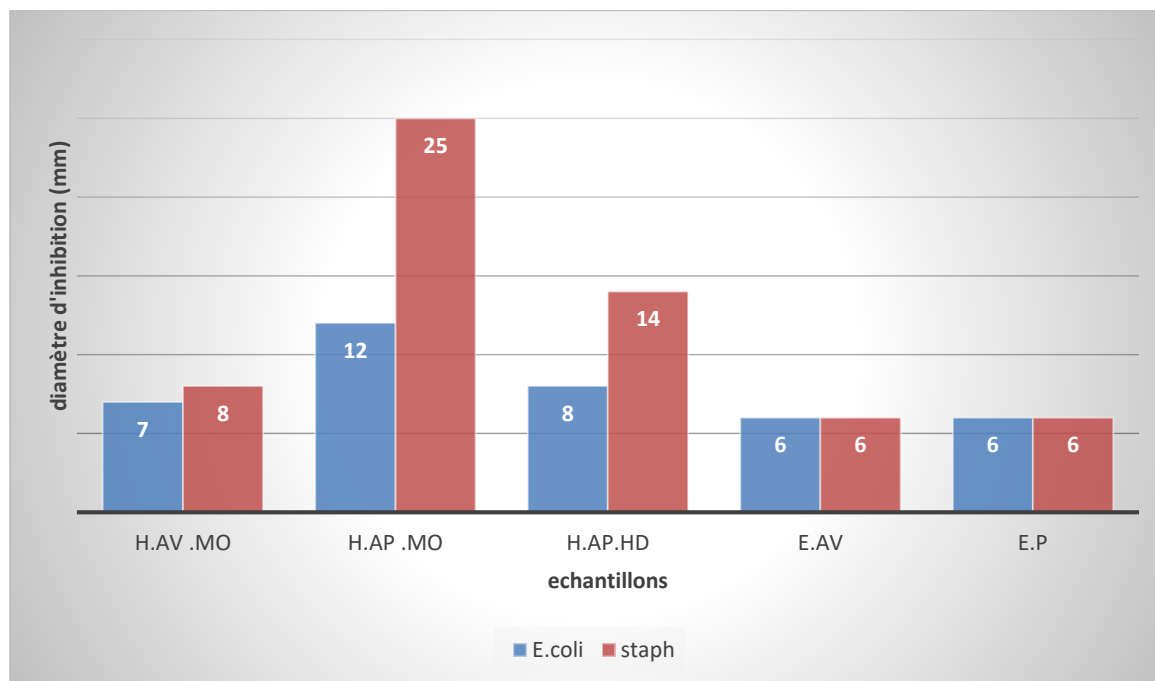


Figure 17 : Histogramme montrant l'activité antibactérienne des extraits aromatiques et huiles essentielles de la Buplèvre à 10µL.

En conclusion, les extraits ne présentent pas d'effet antibactérien contre les souches *Escherichia. Coli* et *staphylococcus aureus* contrairement aux huiles essentielles.

En terme d'activité antibactérienne et d'effet pharmacologique la méthode du micro-onde nous permet d'obtenir une huile essentielle avec un grand pourcentage d'inhibition bactérien comparé à une hydrodistillation classique ce qui concorde avec les résultats de la (CG-SM).

Conclusion générale

Dans cette étude trois axes de recherches ont été faites, le premier est la détermination de l'optimisation des rendements d'extraction des huiles essentielles de *Bupleurum fruticosum L.* par chauffage micro-ondes. Le second consiste en une étude comparative de la composition chimique des huiles obtenues par chauffage micro-onde et chauffage classique. Le troisième point consiste en l'étude de l'activité biologique des huiles essentielles ainsi que des extraits méthanoliques de notre plante.

Les résultats nous permettent de conclure que :

- Le rendement en huile essentielle est meilleur lors du chauffage par micro-ondes ;
- Les huiles essentielles extraites par HDMO et HD présente les mêmes composés majoritaires (β -phallandrène et α Pinène) ;
- L'étude de l'optimisation a montré que temps de l'extraction est le facteur influent sur le rendement contrairement à la puissance qui influe négativement si cette dernière est trop élevée.
- La qualité de l'HE extraite par HDMO est considérée meilleure que celle obtenue par l'HD du fait que cette dernière contienne une proportion élevée en cétones (7,37%) et en isolimonène (17,27) ;
- La plante récoltées pendant floraison présente un effet biologique, une proportion en flavonoïdes et polyphénols élevé par rapport à celle d'avant floraison ;
- Les huiles essentielles de l'HDMO présentent un effet antibactérien plus élevé par rapport à l'HD mais ne présente pas d'effet antioxydant.
- L'extrait de la plante pendant floraison présente une activité antioxydante plus importante que celle d'avant floraison ; cependant l'effet est nettement faible comparé à l'acide ascorbique qui est notre substance de référence. Les extraits n'ont pas montré d'effet antibactérien même en augmentant leurs concentrations à 100 mg/mL.

En conclusion, le micro-onde permet d'avoir un bon rendement d'extraction avec un bénéfice important sur le plan économique et écologique mais aussi permet d'avoir des huiles de qualité présentant un bon effet antibactérien et moins toxiques.

Afin d'approfondir les aspects entrevus dans ce travail, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- Evaluer l'activité anti-inflammatoire ;
- Préparer une formulation et étudier ses propriétés physico-chimiques et thérapeutiques ;
- Évaluer leurs potentiels in-vivo ;
- Exploiter le pouvoir antimicrobien dans l'industrie pharmaceutique pour enrichir l'arsenal thérapeutique ;
- Et enfin, inciter la pharmacopée à reconnaître cette méthode d'extraction.

Références

- [1] - G. Dugoet et al, Essential oils from leaves of typical Mediterranean plants, Note I, *Bupleurum fruticosum*, *Essenze, Derivati Agrumari*, p70, 2002.
- [2] - A. M. Cauwet-Marc, Fascicule III, *Systématique des espèces méditerranéennes vivaces* thèse de doctorat, centre universitaire de perpignon, p : 228-230, 1976
- [3] - D.Falconieri, *Estrazione di composti biologicamente attivi da piante della Sardegna*, thèse de doctorat, 2011.
- [4] - H. Richard, *Les arômes : Cahiers de nutrition et de diététique*, XXIV, p : 2-6, 1989.
- [5] - J. Bruneton, *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales –*, techniques et documentations, 3ème Ed, Paris, p : 227-494, 1999.
- [6] - P. Sarni-Manchado et V. Cheynier, *Les polyphénols en agroalimentaire*, Ed : Lavoisier, p2-10, 2006.
- [7] - J.J. Macheix et al, *les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, Ed : Presses poly technologiques et universitaires romandes, p : 4-5, 2005.
- [8] - R. Brown et al, *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiacées du Burkina Faso : cas de Leucas martinicensis (Jacquin)*, thèse, Burkina Faso, 2009
- [9] - J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (Techniques et Documentation)*, Ed : Lavoisier, 2èmeEd, p623, Paris, 1999.
- [10] - J.B. Harborne, *Phytochemical methods, A guide to modern techniques of plants analysis*, Third Edition, 1998.
- [11] - F. Mayer, *Utilisation thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite*, université de Lorraine, 2012.
- [12] - F.J Cazin, *livre : plantes médicinales indigènes*, 3eme Edition, p.212, Paris ,1868.
- [13] - I. Merzougui et al, *étude de l'effet antibactérien et antioxydant d'Ammodendron verticillata de la région de Tlemcen*, thèse, université Abou-Bakr Belkaïd, Tlemcen, 2012.
- [14] - R. Deschepper, *Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype aromathérapie*, thèse de doctorat, faculté de pharmacie Marseille, 2017.

- [15] - A. Guerrouf, Application des huiles essentielles dans la lutte microbiologique cas d'un cabinet dentaire, thèse, université Kasdi Merbah, Ouargla,2017.
- [16] - N. Chalabi, Caractéristiques physico-chimiques de quelques extraits d'une plante : Ferula communis L, thèse, Tlemcen,2017.
- [17] - C. Deng and al, Rapid analysis of essential oil from Fructus Amoni by pressurized hot water extraction followed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38, 326-331, 2005.
- [18] - R. Giordani et al, action anticadidosique des huiles essentielles : leurs utilisations concomitantes avec des médicaments antifongiques, Phytoterapie,3p, p121-124 ,2006.
- [19] N. Fekih, propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en Algérie, thèse, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen,2015
- [20] - W. Abdelli, Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris, Thèse doctorat, Université Abdelhamid ibn badis – MOSTAGANEM,2017.
- [21] - N.Ouis ,étude chimique et biologique des huiles essentielle de coriandre, de fenouil et de persil,these de doctorat,université d'Oran,2015.
- [22] - A. Guedouari, plantes médicinales d'Algérie. Alger : Office des publications universitaires,2003.
- [23] - A. Sofowora, Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Spectrum Books, Ibadan, 150p, 1993.
- [24] - H.B. Li and al, evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, Food chemistry, 102: 771-776, 2007.
- [25] - T. Bahorun and al, Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, Arzneimittel-Forschung, 46: 1086-1089, 1996.
- [26] - N. Mahmoudi et al, étude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.),BP270-9000 Blida,2013
- [27] - Dr. R. Adam, identification of essential oil components by gas chromatography, 4th Ed

- [28] – M. Goudjil and al, study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the oil extracted from leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. *Journal of chemical and pharmaceutical research*.7:1.pp.379-385,2015
- [29] - D. Bruyne T, Condensed vegetables tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical System Ecology*, 27, 445-459p, 1999.
- [30] - M. Saxena and al, phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 168-182p,2013.
- [31] - K. LIU, la RMN du carbone-13, outil d'analyse étude phytochimique de *clinopodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina Corsica*, thèse de doctorat, université de Corse,2008.
- [32] – J. Goupy, Creighton L,introduction aux plans d'expériences.3eédition : DUNOD,2006.
- [33] – E. Guenther., the essential oils. Vol. 5. New York, USA: Van Nostrand Company Inc,1952.
- [34] - Books of Dante, les huiles essentielles à monoterpènes, volume 6 ,2014
- [35] – W.Wang et al , Activité antibactérienne et activité anticancéreuse de *Rosmarinus officinalis* L., huile essentielle comparée à celle de ses composants principaux, , publiées dans *Molecular Diversity Preservation International Journal*,2014.
- [36] – A. Koziol , An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. *Mini Rev Med Chem*,14(14):1156-68, 2014.
- [37] - A. Mekaouere, C.Korbab, étude de la composition chimique et des propriétés médicinales de la buplèvre,thèse,U.S.T.H.B,2016.

Annexes

Annexe 1

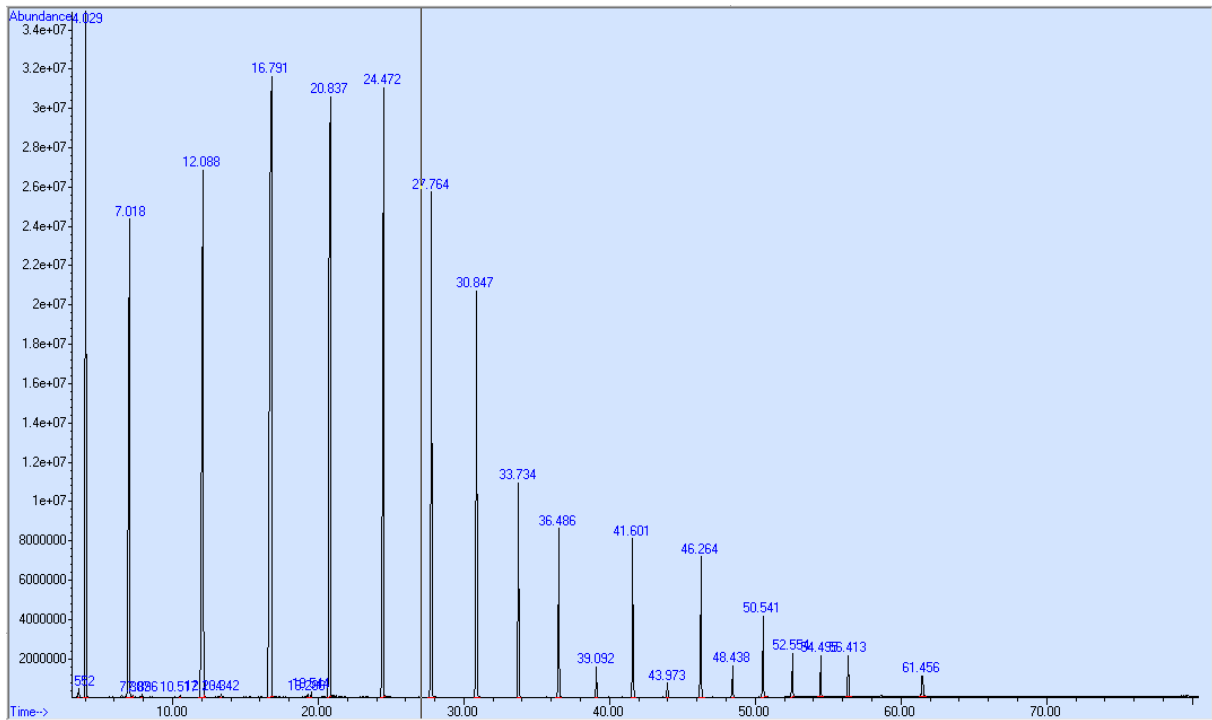
Préparation des réactifs de caractérisation phytochimique

- **Réactifs de Wagner** : on fait dissoudre 2 g de KI et 1,27g de I₂ dans 75 ml d'eau, la solution ainsi obtenue est ajoutée à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc.
- **Réactif de Mayer** : on dissout 1,358 g de HgCl₂ dans 60ml d'eau et 5 g de KI dans 10ml d'eau, on mélange ensuite les deux solutions et on ajuste le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

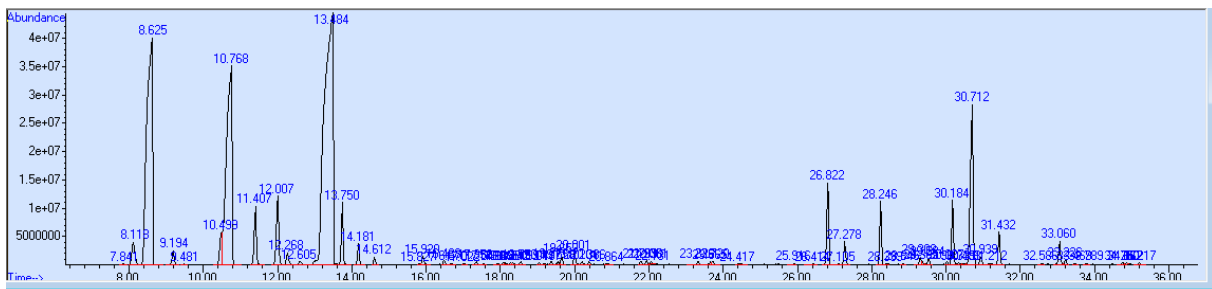
Annexe 2 : Table de Fisher- Snedecor ($\alpha= 5\%$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927
150	3.904	3.056	2.665	2.432	2.274	2.160	2.071	2.001	1.943	1.894
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878
400	3.865	3.018	2.627	2.394	2.237	2.121	2.032	1.962	1.903	1.854

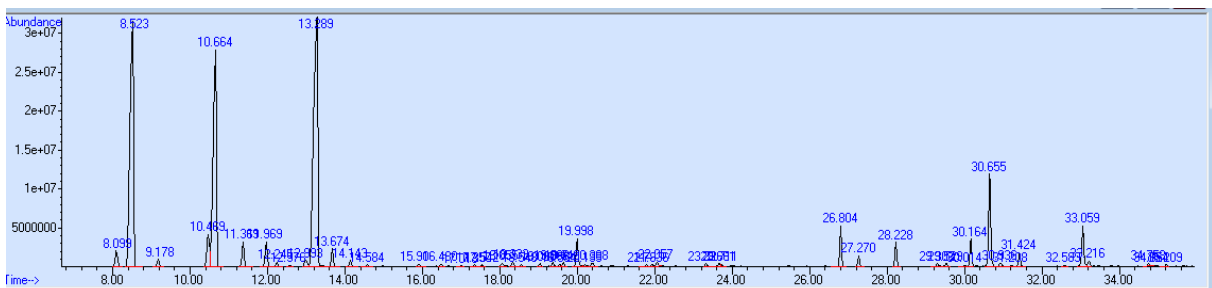
Annexe 3 : les chromatogrammes obtenus par la CG-SM



Chromatogramme des alcanes



Chromatogramme de l'HE obtenu par l'HD



Chromatogramme de l'HE obtenu par HDMO

Annexe 3

Tableau : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition

Sensibilité	Zones d'inhibition
Non sensible (-)	Diamètre < 8mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 14 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20mm

Résumé

Notre étude s'est portée en premier lieu sur l'optimisation de l'extraction de l'huile essentielle du *Bupleurum fruticosum* L. par hydrodistillation assistée par micro-onde et la comparaison de la composition de cette huile à celle obtenue par chauffage classique. La GC-MS a montré que les deux huiles contiennent les mêmes composants dominants avec des pourcentages légèrement différents en α -Pinène et β - phéllandrene. Les huiles essentielles présentent une importante activité antibactérienne vis-à-vis du germe staphylocoque mais ne révèle aucune activité antioxydante. Puis en deuxième lieu, sur l'étude des extraits méthanoliques qui ont présenté un effet antioxydant faible comparé à l'acide gallique et une absence d'activité antibactérienne sur les souches étudiées.

Mots clés : Buplèvre, huile essentielle, hydrodistillation, micro-onde, plan d'expérience, GC-SM.

Abstract

Our study is focused on the optimization of the extraction of the essential oil of *Bupleurum fruticosum* L. by microwave assisted hydrodistillation and the comparison of the composition of this oil with that obtained by conventional heating. GC-MS showed that both oils contain the same dominant components with slightly different percentages of α -Pinene and β -phellandrene. Essential oils have a significant antibacterial activity against the staphylococcus germ but do not reveal any antioxidant activity. Then secondly, on the study of methanolic extracts, which showed a weak antioxidant effect compared to gallic acid and a lack of antibacterial activity on the studied strains.

Key words: Buplevre, essential oil, hydrodistillation, microwave, experimental design, GC-MS.

ملخص

تركز دراستنا على الاستفادة المثلى من استخراج الزيوت العطرية من *Bupleurum fruticosum* L. عن طريق التمييع الهيدروجيني بمساعدة الميكروويف ومقارنة تكوين هذا الزيت بالتركيب الذي تم الحصول عليه بواسطة التدفئة التقليدية. أظهرت GC-MS أن تكوين الزيوت مختلف ولكن له نفس المكونات المهيمنة بنسب مئوية مختلفة قليلاً من α Pinene و β -phellandrene ، للزيوت الأساسية نشاط مضاد للجراثيم بشكل كبير فيما يتعلق بجراثيم المكورات العنقودية. لكنه لا يكشف عن أي نشاط مضاد للأكسدة. ويركز الجزء الثاني على دراسة مقتطفات. ومع ذلك ، الميثانول هو أفضل المذيبات الاستخراج. قمنا أيضاً بتقييم النشاط البيولوجي للمستخلصات الميثانولية ، والتي أظهرت تأثيراً منخفضاً مضاداً للأكسدة مقارنةً بحمض الغالي ، وهو المادة المرجعية لدينا ولم تظهر أي نشاط مضاد للجراثيم.

الكلمات المفتاحية: البوبليفير ، الزيت العطري ، التكسير المائي ، الميكروويف ، التصميم التجريبي ،

GC-MS.