

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI Mokhtar Annaba University
Université BADJI Mokhtar – Annaba



جامعة باجي مختار –

عنابة

Faculté des sciences

كلية العلوم

Département de chimie

قسم الكيمياء

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat LMD

Spécialité : Chimie des Produits Naturels - Analyses et Applications

Par :

ZERRAD Chaima

Thème :

**EVALUATION DE QUELQUES PROPRIETES BIOLOGIQUES
ET INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DE DEUX
PLANTES ENDEMIQUES ALGERIENNES**

| N° | Nom et prénom | Grade | Etablissement | Qualité |
|----|--------------------|-------|-------------------------------------|---------------------|
| 01 | BELHANI Billel | MCA | Université Badji Mokhtar -Annaba | Président |
| 02 | TOUDERT Nadia | MCA | Université Chadli Bendjedid-El Tarf | Directrice de thèse |
| 03 | FERCHICHI Loubna | Prof. | Université Badji Mokhtar -Annaba | Examinatrice |
| 04 | BOUGHRARA Boudjema | MCA | Université Chadli Bendjedid-El Tarf | Examineur |
| 05 | HAMEL Tarek | Prof. | Université Badji Mokhtar -Annaba | Membre invité |

Année : 2025/2026.

Dédicace

C'est grâce à Dieu que tout a commencé, et c'est à lui que je rend grâce.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que Dieu te garde en bonne santé, à toi PAPA

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, MAMA que j'adore, aucun mot ne saurait exprimer l'amour, la gratitude et le respect que je porte. Merci pour tes sacrifices, ta patience, ton soutien indéfectible et ton amour inconditionnel. Tu es ma force et ma plus grande fierté. Que Dieu te protège et te garde pour moi.

À la mémoire de mes grands-parents puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme.

À mes très chère et adorable frère M^{ed} Taher et Nassereddine merci pour votre présence et encouragement au cours de ce parcours puisse Dieu vous donne la santé, le bonheur, le courage et surtout la réussite.

À l'âme pure et lumineuse de ma chère tante ZERRAD Awatef, qui restera à jamais gravée dans mon cœur.

À ma très chère tante, Dr ZERRAD Warda, en reconnaissance pour son précieux soutien et son aide tout au long de mon parcours universitaire. Sans toi, je ne serais pas arrivée jusque-la.

À toute ma famille, pour leur soutien moral et leur affection qui ont été une véritable

source de motivation.

*À mes amis, et par exception Hajer, Aya et Roumaïssa pour leur soutien, leur présence
et tous les moments inoubliables partagés*

Chaima

Remerciement

AU nom d'Allah, le tout Miséricordieux, le très Miséricordieux. Je rends grâce à Allah, le tout-puissant, de m'avoir accordé la force, la patience et la volonté nécessaire pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma Directrice de thèse Madame TOUDERT Nadia, docteur à l'Université Chadli Bendjedid-El Tarf, pour sa confiance qu'elle m'a accordée et pour l'encadrement qu'elle a assuré tout au long de ce travail.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur DJILANI Salah Eddine, Professeur à l'Université Badji Mokhtar -Annaba, Directeur du laboratoire de synthèse et biocatalyse organique, qui, bien qu'il ne soit plus formellement mon directeur de thèse, a travaillé à mes côtés pendant cinq ans. Son suivi constant, ses précieux conseils et sa disponibilité m'ont été d'un grand secours pour surmonter les difficultés rencontrées et mener ce travail à son terme. Je lui adresse toute ma reconnaissance et mon profond respect pour la confiance qu'il m'a témoignée.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Monsieur BELHANI Bilel, Docteur à l'Université Badji Mokhtar -Annaba, président de jury, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette soutenance, ainsi qu'à Madame FERCHICHI Loubna, Professeur à l'Université Badji Mokhtar -Annaba, et Monsieur BOUGHRARA Boudjma, Docteur à l'Université Chadli Bendjedid-El Tarf, membres du jury, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Madame BERREDJEM Malika, Professeur à l'Université Badji Mokhtar -Annaba, pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseils bienveillants qui m'ont grandement facilité la réalisation de ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance au membre invité, pour leur aide dans la réalisation de cette thèse, Professeur HAMEL Tarek, botaniste du Département de Biologie, Université BADJI Mokhtar-Annaba . Un grand merci pour le choix, la récolte et l'identification de nos plantes.

je n'oublie pas Monsieur HADDAG Hamza, Docteur à l'Université Badji Mokhtar -Annaba, membre de laboratoire de synthèse et biocatalyse organique pour son aide pour les analyses de LC-MS.

Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude à mes parents et mes frères et toutes les membres de ma famille et mes amis aya pour son encouragement

| Table des matières | Page |
|--|------|
| المخلص..... | i |
| Abstract | ii |
| Résumé | iii |
| Abréviation | iv |
| Table des figures | v |
| Liste des tableaux | vii |
| Introduction | 1 |
| Partie Bibliographique | |
| Chapitre I : Généralités sur les espèces étudiées | |
| I.1. Introduction..... | 4 |
| I.2. Présentation botanique de la famille des Brassicaceae..... | 4 |
| I.2.1. Classification botanique..... | 4 |
| I.2.2. Caractéristiques morphologiques générales..... | 5 |
| I.2.3. Répartition géographique et diversité..... | 6 |
| I.2.4. Intérêt économique, écologique et scientifique..... | 6 |
| I.2.4.1. Intérêt économique et agronomique..... | 6 |
| I.2.4.2. Intérêt écologique | 7 |
| I.2.4.3. Intérêt en santé humaine..... | 7 |
| I.2.4.4. Intérêt scientifique et génétique..... | 7 |
| I.3. Le genre Brassica..... | 8 |
| I.3.1. Classification botanique..... | 8 |
| I.3.2. Origine et répartition..... | 8 |
| I.3.3. Caractéristiques morphologiques générales..... | 9 |
| I.3.4. Intérêt agronomique et économique..... | 9 |
| I.3.5. Enjeux écologiques et de conservation..... | 10 |
| I.4. Présentation de Curciferae : <i>Brassica fruticulosa</i> Cirillo subsp. <i>Numidica</i> | 11 |
| I.4.1. Classification botanique..... | 11 |
| I.4.2. Généralités et intérêt..... | 11 |
| I.4.3. Description morphologique..... | 12 |
| I.5. Présentation de <i>Brassica insularis</i> Moris..... | 13 |
| I.5.1. Classification botanique..... | 13 |
| I.5.2. Présentation générale..... | 13 |
| I.5.3. Caractéristiques morphologique..... | 14 |
| I.5.4. Répartition et habitat..... | 14 |
| Références..... | 15 |
| Chapitre II : Méthodes d'extraction et technique d'analyses | |
| II.1. Introduction..... | 18 |
| II.2. Méthodes d'extraction conventionnel..... | 18 |
| II.2.1. Extraction par solvant..... | 18 |
| II.2.1.1. Macération..... | 18 |
| II.2.1.2. Infusion..... | 18 |
| II.2.1.1. Décoction..... | 19 |
| II.2.2. Extraction par Soxhlet..... | 19 |

| | |
|--|----|
| II.2.3. Distillation..... | 19 |
| II.2.4. Extraction liquide-liquide..... | 20 |
| II.3. Techniques d'extraction avancées..... | 20 |
| II.3.1. Extraction assistée par ultrasons..... | 20 |
| II.3.2. Extraction par micro-onde..... | 21 |
| II.3.3. Extraction par fluides supercritiques..... | 22 |
| II.4. Comparaison des Différentes Techniques d'Extraction..... | 23 |
| II.5. Analyse des produits..... | 23 |
| II.5.1. Techniques spectrophotométrie..... | 24 |
| II.5.2. Techniques chromatographique..... | 24 |
| Références..... | 26 |
| Chapitre III : Métabolites secondaires | |
| III.1. Introduction..... | 30 |
| III.2. Métabolites primaires..... | 30 |
| III.3. Métabolites secondaires..... | 31 |
| III.3.1. Définition..... | 31 |
| III.3.2. Classification des métabolites secondaires..... | 31 |
| III.3.3. Composés phénolique..... | 31 |
| III.3.3.1. Définition..... | 31 |
| III.3.3.2. Classification..... | 32 |
| III.3.3.2.1. Flavonoïdes..... | 32 |
| III.3.3.2.2. Acides phénoliques..... | 35 |
| III.3.3.2.3. Lignanes..... | 37 |
| III.3.3.2.4. Coumarines..... | 38 |
| III.3.3.2.5. Tanins..... | 41 |
| III.3.3.3. Biosynthèse des composés phénolique..... | 42 |
| III.3.3.3.1. Voie du shikimate..... | 42 |
| III.3.3.3.2. Voie des phénylpropanoïdes..... | 43 |
| III.3.4. Composés azotés..... | 44 |
| III.3.4.1. Définition..... | 44 |
| III.3.4.2. Classification..... | 44 |
| III.3.4.2.1. Alcaloïdes..... | 44 |
| III.3.4.3. Propriétés thérapeutique..... | 46 |
| III.3.5. Composés terpéniques..... | 47 |
| III.3.5.1. Définition..... | 47 |
| III.3.5.2. Classification..... | 47 |
| III.3.5.3. Application dans diverse domaine..... | 49 |
| Références..... | 50 |
| PARTIE EXPERIMENTALE | |
| Chapitre IV : Matériels et méthodes | |
| IV.1. Introduction..... | 57 |
| IV.2. Matériel végétal..... | 57 |
| IV.2.1. Présentation des espèces étudiées..... | 57 |
| IV.2.2. Présentation de la région d'étude..... | 58 |

| | |
|---|----|
| IV.2.3. Collecte et identification botanique..... | 59 |
| IV.2.4. Préparation des échantillons..... | 60 |
| IV.3. Méthodes d'extraction..... | 60 |
| IV.3.1. Extraction par macération..... | 60 |
| IV.3.2. Extraction par ultrasons..... | 60 |
| IV.3.3. Extraction par Soxhlet..... | 61 |
| IV.3.4. Rendement d'extraction..... | 62 |
| IV.3.5. Préparation des échantillons pour les analyses..... | 62 |
| IV.4. Analyse phytochimique..... | 62 |
| IV.4.1. Criblage phytochimique..... | 62 |
| IV.4.1.1. Test des flavonoides..... | 63 |
| IV.4.1.2. Test des tanins..... | 63 |
| IV.4.1.3. Test des saponines..... | 63 |
| IV.4.1.4. Test des coumarines..... | 63 |
| IV.4.1.5. Test des cardénolides..... | 64 |
| IV.4.1.6. Test des alcaloïdes..... | 64 |
| IV.4.1.7. Test des stérols et terpènes..... | 64 |
| IV.4.1.8. Test des lipides..... | 64 |
| IV.4.2. Dosage quantitatif..... | 65 |
| IV.4.2.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 65 |
| IV.4.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux..... | 65 |
| IV.4.3. Caractérisation des métabolites par LC-MS/MS..... | 66 |
| IV.4.3.1. Principe de l'analyse LC-MS/MS..... | 66 |
| IV.4.3.2. Protocole expérimental (UPLC-ESI-MS/MS) | 67 |
| IV.5. Activités biologiques..... | 69 |
| IV.5.1. Évaluation de l'activité antioxydante..... | 69 |
| IV.5.1.1. Piégeage du radical DPPH..... | 69 |
| IV.5.1.1.1. Principe..... | 69 |
| IV.5.1.1.2. Protocole..... | 69 |
| IV.5.1.2. Piégeage du radical ABTS..... | 69 |
| IV.5.1.2.1. Principe..... | 69 |
| IV.5.1.2.2. Protocole..... | 70 |
| IV.5.2. Évaluation de l'activité antidiabétique <i>in-vitro</i> | 70 |
| IV.5.2.1. Inhibition de l' α -amylase..... | 70 |
| IV.5.2.1.1. Principe..... | 70 |
| IV.5.2.1.2. Protocole..... | 70 |
| IV.5.2.2. Inhibition de l' α -glucosidase..... | 71 |
| IV.5.2.2.1. Principe..... | 71 |
| IV.5.2.2.2. Protocole..... | 71 |
| IV.5.3. Activité anti-Alzheimer — Inhibition de l'AChE et de la BChE..... | 71 |
| IV.5.3.1. Principe..... | 71 |
| IV.5.3.2. Protocole..... | 71 |
| IV.5.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 72 |
| IV.5.4.1. Principe..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| IV.5.4.2. Micro-organisme testés..... | 72 |
| IV.5.4.3. Protocole..... | 72 |
| IV.5.5. Évaluation du potentiel inhibiteur de la formation de biofilm..... | 73 |
| IV.5.5.1. Principe | 73 |
| IV.5.5.2. Micro-organismes testés..... | 73 |
| IV.5.5.3. Protocole..... | 73 |
| IV.5.6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro..... | 74 |
| IV.5.6.1. Principe..... | 74 |
| IV.5.6.2. Réactifs utilisés..... | 74 |
| IV.5.6.3. Protocole..... | 75 |
| IV.5.7. Analyse statistique..... | 75 |
| Reference..... | 77 |
| Chapitre V : RÉSULTATS ET DISCUSSION | |
| V.1. Criblage phytochimique..... | 80 |
| V.2. Étude phytochimique et biologique des extraits de <i>B. insularis Moris</i> | 82 |
| V.2.1. Extraction par macération..... | 82 |
| V.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes..... | 82 |
| V.2.1.2. Analyse chromatographique par LC-MS..... | 84 |
| V.2.1.3. Activités antioxydante..... | 86 |
| V.2.1.4. Activité inhibition d'enzyme..... | 87 |
| V.2.2. Extraction par ultrasons..... | 90 |
| V.2.2.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes..... | 90 |
| V.2.2.2. Activité antioxydante..... | 92 |
| V.2.3. Extraction pas Soxhlet..... | 93 |
| V.2.3.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes..... | 93 |
| V.2.3.2. Activités anti-oxydante..... | 95 |
| V. 3. Étude phytochimique et biologique des extraits de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> | 96 |
| V.3.1. Extraction par macération..... | 96 |
| V.3.1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes..... | 96 |
| V.3.1.2. Analyse chromatographique par LC-MS..... | 98 |
| V.3.1.3. Activités anti-oxydante..... | 100 |
| V.3.2. Extraction par ultrasons..... | 101 |
| V.3.2.1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes..... | 101 |
| V.3.2.2. Analyse chromatographique par LC-MS..... | 103 |
| V.3.2.3. Activités anti-oxydante..... | 105 |
| V.3.2.4. Activité anti-microbienne..... | 106 |
| V.3.2.5. Inhibition de la formation de biofilm..... | 108 |
| V.3.2.6. Activité anti-inflammatoire..... | 109 |
| V.3.3. Extraction par sohxlet..... | 110 |
| V.3.3.1. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes..... | 110 |
| V.3.3.2. Activités antioxydante..... | 112 |
| Références..... | 114 |

| | |
|--|-----|
| Conclusion et perspectives..... | 121 |
| Annexe | 123 |
| | |

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير قطبية المذيب على جودة المستخلصات الناتجة من نباتين مستوطنين في شرق الجزائر
(*Brassica insularis* Moris; *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*)

من خلال تحليل تركيبتهما الفيتوكيميائية وخصائصهما البيولوجية. تم تطبيق ثلاث تقنيات استخلاص (النقع، الامواج فوق الصوتية والسوكسليه)، باستخدام مذيبات ذات قطبيات متفاوتة متغيرة.

تشير النتائج الى أن قطبية المذيب تشكل عاملاً أساسياً يؤثر على تركيب المستخلصات وخصائصها البيولوجية. وقد تميزت بعض التوليفات بين الطرق والمذيبات بتركيز أعلى من المركبات الفينولية وفعالية أكبر في الأنشطة البيولوجية (مضادة للسكري، مضادة لمرض الزهايمر، المضادة للالتهابات، والمضاد للميكروبات).

علاوة على ذلك، أكدت اختبارات مضادات الأكسدة

(DPPH و ABTS))

التأثير الكبير لاختيار المذيب على القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات. علاوة على ذلك، وُفرت تقنية

(LC-MS)

نظرة معمّقة على التركيب الفيتوكيميائي للمستخلصات، مما سمح بتحديد وتصنيف العديد من المستقلبات الثانوية، لا سيما المركبات الفينولية. كما كشفت عن تباينات ملحوظة، نوعية وكمية، مرتبطة بقطبية المذيب المستخدم وبطريقة الاستخلاص المعتمدة.

الكلمات المفتاحية: النقع; الموجات فوق الصوتية; السوكسليه; الأنشطة البيولوجية;

Brassica insularis Moris; *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* LCMS

Abstract

This study examines the influence of solvent polarity on the quality of extracts obtained from two endemic plants of eastern Algeria (*Brassica insularis Moris* and *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*), through the analysis of their phytochemical profile and biological properties. Three extraction techniques were applied (maceration, ultrasound, and Soxhlet) using solvents with varying polarities. The results indicate that the polarity of the solvent is an essential factor influencing both the composition of the extracts and their biological properties. Certain combinations of methods/solvents stood out due to a higher concentration of phenolic compounds and increased effectiveness in activities (anti-diabetic, anti-Alzheimer, anti-inflammatory, and anti-microbial activity). Moreover, antioxidant tests (DPPH, ABTS) confirmed the significant impact of solvent choice on the antioxidant potential of the extracts. Moreover, LC-MS analysis provided an in-depth overview of the phytochemical composition of the extracts, allowing for the identification and characterization of various secondary metabolites, particularly phenolic compounds. It also revealed significant variations, both qualitative and quantitative, related to the polarity of the solvents used and the extraction techniques applied.

Keywords : *Brassica insularis Moris*; *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*; maceration; ultrasound; Soxhlet; biological activities; LC-MS.

Résumé

Cette étude examine l'influence de la polarité du solvant sur la qualité des extraits obtenus à partir de deux plantes endémiques de l'est algérien (*Brassica insularis* Moris et *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*), à travers l'analyse de leur profil phytochimique et de leurs propriétés biologiques. Trois techniques d'extraction ont été appliquées (macération, ultrasons et Soxhlet) à l'aide de solvants présentant des polarités variables. Les résultats indiquent que la polarité du solvant constitue un facteur essentiel influençant à la fois la composition des extraits et leurs propriétés biologiques. Certaines associations méthodes/solvants se sont distinguées par une meilleure concentration en composés phénoliques et par une efficacité accrue dans les activités (activité anti-diabétique, anti- Alzheimer, anti-inflammatoire et anti-microbienne). De plus, les tests antioxydants (DPPH, ABTS) ont confirmé l'impact significatif du choix du solvant sur le potentiel antioxydant des extraits. Par ailleurs, l'analyse LC-MS a fourni un aperçu approfondi de la composition phytochimique des extraits, permettant d'identifier et de caractériser divers métabolites secondaires, en particulier les composés phénoliques. Elle a également révélé des variations significatives, tant qualitatives que quantitatives, liées à la polarité des solvants utilisés et aux techniques d'extraction appliquées.

Mots clés : *Brassica insularis* Moris ; *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* ; macération ; ultrasons ; Soxhlet ; activités biologiques ; LC-MS.

Abréviations

| | |
|--------------------|---|
| ABTS | (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| APG IV | Angiosperm Phylogeny Group IV |
| B. | Brassica |
| CHS | Chalcone synthase |
| COX-2 | Cyclooxygénase-2 |
| DNSA | Acide 3,5-dinitrosalicylique |
| DOSY | Spectroscopie ordonnée de diffusion |
| DPPH | (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) |
| EAU | Extraction assistée par ultrasons |
| EAG/mg MS | Equivalent acide galique par mg de matière sèche |
| EAM | Extraction assistée par micro-ondes |
| EC/mg | Equivalent catéchine |
| EDTA | Acide éthylènediaminetétraacétique |
| HPLC | Chromatographie liquide à haute performance |
| IC ₅₀ | Concentration inhibant 50 % |
| IR | Spectroscopie infrarouge |
| LC-MS | Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse |
| LLE | Extraction liquide-liquide |
| MAPK | Protéine kinase activée par les mitogènes |
| MND | Maladies neurodégénératives |
| NF- κ B | Facteur nucléaire kappa B |
| PAL | Phénylalanine ammoniac-lyase |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| SARS-CoV-2 | Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère de type 2 |
| SC-CO ₂ | Dioxyde de carbone supercritique |
| SFE : | Extraction par fluides supercritiques |
| UHPLC | Chromatographie liquide à ultra haute performance |
| UPLC-ESI-MS/MS | Chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem |

| Liste des figures | Page |
|--|------|
| Figure I. 1. <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> | 13 |
| Figure I. 2. <i>Brassica insularis Moris</i> | 14 |
| Figure II. 1. Principe de l'extraction assistée par ultrasons (UAE) | 21 |
| Figure II. 2. Représentation de l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) | 22 |
| Figure II. 3. Schéma d'un extracteur à fluide supercritique (SFE) | 23 |
| Figure III.1. Noyau flavane | 32 |
| Figure III.2. Structure d'acides benzoïques avec substituants | 35 |
| Figure III.3. Structure d'acide cinnamique avec substituants | 36 |
| Figure III.4. Structure de Sésaminol | 38 |
| Figure III.5. Structure de Pinoresinol | 38 |
| Figure III.6. Structure de Matairesinol | 38 |
| Figure III.7. Biosynthèse des composés phénoliques par voie shikimate | 43 |
| Figure III.8. Biosynthèse des composés phénoliques par voie phénylpropanoïdes | 44 |
| Figure III.9. Structure de nicotine | 45 |
| Figure III.10. Structure de caféine | 45 |
| Figure III.11. Structure de l'adrénaline | 46 |
| Figure III.12. Structure de l'isoprène | 47 |
| Figure IV.1. Situation géographique de la région d'étude. | 59 |
| Figure V.1. Rendement d'extraction des extrait obtenus par macération de la partie aérienne de <i>Brassica insularis Moris</i> . | 82 |
| Figure V.2. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extrait obtenus par macération de la partie aérienne de <i>Brassica insularis Moris</i> . | 82 |
| Figure V.3. Taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits méthanolique et éthanolique obtenus par extraction ultrasonique de <i>Brassica insularis Moris</i> . | 90 |
| Figure V.4. Taux de rendement des extraits obtenus par extraction Soxhlet de <i>Brassica insularis Moris</i> . | 93 |
| Figure V.5. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par extraction Soxhlet de <i>Brassica insularis</i> | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figure V.6. Taux de rendement des extraits obtenus par extraction macération de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> | 96 |
| Figure V.7. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par extraction macération de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> | 97 |
| Figure V.8. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> par extraction ultrasonique | 102 |
| Figure V.9. Inhibition de la formation de biofilm | 108 |
| Figure V.10. Contenu en polyphénols et flavonoïdes des fractions extraites de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> | 110 |

| Liste des tableaux | Page |
|--|-------------|
| Tableau I. 1. Classification de la famille des <i>Brassicaceae</i> | 5 |
| Tableau I. 2. Classification de genre des <i>Brassica</i> . | 8 |
| Tableau I. 3. Classification botanique de <i>Brassica fruticulosa</i> Cirillo subsp. <i>Numidica</i> | 11 |
| Tableau I. 4. classification botanique de <i>Brassica insularis</i> Moris | 13 |
| Tableau III.1. Classification structurale et chimique des flavonoïdes | 33 |
| Tableau III.2. Dérivés d'acide benzoïque | 36 |
| Tableau III.3. Dérivés d'acides cinnamique | 36 |
| Tableau III.4. Substituants et dérivés glycosylés des coumarines (1-Benzopyrane-2-one). | 39 |
| Tableau III.5. Classification structurale des Coumarines complexe | 39 |
| Tableau III.6. Classification des Composés terpéniques | 48 |
| Tableau IV.1. Protocole d'extraction par Soxhlet de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> . | 61 |
| Tableau IV.2. Protocole d'extraction par Soxhlet de <i>Brassica insularis</i> Moris. | 61 |
| Tableau IV.3. Conditions du gradient d'élution | 67 |
| Tableau V.1. screening phytochimique des deux plantes étudiées | 80 |
| Tableau V.2. Rendement et taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par macération de la partie aérienne de <i>Brassica insularis</i> Moris. | 82 |
| Tableau V.3. Composition chimique des extraits éthanoliques et acétate d'éthyle de <i>Brassica insularis</i> Moris déterminée par LC-MS. | 84 |
| Tableau V.4. Activité antioxydante des extraits obtenues par macération de <i>Brassica insularis</i> Moris évaluée par les tests DPPH et ABTS. | 86 |
| Tableau V.5. Évaluation in vitro de l'activité anti-cholinestérase et anti-diabétique des extraits par macération de <i>Brassica insularis</i> Moris | 87 |
| Tableau V.6. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de <i>Brassica insularis</i> Moris obtenus par extraction ultrasonique | 90 |
| Tableau V.7. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de <i>Brassica insularis</i> Moris obtenus par extraction ultrasonique | 92 |
| Tableau V.8. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de <i>Brassica insularis</i> Moris obtenus par extraction Soxhlet. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Tableau V.9. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de <i>Brassica insularis</i> Moris obtenus par extraction Soxhlet | 95 |
| Tableau V.10. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> obtenus par macération | 96 |
| Tableau V.11. Composition chimique des extraits éthanoliques et acétate d'éthyle de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> déterminée par LC-MS | 98 |
| Tableau V.12. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> obtenus par macération. | 100 |
| Tableau V.13. Évaluation du rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> obtenus par extraction ultrasonique. | 101 |
| Tableau V.14. Composition chimique des extraits éthanoliques et acétate d'éthyle de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> déterminée par LC-MS. | 103 |
| Tableau V.15. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits obtenus par extraction ultrasonique de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> . | 106 |
| Tableau V.16. Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et éthanolique de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> en comparant avec les traitements. | 107 |
| Tableau V.17. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) par la molécule et le diclofénac sodique standard (acide 2-éthanoïque). | 109 |
| Tableau V.18. Rendement d'extraction et teneur en composés phénoliques et flavonoïdes des extraits Soxhlet de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> . | 110 |
| Tableau V.19. Activité antioxydante des extraits Soxhlet de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> évaluée par les tests DPPH et ABTS. | 112 |

Introduction

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies l'humanité est confrontée à une recrudescence de maladie chronique et dégénérative, telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, ainsi que diverse affections inflammatoires et infectieuses.

Le diabète de type 2 qualifié de maladie de siècle, touche aujourd'hui plus de 400 millions de personnes dans le monde, et ce chiffre pourrait atteindre 700 millions d'ici 2045 selon la Fédération Internationale du Diabète [1]. De même, la maladie d'Alzheimer, principale forme de démences neurodégénératives, engendre une charge sociale et économique croissante [2]. Les maladies inflammatoires regroupent, quant à elle, un large éventail de pathologies chroniques ou aiguës, telles que les arthrites, les maladies auto-immunes, les troubles respiratoires ou encore certaines affections cardiovasculaires [3]. Par ailleurs, l'émergence de résistances microbiennes aux antibiotiques classiques constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique, reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé [4].

Ces pathologies représentent un véritable défi en raison de la complexité de leur prise en charge et du coût élevé des traitements existants. Dans ce contexte, l'exploitation de nouvelles sources naturelles de biomolécules actives apparaît comme une voie prometteuse pour le développement d'approches thérapeutiques alternatives.

La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques est devenue une priorité. En effet, si les traitements conventionnels offrent des résultats notables, ils présentent souvent des limites : coûts élevés, effets secondaires, efficacité parfois partielle, et surtout, apparition de résistances. C'est pourquoi la recherche pharmaceutique moderne s'intéresse de plus en plus aux métabolites secondaires d'origine végétale, qui constituent une source inépuisable de biomolécules [5].

Les plante, grâce a la diversité et la spécificité de leurs métabolites secondaires, ont toujours représenté une ressource privilégiée pour la médecine traditionnelle et moderne [6]. Ainsi, l'étude phytochimique et biologique des espèces végétales constitue un axe de recherche stratégique, susceptible de déboucher sur la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, voire de futurs médicaments.

Introduction

L'Algérie, grâce à la richesse floristique et à la diversité de ses écosystèmes méditerranéens, constitue un réservoir exceptionnel de plantes endémiques à fort potentiel médicinal [7]. Le nord-est algérien abrite en particulier plusieurs espèces de Brassicaceae qui, bien qu'elles sont utilisées localement dans la médecine traditionnelle, n'ont pas encore fait l'objet d'investigation scientifique approfondies. Leur valorisation représente donc non seulement une nécessité académique, mais aussi une opportunité de préserver et d'exploiter durablement le patrimoine végétal national.

Notre travail s'inscrit dans cette dynamique, en s'intéressant à l'étude phytochimique de deux espèces endémiques de la famille des Brassicaceae (*Brassica insularis* Moris et *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*), avec pour objectif d'identifier leurs profils chimiques et d'explorer certaines de leurs propriétés pharmacologiques potentielles.

Le manuscrit est structuré en deux grandes parties :

- ◆ La première partie est consacrée à une étude bibliographique relative aux espèces végétales choisies, aux métabolites secondaires d'intérêt, ainsi qu'aux différentes méthodes d'extraction et techniques d'analyse utilisées.
- ◆ La seconde partie est dédiée à l'étude expérimentale. Elle décrit le matériel et les méthodes employées pour l'analyse phytochimique et biologique des deux plantes. Elle expose les résultats obtenus, les interprète, et s'achève par une conclusion et perspectives.

Introduction

Référence :

- 1- Patel, J. (2023). Diabetes, A global epidemic. SACAD: John Heinrichs Scholarly and Creative Activity Days, 2023(2023), 103.
- 2- Ni, H. (2024). Review of Alzheimer's disease and treatments. Theoretical and Natural Science, 65(1), 35–40.
- 3- Villalba, N., & Wellman, G. C. (2022). Inflammation and cardiovascular disease: Vascular responses, mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Physiology*, 13, 995175.
- 4- Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial resistance (AMR). *British journal of biomedical science*, 80, 11387.
- 5- K, S., Sonkar, R. M., Gade, P., & Bhatt, P. (2023). Plant secondary metabolites: Extraction, screening, analysis and their bioactivity. *International Journal of Herbal Medicine*, 11(2), 01–17.
- 6- El Zayat, M. (2020). Proximate composition, mineral content and secondary metabolites of three medicinal wild Fagonia species. *Food Biology*.
- 7- Benaiche, H., Bouredja, N., & Alioua, A. (2019). Ethnobotanic study of medicinal plants used in Oran, Algeria. *Bangladesh Journal of Botany*, 48(4), 1163–1173.

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les

espèces étudiées

I. 1. Introduction :

La famille des *Brassicaceae*, connue sous le nom de Crucifères, représente l'un des groupes de plantes à fleurs les plus variés à l'échelle mondiale, comptant environ de 3700 espèces réparties dans environ 370 genres [1,2]. Ces végétaux sont largement répandus dans les zones tempérées [3], et jouent un rôle significatif à la fois dans la flore naturelle et dans le secteur agricole [4]. En réalité, cette famille comprend diverses espèces qui sont cultivées pour l'alimentation humaine et animale, la production d'huile, ainsi que pour des applications médicinales [5].

Le genre *Brassica* occupe une place prépondérante au sein de cette famille, tant d'un point de vue économique que scientifique [6]. Il englobe des espèces largement cultivées telles que le chou (*B. oleracea*), le navet (*B. rapa*) et le colza (*B. napus*), dont les utilisations sont diverses et bien documentées [7]. En plus des variétés agricoles, le genre inclut des taxons sauvages et spécifiques à certaines régions méditerranéennes, qui sont souvent endémiques et suscitent un intérêt écologique croissant en raison de leur adaptation aux conditions environnementales extrêmes [8].

Dans ce contexte, deux taxons spécifiques méritent d'être soulignés : *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*, qui se développe de façon limitée sur les falaises calcaires du Cap de Garde à Annaba (Algérie) [9], et *Brassica insularis* Moris, une espèce relictuelle et endémique de certaines régions côtières et insulaires de la Méditerranée occidentale, notamment en Sardaigne et en Corse [10]. Ces deux espèces végétales, bien que de genre similaire, se différencient par leur rareté, leur distribution géographique limitée et leur capacité à s'adapter à des conditions écologiques spécifiques telles que la sécheresse, les sols calcaires appauvris, les vents marins et une exposition intense au soleil.

I. 2. Présentation botanique de la famille des Brassicaceae :

I. 2.1. Classification botanique :

La famille des *Brassicaceae*, communément appelée Cruciferae, est classée dans l'ordre des Brassicales comme il montre (Tableau I. 1). Elle est classée dans la classification botanique de la manière suivante [11]:

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

Tableau I. 1. Classification de la famille des *Brassicaceae*

| | |
|---------|--|
| Règne | Plantae |
| Clade | Angiospermes (Toutes les plantes à fleurs descendent d'un ancêtre commun). |
| Clade | Eudicots (Parmi les Angiospermes, certaines plantes possèdent deux cotylédons et une structure particulière des grains de pollen). |
| Ordre | Brassicales |
| Famille | <i>Brassicaceae</i> |
| Genre | <i>Brassica</i> L |

NB:

- ✓ Angiospermes (Toutes les plantes à fleurs descendent d'un ancêtre commun).
- ✓ Eudicots (Parmi les Angiospermes, certaines plantes possèdent deux cotylédons et une structure particulière des grains de pollen).
- ✓ Brassicales (C'est un ordre qui inclut les familles comme les *Brassicaceae*, mais aussi les *Capparaceae*, *Cleomaceae*, etc).
- ✓ *Brassicaceae* Burnett (syn / synonyme *Cruciferae*) Le nom *Brassicaceae* a été formellement proposé par le botaniste Gilbert Thomas Burnett en 1835.

I. 2.2. Caractéristiques morphologiques générales :

La plupart des *Brassicaceae* sont des plantes herbacées, pouvant être annuelles, bisannuelles ou vivaces, et exceptionnellement ligneuses. Ces plantes présentent des propriétés botaniques bien définies [12] :

- ✓ **Feuilles** : habituellement disposées de manière alternée, elles peuvent être simples ou lobées, et sont dépourvues de stipules [13].
- ✓ **Fleurs** : disposées de manière régulière en grappes, avec un arrangement distinctif de pétales en forme cruciforme [13].
- ✓ **Fruits** : Généralement, il s'agit d'une silique (fruit sec allongé) ou d'une silicule (silique courte) [13].
- ✓ **Graines** : dépourvues d'endosperme et renferment un embryon riche en huile [13].

I. 2. 3. Répartition géographique et diversité :

La famille des *Brassicaceae* est largement répandue à l'échelle mondiale, se trouvant sur tous les continents, particulièrement concentrée dans les régions méditerranéennes, tempérées et arides. D'après les estimations les plus récentes, les espèces de cette famille sont nombreuses, parmi lesquelles on trouve celles qui sont endémiques à des régions spécifiques [14,15].

Parmi les genres les plus connus, on retrouve :

- ✓ *Brassica* (chou, colza, navet).
- ✓ *Arabidopsis* (modèle en génétique végétale).
- ✓ *Raphanus* (radis).
- ✓ *Sinapis* (moutarde blanche).
- ✓ *Alyssum*, *Erysimum*, et bien d'autres.

I. 2. 4. Intérêt économique, écologique et scientifique :

La famille des *Brassicaceae* présente un intérêt remarquable à plusieurs niveaux. Notamment sur le plan économique, écologique, médicale et scientifiquement. Cette polyvalence s'explique par la richesse morphologique, physiologique et biochimique des espèces qui la composent.

I. 2. 4. 1. Intérêt économique et agronomique :

La famille des *Brassicaceae* englobe diverses espèces de plantes cultivées d'importance majeure à l'échelle mondiale. Parmi les espèces les plus célèbres, on peut citer le chou (*B. oleracea*), le navet et le chou chinois (*B. rapa*), le colza (*B. napus*), la moutarde (*Sinapis alba*, *B. juncea*) et le radis (*Raphanus sativus*). Ces espèces sont élevées en raison de leur haute valeur nutritionnelle, comprenant une richesse en fibres, minéraux, vitamines C et vitamine K, ainsi que pour leur utilisation dans l'industrie (comme l'huile de colza et les biocarburants), et leur rôle significatif dans la cuisine traditionnelle de diverses régions du globe [16].

Par ailleurs, des espèces hybrides sont spécifiquement sélectionnées en vue d'accroître la résistance aux maladies, la tolérance au froid et le rendement agricole.

I. 2. 4. 2. Intérêt écologique :

Plusieurs espèces appartenant à la famille des Brassicaceae présentent des propriétés physiologiques remarquables, notamment leur aptitude à résister aux stress d'origine biotique (attaques de pathogènes, insectes) et abiotique (sécheresse, salinité, pollution), renforçant ainsi leur capacité d'adaptation à des milieux environnementaux variés [17].

Parmi ces espèces de *Brassicaceae*, dont *B. juncea* et *B. napus*, sont largement étudiées pour leur capacité à accumuler des métaux lourds tels que le cadmium, le plomb et le zinc dans leurs tissus, sans présenter de symptômes apparents de phytotoxicité [18,19].

Cette caractéristique les classe parmi les plantes dites hyperaccumulatrices. Les mécanismes mis en jeu dans l'absorption et la tolérance aux métaux lourds incluent l'utilisation de transporteurs membranaires spécifiques, le stockage des éléments toxiques au sein de vacuoles foliaires, ainsi que l'intervention de chélateurs tels que l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), qui facilitent la complexation et le transport des métaux au sein de la plante [18, 20].

I. 2. 4. 3. Intérêt en santé humaine :

Les *Brassicaceae* constituent une source significative de glucosinolates, qui sont des composés soufrés dotés de propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticarcinogènes. Lorsqu'ils subissent une hydrolyse (par mastication ou cuisson), ces composés libèrent des isothiocyanates, lesquels ont démontré un effet protecteur contre certains types de cancers, en particulier ceux du côlon, du poumon et de l'estomac [5].

Les études en nutrition préventive accordent une attention croissante aux crucifères en tant qu'aliments fonctionnels, situés à l'interface entre l'alimentation et la médecine.

I. 2. 4. 4. Intérêt scientifique et génétique :

Scientifiquement, il est reconnu que le matériel génétique naturel des Brassicacées joue un rôle crucial dans l'induction de la stérilité mâle cytoplasmique afin de produire des graines hybrides, tout en servant de base pour les études en biologie moderne, notamment en génétique

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

et en résistance aux maladies [16].

De nombreuses espèces de Brassicaceae sont également utilisées pour étudier :

- ✓ L'adaptation au stress hydrique.
- ✓ La résistance aux pathogènes.
- ✓ La biosynthèse des métabolites secondaires.

I. 3. Le genre *Brassica* :

I. 3. 1. Classification botanique :

Le genre *Brassica* fait partie de la famille des *Brassicaceae* (**Tableau I. 2.**), au sein de l'ordre des Brassicales. Il comprend approximativement 37 espèces officiellement identifiées, y compris des variétés sauvages et cultivées largement examinées pour leur pertinence en termes d'agriculture, d'alimentation et de diversité génétique [3].

Classification botanique selon APG IV (Angiosperm Phylogeny Group IV) : C'est la quatrième version d'un système de classification botanique moderne basé sur la phylogénie moléculaire des plantes à fleurs (angiospermes) :

Tableau I. 2. Classification de genre des Brassica.

| | |
|----------|---------------------------|
| Règne | Plantae |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordre | Brassicales |
| Famille | Brassicaceae Burnett [10] |
| Genre | <i>Brassica</i> L |

I. 3. 2. Origine et répartition :

Les espèces appartenant au genre *Brassica* proviennent principalement de la région méditerranéenne, du Proche-Orient et de l'Europe de l'Ouest [22]. Cependant, en raison de leur valeur agricole, de nombreuses espèces ont été introduites et naturalisées à l'échelle mondiale, notamment en Asie, en Amérique et en Afrique du Nord.

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

Certaines espèces présentent une endémicité stricte, étant limitées à des écosystèmes spécifiques, ce qui les rend particulièrement précieuses en termes de biodiversité et de préservation génétique [23].

I. 3. 3. Caractéristiques morphologiques générales :

Les espèces appartenant au genre *Brassica* se distinguent par une diversité morphologique importante, bien qu'elles partagent des caractéristiques communes telles que des tiges généralement dressées, des feuilles alternes aux formes variées (lobées, dentées, parfois pubescentes) et des fleurs tétramères jaunes ou blanches, typiques des *Brassicaceae*. Les fruits sont des capsules renfermant plusieurs graines riches en huile. Selon l'espèce et les conditions climatiques, le cycle de vie des plantes peut être annuel, bisannuel ou vivace. Ces attributs confèrent au genre une grande capacité d'adaptation, en particulier dans les environnements tempérés et semi-arides [14].

I. 3. 4. Intérêt agronomique et économique :

Le genre *Brassica* constitue une ressource majeure dans l'agriculture mondiale en raison de la diversité et de l'importance économique de ses espèces cultivées. Parmi celles-ci, *Brassica oleracea* regroupe des légumes consommés pour leurs feuilles et inflorescences, tels que le chou, le brocoli, le chou-fleur et le chou de Bruxelles, tandis que *Brassica napus* est principalement cultivé pour ses graines oléagineuses, fournissant une huile alimentaire et industrielle essentielle. *Brassica rapa* inclut des légumes racines et feuilles comme le navet et le chou chinois, et les espèces *B. juncea* et *B. nigra* sont exploitées pour leurs graines utilisées comme épices et sources d'huile [24, 25].

Ces différentes espèces sont valorisées pour diverses parties de la plante (feuilles, inflorescences, racines ou graines) répondant à des usages alimentaires, fourragers et industriels. Par ailleurs, les espèces sauvages du genre *Brassica* suscitent un intérêt croissant en recherche agronomique, notamment pour l'identification de caractères naturels de résistance aux stress abiotiques (sécheresse, froid) et biotiques (ravageurs, pathogènes), offrant un potentiel important pour l'amélioration génétique des cultures [26, 27]. Ainsi, *Brassica* représente un levier essentiel pour le développement durable de l'agriculture, par la diversification des

productions et l'intégration de ressources génétiques résistantes.

I. 3. 5. Enjeux écologiques et de conservation :

Le genre *Brassica* regroupe diverses espèces sauvages, souvent localisées ou endémiques, qui revêtent une importance environnementale et génétique significative. Ces espèces sont fréquemment limitées à des milieux naturels spécifiques, en particulier dans les régions méditerranéennes, et font actuellement face à des défis écologiques diverses [28].

Parmi celles-ci, on distingue :

- ◆ *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*, endémique du Nord-Est algérien, observée notamment au Cap de Garde à Annaba, sur des substrats rocheux littoraux [23].
- ◆ *Brassica insularis Moris*, espèce rare et vulnérable, présente dans les îles méditerranéennes (Sardaigne, Corse) ainsi que sur des falaises côtières d'Algérie, comme celles de la Voile Noire à Annaba [29].

Ces espèces sont soumises à plusieurs menaces écologiques :

- ✓ La destruction de leurs habitats (urbanisation, érosion, aménagement côtier) [28].
- ✓ La pollution des sols et de l'air [23].
- ✓ La compétition avec des espèces exotiques introduites [29].

Leur conservation est une priorité dans une optique de préservation de la biodiversité méditerranéenne [23, 28]. Elles constituent un réservoir de gènes utile pour :

- ✓ Améliorer la résistance des cultures aux stress biotiques et abiotiques.
- ✓ Assurer une diversité génétique durable.
- ✓ Anticiper les impacts du changement climatique.

I. 4. Présentation de Curciferae *Brassica fruticulosa* Cirillo subsp. *Numidica* :

I. 4. 1. Classification botanique :

Tableau I. 3. Classification botanique de *Brassica fruticulosa* Cirillo subsp. *Numidica* [30].

| | |
|-------------|--|
| Règne | Planatae |
| Division | Angiospermes (Magnoliophyta) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotylédones) |
| Ordre | Brassicales |
| Famille | Brassicaceae |
| Genre | Brassica |
| Espèce | <i>Brassica fruticulosa</i> Cirillo |
| Sous-espèce | <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> . |

I. 4. 2. Généralités et intérêt :

Brassica fruticulosa subsp. *Numidica* est une sous-espèce endémique du nord-est de l'Algérie, principalement localisée sur des substrats rocheux littoraux, notamment au niveau du Cap de Garde à Annaba [30]. Cette plante sauvage appartient au genre *Brassica*, reconnu pour sa richesse génétique et son importance agronomique à l'échelle mondiale [24].

Cette sous-espèce se distingue par son adaptation aux conditions environnementales méditerranéennes, caractérisées par une forte variabilité climatique, une salinité élevée et une exposition aux vents marins [31]. Ces adaptations lui confèrent un intérêt particulier en tant que source potentielle de gènes de résistance aux stress abiotiques, notamment la sécheresse et la salinité, ainsi qu'aux stress biotiques (pathogènes et ravageurs).

L'intérêt agronomique de *B. fruticulosa* subsp. *Numidica* réside dans le fait qu'elle constitue un réservoir génétique précieux pour les programmes d'amélioration des espèces cultivées du genre *Brassica* [26]. La diversité génétique présente dans cette sous-espèce peut être exploitée pour développer des variétés plus résistantes aux conditions environnementales défavorables, contribuant ainsi à la durabilité et à la résilience des systèmes agricoles face aux changements climatiques [27].

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

Par ailleurs, cette sous-espèce est soumise à des menaces écologiques importantes, telles que la destruction de son habitat naturel liée à l'urbanisation, l'érosion côtière et la pollution [32]. En conséquence, la conservation de *B. fruticulosa subsp. Numidica* est considérée comme une priorité pour préserver la biodiversité méditerranéenne et maintenir le potentiel génétique qu'elle représente [33].

I. 4. 3. Description morphologique :

La sous-espece *Brassica fruticulosa subsp. Numidica* se distingue par [30] :

- ✓ **Tige** : dressée, ramifiée, généralement pubescente ou légèrement poilue, pouvant atteindre environ 30 à 70 cm de hauteur.
- ✓ **Feuilles** : alternes, profondément découpées, avec des lobes étroits et allongés. Les feuilles basales forment une rosette tandis que les feuilles caulinaires deviennent progressivement plus petites et moins découpées vers le sommet. La face inférieure des feuilles est souvent pubescente.
- ✓ **Fleurs** : typiques de la famille des Brassicaceae, avec quatre pétales jaunes disposés en croix (fleur cruciforme), d'environ 1 à 1,5 cm de diamètre. Les fleurs sont regroupées en grappes terminales.
- ✓ **Fruits** : siliques allongées, étroites, dressées, contenant plusieurs graines disposées en rangée. Les siliques peuvent mesurer entre 3 et 6 cm de longueur.
- ✓ **Racines** : pivotantes, bien ancrées dans les substrats rocheux, ce qui favorise son adaptation aux sols pauvres et à la sécheresse.



Figure I. 1. *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*

I. 5. Présentation de *Brassica insularis* Moris :

I. 5. 1. Classification botanique :

Tableau I. 4. Classification botanique de *Brassica insularis* Moris [30]

| | |
|----------|---------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Division | Angiospermes (Magnoliophyta) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotylédones) |
| Ordre | Brassicales |
| Famille | Brassicaceae |
| Genre | <i>Brassica</i> |
| Espèce | <i>Brassica insularis</i> Moris |

I. 5. 2. Présentation générale :

Brassica insularis Moris est une espèce rare et endémique du genre *Brassica*, appartenant à la famille des Brassicaceae. Elle est particulièrement localisée dans les zones côtières rocheuses du bassin méditerranéen occidental, notamment en Sardaigne, en Corse, ainsi que sur les falaises maritimes d'Annaba (Algérie), telles que celles du site naturel de la Voile Noire [30]. Elle a été initialement décrite par le botaniste Giuseppe Giacinto Moris en 1827, à partir de

spécimens sardes.



Figure I. 2. *Brassica insularis* Moris

I .5. 3. Caractéristiques morphologiques :

Brassica insularis se caractérise par un port généralement compact à étalé, adapté aux environnements ventés et exposés. Elle présente :

- ✓ Des feuilles basales densément regroupées, épaisses, parfois pubescentes.
- ✓ Des tiges florifères courtes, ascendantes et souvent ramifiées.
- ✓ Des fleurs jaunes à quatre pétales, caractéristiques des Brassicaceae.
- ✓ Des fruits en silique contenant des graines riches en composés soufrés.

Ces traits morphologiques traduisent une adaptation à des conditions de sécheresse, de vent marin, et à des sols pauvres [23].

I .5. 4. Répartition et habitat :

L'espèce est localisée dans des habitats fragmentés et restreints, notamment sur des falaises et îlots côtiers. En Algérie, elle est observée sur les falaises de la Voile Noire à Annaba. Elle pousse sur des substrats rocheux exposés au vent, souvent en conditions xériques, avec une végétation typiquement haloxérophile et méditerranéenne

Références :

- 1- Warwick, S. I., Francis, A., & Al-Shehbaz, I. A. (2006). Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2), 249–258.
- 2- Jalal, A., Oliveira, C. E. da S., Galindo, F. S., Rosa, P. A. L., Gato, I. M. B., Lima, B. H. de, & Teixeira Filho, M. C. M. (2023). Regulatory Mechanisms of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Nutrition against Abiotic Stresses in Brassicaceae Family. *Reproductive and Developmental Biology*, 13(1), 211.
- 3- Schweingruber, F. H. (2006). Anatomical Characteristics and Ecological Trends in the Xylem and Phloem of Brassicaceae and Resedaceae. *Iawa Journal*, 27(4), 419–442.
- 4- Anjum, N. A., Ahmad, I., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Umar, S., & Khan, N. A. (2012). *The Plant Family Brassicaceae*. Springer Netherlands.
- 5- Fahey, J. W. (2003). Brassicas: Characteristics and potential for health benefits. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 669–675.
- 6- Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2006). Editorial: Evolution and phylogeny of the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2), 81–83.
- 7- Warwick, S. I., & Francis, A. (2005). The biology of Canadian weeds. 132. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(4), 951–961.
- 8- Hammer, K., Gladis, T., Laghetti, G., & Pignone, D. (2013). The wild and the grown - remarks about the botanical classification of Brassica.
- 9- Quézel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome I. CNRS, Paris.
- 10- Mabberley, D. J. (2017). *Mabberley's Plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses* (4th ed.). Cambridge University Press.
- 11- Al-Shehbaz, I. A., O'Kane, S. L., & Price, R. A. (1999). Generic placement of species excluded from *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Novon*, 9(3), 296–307.
- 12- Anjum, N. A., Gill, S. S., Ahmad, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Umar, S., Khan, N. A., & Pereira, M. E. (2012). *The Plant Family Brassicaceae: An Introduction* (pp. 1–33). Springer, Dordrecht.
- 13- Demars, B. G., & Boerner, R. E. (1996). Vesicular arbuscular mycorrhizal development in the Brassicaceae in relation to plant life span. *Flora*, 191(2), 179–189.
- 14- Warwick, S. I., et al. (2006). Phylogeny of Brassicaceae based on chloroplast DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2-4), 89–120.
- 15- Al-Shehbaz, I. A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae).

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

Taxon, 61(5), 931–954.

16- Jabeen, N. (2020). Agricultural, Economic and Societal Importance of Brassicaceae Plants (pp. 45–128). Springer, Singapore.

17- Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology, 49(1), 643–668.

18- Dar, M. I., Khan, F. A., Rehman, F., Masoodi, A., Ansari, A. A., Varshney, D., Naushin, F., & Naikoo, M. I. (2015). Roles of Brassicaceae in Phytoremediation of Metals and Metalloids (pp. 201–215). Springer, Cham.

19- Roy, S., & Mondal, S. (2020). Brassicaceae Plants Response and Tolerance to Metal/Metalloid Toxicity (pp. 363–377). Springer, Singapore.

20- Kaur, P. (2016). Phytoremedial potential of selected Brassica species for the amelioration of cadmium contaminated soil under enhanced environment.

21- Warwick, S. I., & Francis, A. (2005). The biology of Canadian weeds. 132. Brassica napus L. and B. rapa L. Canadian Journal of Plant Science, 85(4), 951–961.

22- Hemingway, J. S. (1976). Biochemistry of mustard flavor. Journal of the Science of Food and Agriculture, 27(5), 395–407.

23- Velasco, L. et al. (2011). Wild Brassica species: Genetic resources for oilseed improvement. Euphytica, 180(1), 71–84.

24- Warwick, S. I., Legere, A., Simard, M. J., & James, T. K. (2009). Do Brassica weeds hybridize with their relatives ? Canadian Journal of Plant Science, 89(1), 329-350.

25- Kaur, G., Kumar, V., & Sharma, N. (2017). Mustard: An important oilseed crop of India — A review. Journal of Applied and Natural Science, 9(4), 2137-2147.

26- Brown, P. D., & Morra, M. J. (1997). Control of soilborne plant pests using glucosinolate-containing plants. Advances in Agronomy, 61, 167-231.

27- Kirkegaard, J. A., Gardner, P. A., Desmarchelier, J. M., & Angus, J. F. (1996). Biofumigation—using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. HortScience, 31(3), 401-405.

28- Lazaro, A. & Gómez Campo, C. (1993). Conservation of endemic Brassica species in the Mediterranean region. Biodiversity and Conservation, 2(5), 365–380.

29- Rossi, G. et al. (2001). Checklist and Red List of the flora of Italy. Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio.

30- Maire, R., & Weiller, C. (1953). Flore de l’Afrique du Nord (Vol. 1).

31- Khelifi, L., Benali, S., & Rahmani, M. (2016). Adaptation des plantes méditerranéennes aux contraintes abiotiques : cas de Brassica fruticulosa subsp. numidica. Revue des Sciences

Chapitre I : Généralité sur les espèces étudiées

Agronomiques, 8(3), 99-109.

32- Bensalem, H., & Bouazza, M. (2014). Impact de l'urbanisation sur la flore littorale algérienne. *Journal of Mediterranean Ecology*, 12, 45-57.

33- Médail, F., & Quézel, P. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 84(1), 112-127.

Chapitre II

Méthodes d'extraction et techniques d'analyses

II. 1. Introduction :

Les méthodes d'extraction et les techniques d'analyse des produits naturels sont des étapes essentielles lors de l'obtention des composés bioactifs utilisables dans les domaines scientifiques et industriels, en particulier dans les secteurs de la pharmacie, de l'agroalimentaire, du cosmétique et de la nutrition [1].

Les méthodes d'extraction se distinguent par une variété considérable, en fonction de la complexité des matrices végétales et des objectifs de recherche, allant des techniques traditionnelles aux technologies innovantes [2]. Ainsi que, une bonne connaissance des techniques d'extractions et d'analyses permet d'optimiser la quantité et la qualité des composés extraits tout en assurant des analyses fiables et reproductibles [3].

II. 2. Méthodes d'extraction conventionnelles :

II. 2. 1. Extraction par solvant :

II. 2. 1. 1. Macération :

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide simple qui consiste à introduire les matrices végétales dans un solvant afin d'extraire des composés bioactifs. Pailleteur, l'efficacité de cette méthode repose sur la solubilité des composés et leur diffusion dans le solvant. [4]

II. 2. 1. 2. Infusion :

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'une matière végétale [5], qui consiste à verser de l'eau chaude sur la matière végétale, puis à les laisser infuser de 10 à 15 min [6]. Ainsi que, elle permet d'extraire efficacement les composés hydrosolubles, tels que les polyphénols, les flavonoïdes et certaines huiles essentielles. Elle est couramment employée pour la préparation de tisanes, de décoctions et d'extraits liquides concentrés.

II. 2. 1. 3. Décoction :

La décoction est une méthode d'extraction adaptée aux matières végétales résistantes telles que les racines, les écorces et les graines [7,8], ainsi qu'aux plantes renfermant des constituants peu solubles dont les principes actifs sont difficilement libérés lors d'une simple infusion [9].

Leur principe repose sur ébullition de la plante, quel que soit sèche ou fraîche, dans de l'eau pendant une durée allant de 10 à 30 minutes, pour briser les parois cellulaires et libérer des principes actifs, qui sont ensuite concentrés dans l'extrait liquide [10].

Cette méthode est largement utilisée dans la médecine traditionnelle [8], en industrie alimentaire pour extraire les arômes et les composés bioactifs des matières végétales, contribuant ainsi à la production d'aliments fonctionnels et de nutraceutiques [11], ainsi qu'elle est utilisée pour la production de colorants naturels, tels que l'indigo, où elle offre une alternative plus rapide aux méthodes traditionnelles de macération-fermentation [10].

II. 2. 2. Extraction par Soxhlet :

L'extraction par Soxhlet, une technique en continu. Le solvant chauffé s'évapore, se condense et traverse l'échantillon de façon répétée. Ce cycle permet d'extraire efficacement les composés bioactifs jusqu'à épuisement de la plante [12].

II. 2. 3. Distillation :

L'extraction par distillation est utilisée principalement pour extraire les précieuses huiles essentielles à partir de diverses plantes. Cette méthode consiste à faire passer de la vapeur à travers la matière végétale pour vaporiser les composés volatils [13,14].

La distillation peut être effectuée de plusieurs manières, notamment la distillation simple [15], la distillation extractive est particulièrement utile pour séparer les mélanges azéotropiques [16] et la distillation sous vide qui est utilisée pour produire des huiles essentielles de haute pureté [17], chacune ayant ses applications et ses avantages uniques.

II. 2. 4. Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide (LLE), aussi appelée extraction par solvant, est une technique qui repose sur la séparation sélective d'un composé entre deux phases liquides non miscibles : une phase aqueuse et une phase organique. Ce procédé est couramment utilisé pour isoler des substances solubles dans la phase organique en agitant les deux liquides avec le matériau végétal dans une ampoule à décanter jusqu'à la formation de deux couches distinctes [18].

L'efficacité de cette méthode dépend de plusieurs facteurs clés, notamment la miscibilité, la densité et la solubilité des solvants employés [19].

La LLE est particulièrement adaptée à l'extraction de mélanges azéotropiques et de composés thermosensibles, puisqu'elle ne nécessite pas de distillation. Cependant, elle présente certaines limitations, telles que la formation d'émulsions, la consommation importante de solvants organiques et des difficultés d'automatisation [20].

II. 3. Techniques d'extraction avancées :

II. 3. 1. Extraction assistée par ultrasons :

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est une technique qui utilise les ultrasons qui sont des oscillations mécaniques à haute fréquence situées entre 20 et 100 kHz, sont utilisés pour l'extraction des composés bioactifs [21], en impliquant le traitement d'un solide, en contact avec un solvant sous l'influence des ultrasons. Il s'appuie sur le phénomène de cavitation acoustique, où la création, l'expansion et l'implosion de bulles dans le solvant, contribuent la déstabilisation de la paroi cellulaire des végétaux, ce qui facilite l'épuisement des cellules et améliore la pénétration des composés bioactifs à travers les membranes cellulaires, ce qui permet d'optimiser leur extraction [4]. Au niveau de laboratoire, deux types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés, le bain à ultrasons et la sonde ultrasonique [22].

L'optimisation des paramètres d'extraction est cruciale pour améliorer le rendement d'extraction des composés bioactifs [23]. Outre son efficacité d'extraction, l'UAE peut servir à la purification des principes actifs végétaux. Cette technique a une capacité à réduire le temps, la consommation d'énergie et de solvants, ce qui la rend extrêmement attrayante pour des

domaines tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [24].

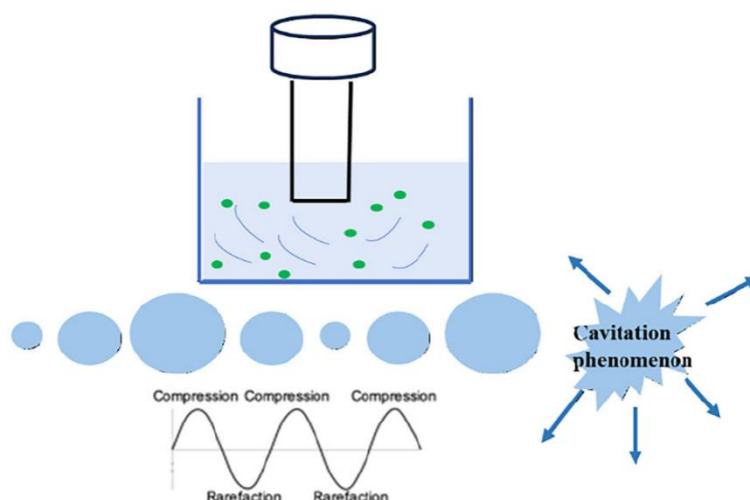


Figure II 1. Principe de l'extraction assistée par ultrasons (UAE)

II. 3. 2. Extraction par micro-onde :

Les micro-ondes constituent une bande d'ondes électromagnétiques situent entre les infrarouges et les rayons X [25], avec une fréquence variant entre 300 MHz et 300 GHz [19]. Le four à micro-ondes est équipé d'un magnétron, d'un guide d'ondes et d'une cavité dans laquelle l'échantillon est placé [26,27]. L'énergie des micro-ondes interagit avec les molécules polaires, provoquant leur rotation et engendrant ainsi la chaleur [28,29].

Cette caractéristique est utilisée dans l'extraction assistée par micro-ondes (EAM), une technique novatrice favorisant la libération des composés chimiques des matrices végétales. Cela est rendu possible par un réchauffement rapide et uniforme du solvant et de l'échantillon, à la fois de manière interne et externe sans gradient thermique [19].

Cette technique est plus rapide et plus économe en énergie que les méthodes conventionnelles. Il existe plusieurs variantes de l'EAM, notamment l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESAM), la distillation assistée par micro-ondes (DAM) et l'extraction combinant hydro-diffusion et gravité (HGM) [30]. L'efficacité de l'extraction est influencée par plusieurs paramètres dont la nature du solvant, le temps et la température d'extraction, l'intensité et l'irradiation également la composition de la matrice [26,31].

L'EAM offre plusieurs avantages, y compris une efficacité supérieure, une durée

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

d'extraction raccourcie et une utilisation réduite de solvants, tout en conservant les substances bioactives. Néanmoins, certaines contraintes demeurent, comme la complexité d'extraction des substances apolaires et les possibles altérations des structures des molécules ciblées [23]. Malgré ces défis, l'EAM s'impose comme une technique d'extraction avancée, de plus en plus adoptée en remplacement des méthodes classiques dans les laboratoires et l'industrie.

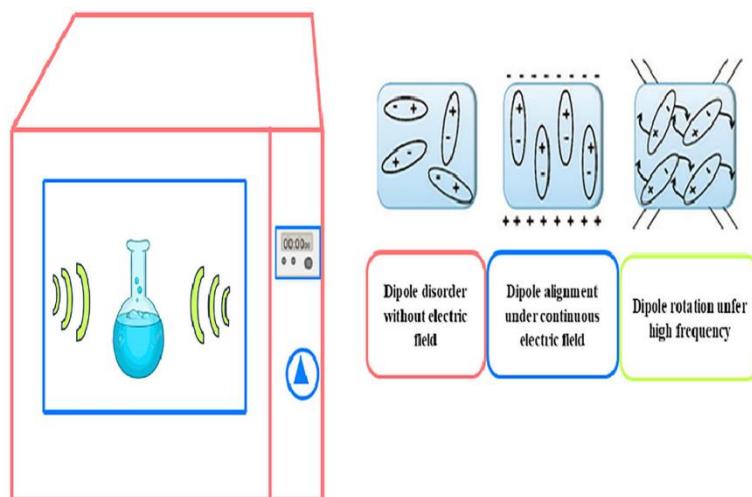


Figure II.2. Représentation de l'extraction assistée par micro-ondes (EAM)

II. 3. 3. Extraction par fluides supercritiques :

L'extraction par fluides supercritiques (SFE) est une méthode de séparation qui repose sur l'utilisation des fluides supercritiques, comme le dioxyde de carbone supercritique (SC-CO₂) présentant des propriétés de solvation uniques au-dessus d'une température et d'une pression critique, afin d'extraire les huiles essentielles ainsi que d'autres substances chimiques naturelles [32]. Cette technique permet une extraction efficace et sélective des composants souhaités, en améliorant la valeur des extraits tout en préservant l'intégrité environnementale.

Présentant ainsi des avantages tels qu'une consommation d'énergie réduite, une production minimale de déchets et une possibilité de produire des coproduits. Le SFE est considéré comme une alternative durable aux techniques traditionnelles d'extraction par solvant, améliorant la valeur des extraits tout en préservant l'intégrité environnementale [33], ce qui le rend utile dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [32].

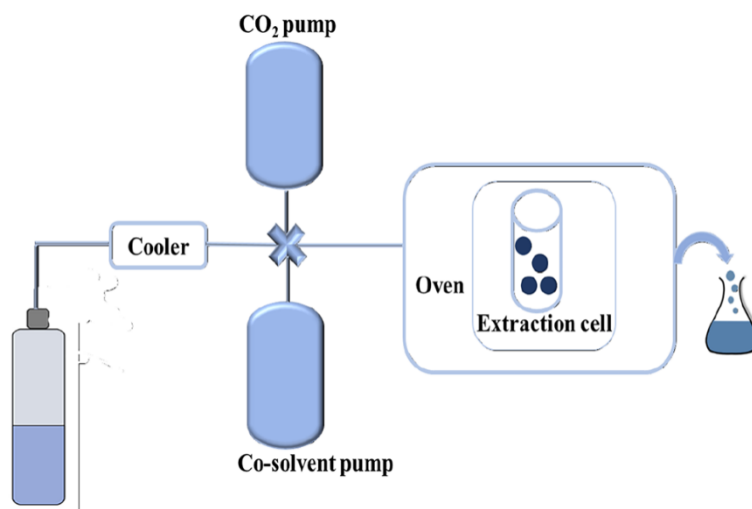


Figure II. 3. Schéma d'un extracteur à fluide supercritique (SFE).

II. 4. Comparaison des différentes techniques d'extraction :

La comparaison entre les méthodes d'extraction classiques et modernes met en lumière des différences significatives en termes de rendement, d'efficacité, d'impact environnemental et de qualité des composés extraits. En général les méthodes modernes offrent des rendements plus élevés et une meilleure efficacité d'extraction [34]. Elles sont généralement plus respectueuses de l'environnement, utilisent moins de solvants et d'énergie [35]. De plus, la qualité des composés extraits, en termes de composition chimique et d'activité biologique est souvent supérieure avec les méthodes modernes [36].

L'analyse de ces critères, permet une meilleure compréhension des avantages et des inconvénients de chaque technique, facilitant ainsi le choix de la méthode la plus adaptée à l'extraction de composés naturels spécifiques. Cette évaluation est essentielle pour optimiser les résultats en fonction des objectifs de recherche ou de production.

II. 5. Analyse des produits extraits :

L'analyse des produits naturels fait appel à diverses techniques pour séparer, identifier et déterminer les composants des extraits. Ces techniques sont essentielles pour comprendre la composition chimique et les applications potentielles des produits naturels dans des domaines tels que la médecine, l'agriculture et l'alimentation.

II. 5. 1. Techniques spectrométrique :

Les techniques spectrométriques notamment la spectrométrie de masse (MS), la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge (IR) et la spectroscopie ultraviolette (UV) sont essentiels pour l'identification des composants des extraits naturels.

La spectrométrie de masse présente un outil puissant pour déterminer la masse moléculaire, la formule et les modèles de fragmentation des composés. Il peut être couplé à la chromatographie liquide (LC-MS) pour l'analyse de mélanges complexes tels que des extraits naturels [37,38].

La spectroscopie RMN est couramment employée pour la caractérisation structurale de substances naturelles, permettant d'obtenir des données précises concernant la structure et la dynamique moléculaires [37,39]. Les techniques RMN 1D et 2D, telles que la spectroscopie ordonnée de diffusion (DOSY), offrent l'analyse directe de mélanges complexes sans séparation préalable [40,41].

La spectroscopie infrarouge (IR) est principalement utilisée pour identifier les groupes fonctionnels présents dans les molécules, apportant ainsi des informations précieuses sur la structure chimique des produits naturels [37].

Enfin, la spectroscopie UV, souvent associée à d'autres techniques telles que la LC/UV/MS, est utilisée pour la caractérisation de classes spécifiques de composés, tels que les polyphénols, en analysant leurs spectres d'absorption [40,41].

Ces techniques spectrométriques permettent un criblage préliminaire efficace des extraits de produits naturels, facilitant ainsi une identification rapide des composés déjà connus [42].

II. 5. 2. Techniques chromatographique :

Les méthodes chromatographiques des extraits naturels sont utilisées pour identifier et valoriser des composés bioactifs issus des ressources naturelles, le choix de la méthode dépend de plusieurs critères tels que la nature des composés, la complexité de la matrice, ainsi que les exigences en matière de résolution et de sensibilité.

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est largement utilisée dans l'analyse de produits naturels grâce à sa polyvalence, permettant des analyses qualitatives et quantitatives sans préparation complexe des échantillons [43,44]. Elle peut être couplée à divers détecteurs (UV, DAD, MS, RMN) pour renforcer la détection et fournir des données structurales précises [43,45].

L'UHPLC, en recourant des fines particules qui utilise des particules encore plus fines sous haute pressions, permettant ainsi une séparation efficace ainsi qu'une bonne résolution en courte durée par rapport à l'HPLC classique [44,46], cela rend cette technique plus respectueuse de l'environnement, en limitant l'utilisation de solvants organiques, et peut être associée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS) afin d'améliorer la détection et la quantification [46].

La LC-RMN, combinant la chromatographie liquide à la résonance magnétique nucléaire, permettant à l'identification facile des nouveaux composés bioactifs [45,47].

Enfin, la chromatographie en phase gazeuse (GC), notamment à haute température et haute résolution (HT-HRGC), est une technique permettant à l'analyse de composés volatils comme les alcaloïdes, les terpènes et les flavonoïdes [48].

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

Références :

- 1- MERABET, F. Z. (2023). Effet des facteurs environnementaux sur la variation de quelques métabolites secondaires chez deux espèces médicinales *Rosmarinus Officinalis* et *Artemisia campestris*. L dans la région de Tiaret (Doctoral dissertation, Université ibn khaldoun-Tiaret).
- 2- OUMEIMA, D. A., & INES, Y. S. (2021). Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citron (*Citrus limon*) et déchets d'orange (*Citrus sinensis*), en vue de leurs valorisation.
- 3- Pichon, V., 2024. Méthodes extractives, analytiques et d'améliorations de la biodisponibilité des principes actifs contenus dans le *Cannabis sativa* L.
- 4- CHEOK, C. Y., SALMAN, H. A. K. & SULAIMAN, R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- 5- Nguyen van, C (2010). Maîtrise de l'aptitude technologique des oléagineux par modification structurale ; applications aux opérations d'extraction et de transestérification in situ. Thèse de Docteur de UFR Pôle Sciences et Technologie, Université de Rochelle, 170p.
- 6- Borzeix, D., & Borzeix, M. (1986). . Les plantes médicinales du limousin (3ème éd. Treignac : éd. Les Monédières).
- 7- Bhatt, N. S., & Deshpande, M. (2020). A critical review and significance of ayurvedic preparation kwatha herbal decoction. *Int. J. Ayurvedic Med*, 11(2), 155-164.
- 8- Decoction and Their Biological Activities (pp. 23–31). (2022). IGI Global eBooks.
- 9- Nogaret, A.-S. (2011). La phytothérapie : Se soigner par les plantes. Editions Eyrolles.
- 10- Mauliza, I. N., & Putri, V. P. (2019). Decoction as an Alternative to Producing Indigo Tarum Areuy (*Marsdenia tinctoria*) Dyes and Its Role on Fiber Coloration from Cellulose. 4(2), 57–64.
- 11- Vybohová, V., & Hroboňová, K. (2023). Isolation of Natural Compounds with Organoleptic Properties Using Selected Advanced Extraction Techniques. *Chemicke Listy*, 117(6), 365–372..
- 12- Webster, G. R. B. (2006). Soxhlet and Ultrasonic Extraction of Organics in Solids.
- 13- Principles and Applications of Extraction Technologies in the Food Industry (pp. 3–23). (2023). Apple Academic Press eBooks.
- 14- García-Vaquero, M., Rajauria, G., & Tiwari, B. K. (2020). Conventional extraction techniques: Solvent extraction (pp. 171–189). Elsevier.
- 15- Xu, J. (2017). Extraction method of wormwood essential oil by distillation method.
- 16- Taipabu, M. I., Wu, W., Viswanathana, K., Hattu, N., Rumpakwakra, E., & Kololu, M. (2023). Separation of ethanol-water azeotrope mixtures using extractive distillation method.

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

Archipelago Engineering.

17- Li, J. (2017). Preparation method of high-purity essential oil by low-temperature distillation extraction.

18- Wells, M., J., M. 2003. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. In S, Mitra. (Eds.), Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. pp. 37-125.

19- YAHYA, Nur Azzanizawaty, ATTAN, Nursyafreena, et WAHAB, Roswanira Abdul. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. Food and bioproducts processing, 2018, vol. 112, p. 69-85.

20- Müller, E., Berger, R., Blass, E., Sluyts, D. 1985. Liquid–liquid extraction, in: Ullmann's .Encyclopedia of Industrial Chemistry (6th Ed). Wiley-VCH, Weimheim.

21- Ghitescu, R. E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A. M., Gilca, I. A. et Popa, V. I. (2015) : Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. Ultrasonics Sonochemistry., 22, 535–541.

22- Pradal, D (2016). Eco-procédés d'extraction de polyphénols antioxydants à partir d'un coproduit agro-alimentaire. Thèse de doctorat, Université Lille 1.

23- Wang, L., Weller, C., L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends. Food. Sci. Technol. 17, 300-312

24- Adetunji, L., R., Adekunle, A., Orsat, V., Raghavan, V. 2017. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. Food. Hydrocoll. 62, 239-250.

25- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S.S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview . Asian J. Research Chem, 2(1):19-25.

26- Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 902: 227–250

27- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S. (2007): Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews., 1(1), 7-18.

28- Pangarkar V.G. (2008). Microdistillation, Thermomicrodistillation and Molecular Distillation Techniques. In: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy. p 129-143.

29- Ferhat M.A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010) Citrus d'Algérie, Les Huiles Essentielles et leurs Procédés d'Extractions. O.P.U. Algérie.

30- Rombaut, N., Tixier, A. S., Bily, A., Chemat, F. 2014. Green extraction processes of natural

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

products as tools for biorefinery. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 8,530-544.

31- Wang, LY., Xi, G.S., Zheng, C.Y., Miao, S.F.(2010).Microwave-assisted extraction of flavonoids from Chinese herb *Radix puerariae* (Ge Gen). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(4): 304-308.

32- Sovilj, M., Nikolovski, B. G., & Spasojević, M. (2011). Critical review of supercritical fluid extraction of selected spice plant materials. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30(2), 197–220.

33- Abou Elmaaty, T., Sayed-Ahmed, K. A.-E., Elsisy, H., & Magdi, M. M. (2022). Optimization of Extraction of Natural Antimicrobial Pigments Using Supercritical Fluids: A Review. *Processes*, 10(10), 2111.

34- Fang, X., Gu, S., Jin, Z., Hao, M., Yin, Z., & Wang, J. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Simultaneous Extraction of Three Active Compounds from the Fruits of *Forsythia suspensa* and Comparison with Conventional Extraction Methods. *Molecules*, 23(9), 2115.

35- Kurhajec, S., Sabadková, D., Franc, A., & Vetchý, D. (2017). Extrakty ako moderná lieková forma pre prírodné liečivá. *Chemicke Listy*, 111(4), 251–257.

36- Ayub, M., Goksen, G., Fatima, A., Zubair, M., Abid, M., & Starowicz, M. (2023). Comparison of Conventional Extraction Techniques with Superheated Steam Distillation on Chemical Characterization and Biological Activities of *Syzygium aromaticum* L. Essential Oil. *Separations*, 10(1), 27.

37- Rehman, I. U., Malik, L., Zaheer, S., & Abdullah, M. (2022). A Brief Study of Mass Spectrometry of Natural Products. *Plant Biotechnology Persa*, 4(1), 50–55.

38- Es-Safi, N.-E., Essassi, E. M., Massoui, M., & Banoub, J. (2011). Mass Spectrometry as a Powerful Analytical Technique for the Structural Characterization of Synthesized and Natural Products (pp. 319–360). Springer, Dordrecht.

39- Perez, A. L. (2018). Current Approaches to the Isolation and Structural Elucidation of Active Compounds from Natural Products (pp. 209–231). Springer Science + Business Media.

40- Gođevac, D., Jadranin, M., Aljančić, I., Vajs, V., Tešević, V., & Milosavljević, S. (2015). Application of Spectroscopic Methods and Hyphenated Techniques to the Analysis of Complex Plant Extracts (pp. 61–85). Springer, Dordrecht.

41- Khalaf, R., Alhusban, A. A., Al-Shalabi, E., Al-Sheikh, I., & Sabbah, D. A. (2019). Isolation and structure elucidation of bioactive polyphenols (Vol. 63, pp. 267–337). Elsevier.

42- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (1993). *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*.

43- Wolfender, J.-L. (2009). HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta*

Chapitre II : Méthodes d'extraction et techniques d'analyse

Medica, 75(7), 719–734.

44- Wolfender, J.-L. (2013). Recent Advances in Chromatography for the Efficient Profiling of Crude Extracts and Isolation of Natural Products. 4(1), 2.

45- Horník, Š., Sajfrtová, M., Karban, J., Sýkora, J., Březinová, A., & Wimmer, Z. (2013). LC-NMR Technique in the Analysis of Phytosterols in Natural Extracts. Journal of Automated Methods & Management in Chemistry, 2013, 526818.

46- Singh, S., & Singh, A. K. (2012). Applications of ultra high pressure liquid chromatography to natural products.

47- Urban, S. (2006). LC-NMR: Profiling and Dereplication of Natural Product Extracts. Chemistry in Australia, 73(8), 15–17.

48- Carbonell, S. A., de Aquino Neto, F. R., Cardoso, J. N., Pereira, A. dos S., Amaral, A. C. F., & Barnes, R. A. (2000). Rapid screening of natural products by high-resolution high-temperature gas chromatography. Journal of Chromatographic Science, 38(6), 234–240.

Chapitre III

Métabolites secondaires

Chapitre III : Métabolites secondaire

III. 1. Introduction :

Depuis des millénaires, les plantes et les autres ressources naturelles ont été utilisées par l'homme, en raison de leurs propriétés médicinales, pour traiter diverses affections [1,2]. Les végétaux se distinguent par leur aptitude à synthétiser des substances phytochimiques indispensables à leur survie et à leur bon fonctionnement.

Ces composés sont essentiels pour la croissance de la plante ainsi que pour leur protection contre les agents pathogènes les agressions environnementales. Ils se répartissent en deux grandes catégories : les métabolites primaires et secondaires [3]. Les métabolites primaires, tels que les acides aminés et les sucres, sont nécessaires pour les processus métaboliques fondamentaux des organismes [4].

En revanche, les métabolites secondaires, comme les flavonoïdes et les alcaloïdes, contribuent à la défense de la plante et à son adaptation à l'environnement [5]. Comprendre la nature, les fonctions et les mécanismes de biosynthèse de ces composés est crucial afin de pouvoir exploiter pleinement leurs applications dans divers domaines.

III. 2. Métabolites primaires :

Les métabolites primaires offrent un aperçu du métabolisme de base des organismes vivants, mettant l'accent sur les composés essentiels à leur survie. Cela inclut les glucides, les protéines et les lipides [6].

Les glucides fournissent de l'énergie [7,8], les protéines participent à la structure cellulaire et à la fonction enzymatique [9], tandis que les lipides sont essentiels au stockage de l'énergie, fournissant plus de deux fois plus d'énergie par gramme que les glucides et les protéines, ce sont également des composants structuraux clés des membranes cellulaires, influençant la fluidité et la perméabilité [10].

Ils ont également fait partie de réactions biochimiques cellulaires, assurant ainsi l'équilibre interne et le fonctionnement physiologique optimal.

La régulation de ces voies est un processus complexe qui met en jeu divers mécanismes permettant de garantir l'équilibre et de faire face aux variations de l'environnement [11].

III. 3. Métabolites secondaires :

III 3. 1. Définition :

Les métabolites secondaires sont des composés organiques synthétisés par les organismes vivants, y compris les plantes, les animaux et les micro-organismes [12]. Ainsi que, la production de ces molécules est fréquemment favorisée par divers facteurs environnementaux, notamment des situations de stress, qui peuvent favoriser leur production dans le cadre de la réponse adaptative de l'organisme [13].

III. 3. 2. Classification des métabolites secondaires :

La classification des métabolites secondaires selon leur squelette de base repose sur leur structure chimique fondamentale [14]. Ces composés, issus du métabolisme secondaire des plantes, sont organisés en trois grandes catégories principales : les composés phénoliques, les composés terpéniques et les composés azotés [15].

III. 3. 3. Composés phénolique :

III. 3. 3. 1. Définition :

Les composés phénoliques couvrent une gamme diversifiée de substances naturelles [16]. Ils se caractérisent principalement par la présence de groupe phénol dans leur structure [17,18].

La présence des polyphénols dans la plante joue un rôle crucial dans la protection contre les agressions extérieures telles que les attaques de prédateurs ou les rayonnements UV [19], de plus leur structure chimique leur confère des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes, suscitant ainsi un intérêt important dans le domaine de la santé et de l'industrie alimentaire [20].

Leur classification effectuée en fonction de leur structure chimique [21], du nombre de noyaux phénoliques et de la nature des substituants présents sur ces noyaux [19].

Ainsi, ils ont distingué ainsi les phénols simples, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lignanes, les coumarines, et les tanins, entre autres [22]. Chaque classe de composés phénoliques présente des caractéristiques structurales uniques ainsi que des activités biologiques spécifiques, et chaque sous-classe présente des caractéristiques structurales

Chapitre III : Métabolites secondaire

spécifiques qui influent sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [23].

III. 3. 3. 2. Classification :

III. 3. 3. 2. 1. Flavonoïdes :

- **Définition :**

Les flavonoïdes constituent une famille fascinante et variée de composés polyphénoliques, que l'on trouve dans une large gamme d'aliments variés, et des plantes médicinales qui sont renommés pour leurs nombreuses propriétés bénéfiques et précieuses sur la santé humaine et le bien-être général [24].

Les flavonoïdes constituent une classe particulièrement importante de composés bioactifs, qui se distinguent par une structure de base de flavane [25].

Cette structure est constituée de trois cycles aromatiques, désignés par les lettres A, B et C. Chaque sous-groupe distinct de flavonoïdes présente des variations notables et spécifiques dans cette squelette de base fondamentale [21].

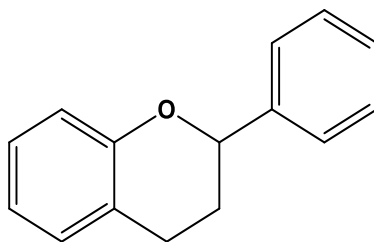
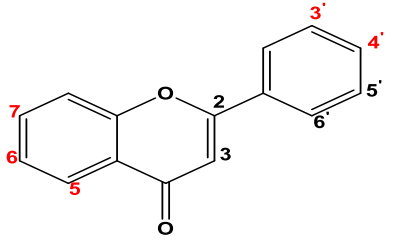
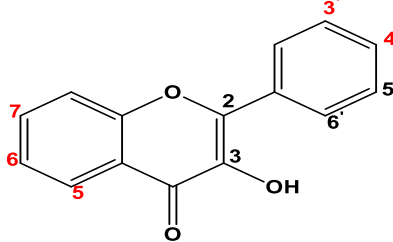
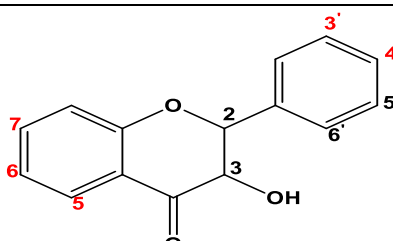
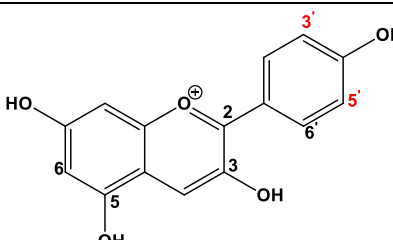


Figure III.1. Noyau flavane

Chapitre III : Métabolites secondaire

● **Classification :**

Tableau III.1. Classification structurale et chimique des flavonoïdes

| Classe | Squelette | Sous classe |
|-----------------------|---|---|
| Flavone |  | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Chrysin OH (5, 7) ✓ Apigénine OH (5, 7, 4') ✓ Lutéline OH (5, 7, 3', 4') ✓ Baicaléine OH (5, 6, 7) ✓ Diosmine OH (5, 3') <li style="padding-left: 20px;">OGlu-Rha (7) <li style="padding-left: 20px;">O-CH₃ (4') |
| Flavonol |  | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Kaempférol OH (5, 7, 4') ✓ Quercétine OH (5, 7, 3', 4') ✓ Myricétine OH (5, 7, 3', 4', 5') ✓ Rutine OH (5, 7, 3', 4', 5') <li style="padding-left: 20px;">O-Glu-Rha (3) |
| Flavanol |  | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Épicatéchine 2R,3R(+) et 2S,3S(-) OH (5, 7, 3', 4') ✓ Catéchine 2S,3R(-) et 2R,3S(+) OH (5, 7, 3', 4') |
| Anthocyanidine |  | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cyanidine OH (3') ✓ Malvidine O-CH₃ (3', 5') ✓ Pétunidine O-CH₃ (3') <li style="padding-left: 20px;">OH (5') |

Chapitre III : Métabolites secondaire

| | | |
|-------------------|--|--|
| Isoflavone | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Diadzéine OH (7,4') ✓ Génistéine OH (5,7,4') |
| Flavonone | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Naringénine OH (7,4') ✓ Narigine OH (4') <li style="padding-left: 20px;">O-Glu-Rha (7) ✓ Hespérétine OH (7, 3') <li style="padding-left: 20px;">O-CH₃ (4') ✓ Hesperidine OH (3') <li style="padding-left: 20px;">O-CH₃ (4') <li style="padding-left: 20px;">O-Glu-Rha (7) ✓ Taxifoline OH (3, 7, 3', 4') |
| Chalcone | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Isoliquiritigénine OH (4, 4', 6) ✓ Butéine OH (3, 4, 6', 4') |
| Aurone | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hispidol OH (6, 4') ✓ Aureusidine OH (4, 6, 3', 4') ✓ Maritimetin OH (6, 7, 3', 4') |

● Applications des flavonoïdes en médecine et en industrie :

Les flavonoïdes ont trouvé de nombreuses applications aussi bien en médecine que dans l'industrie. Dans le domaine médical, ils sont reconnus pour leur rôle protecteur sur les maladies cardiovasculaires [26]. Ils présentent également des propriétés anticancéreuses et antivirales importantes, capables d'inhiber la croissance des tumeurs et de moduler des fonctions cellulaires clés, ce qui ouvre de nouvelles pistes pour le traitement de diverses maladies [27,28]. En outre, certains flavonoïdes montrent des effets neuroprotecteurs qui pourraient prévenir des

Chapitre III : Métabolites secondaire

maladies comme Alzheimer, grâce à leurs actions antioxydantes et leur capacité à influencer certaines enzymes [27,29]. Ils ont des propriétés antimicrobiennes précieuses surtout pour les bactéries résistantes aux antibiotiques [30].

En industrie, les flavonoïdes sont de plus en plus utilisés pour développer des produits pharmaceutiques [31,32]. Ainsi que, grâce a leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires pour protéger la peau, ils sont largement utilisés pour la fabrication des produits cosmétiques [26,33]. De plus, ils ont contribué dans la fabrication des produits alimentaires en tant que conservateurs naturels [28,33].

III. 3. 3. 2. 2. Acides phénoliques :

● Définition :

Les acides phénoliques constituent une classe répandue de composés bioactifs d'origine végétale caractérisés par leur goût et leur odeur spécifiques [34]. Ils sont caractérisés par une structure phénolique, qui comprend un groupe hydroxyle (-OH) attaché à un cycle hydrocarboné aromatique [35]. Ils comprennent les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque, ainsi que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique [36].

● Classification :

✓ Dérivés d'acides benzoïques :

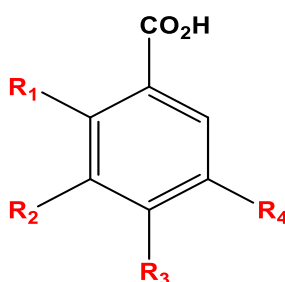


Figure III.2. Structure d'acides benzoïques avec substituants.

Chapitre III : Métabolites secondaire

Tableau III.2. Dérivés d'acide benzoïque

| Composé | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|----------------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque | H | H | OH | H |
| Acide protocatéchique | H | OH | OH | H |
| Acide vanillique | H | OCH ₃ | OH | H |
| Acide gallique | H | OH | OH | OH |
| Acide salicylique | OH | H | H | H |

✓ Dérivés d'acides cinnamique :

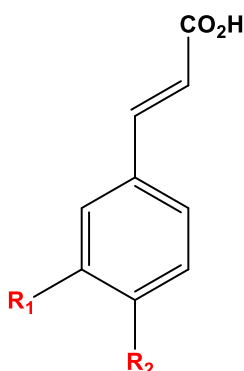


Figure III.3. Structure d'acide cinnamique avec substituants

Tableau III.3. Dérivés d'acides cinnamique

| Composé | R ₁ | R ₂ |
|----------------------------|------------------|----------------|
| Acide cinnamique | H | H |
| Acide <i>p</i> -coumarique | H | OH |
| Acide caféique | OH | OH |
| Acide férulique | OCH ₃ | OH |

● Application des acides phénoliques en médecine et en industrie :

Les acides phénoliques suscitent un intérêt croissant en médecine et dans divers secteurs industriels en raison de leurs propriétés biologiques exceptionnelles [37]. En médecine, ces composés se distinguent par leur activité antioxydante élevée, qui joue un rôle crucial dans la réduction du stress oxydatif [38], ainsi que par leurs effets anti-inflammatoires, qui sont notamment liés à réguler les voies de signalisation cellulaire NF-κB et MAPK.

Chapitre III : Métabolites secondaire

Ils ont également démontré un potentiel anticancéreux notable, en favorisant l'apoptose, en inhibant la prolifération cellulaire, et en entravant la croissance ainsi que les métastases tumorales. De plus, leur capacité à agir comme régulateurs épigénétiques contribue à renforcer l'efficacité des thérapies anticancéreuses conventionnelles [40]. Par ailleurs, ils présentent des propriétés antimicrobiennes et antivirales, incluant une activité inhibitrice contre le SARS-CoV-2, ce qui suggère leur utilité dans le développement de stratégies thérapeutiques antivirales [41]. Ils exercent en outre des effets cardioprotecteurs, notamment en améliorant la santé vasculaire et en réduisant l'hypertension, tout en participant au renforcement des défenses immunitaires de l'organisme [42, 43].

Sur le plan industriel, les acides phénoliques sont intégrés dans l'industrie agroalimentaire en tant que conservateurs naturels, en raison de leur capacité à inhiber l'oxydation des produits alimentaires et à prolonger leur durée de conservation [38]. Dans le domaine cosmétique, ils sont appréciés pour leurs effets protecteurs contre les rayonnements ultraviolets et leurs bienfaits sur la santé cutanée [44]. En outre, la production de ces composés peut être assurée par des procédés biotechnologiques durables, impliquant l'utilisation de cellules microbiennes comme usines de biosynthèse [45]. Enfin, en industrie pharmaceutique, les acides phénoliques sont intégrés dans la formulation de produits thérapeutiques en tant qu'agents bioactifs ciblant diverses pathologies [43].

III. 3. 3. 2. 3. Lignanes :

● **Definition :**

Les lignanes sont des composés chimiques issus de l'union de deux unités de phénylpropane, largement présents dans le règne végétal. On les retrouve dans divers aliments tels que les graines de lin, le sésame, les céréales complètes, ainsi que certains fruits et légumes [46].

Parmi les lignanes connue on note : le sésaminol, le pinoresinol et le matairesinol.

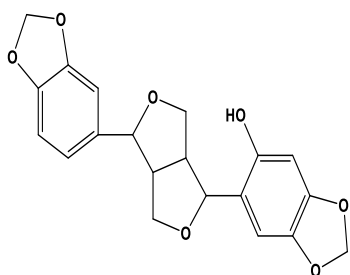


Figure III.4. Structure de Sésaminol

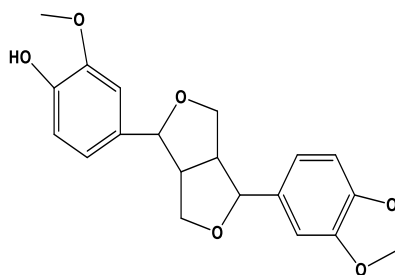


Figure III.5. Structure de Pinoresinol

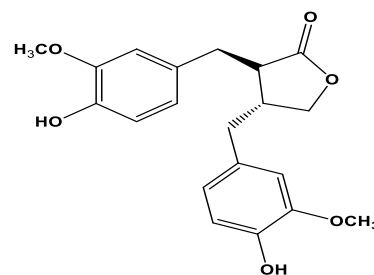


Figure III.6. Structure de Matairesinol

● Application des lignanes en médecine et en industrie :

Les lignanes ont suscité une grande attention en raison de leurs diverses applications en médecine et dans l'industrie. Ces composés sont connus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, notamment leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires [47] et phytoestrogéniques [48], ce qui les rend précieux dans les industries pharmaceutiques. De plus, les lignanes sont utilisées dans les cosmétiques et les aliments fonctionnels [49], ce qui souligne leur polyvalence et leur potentiel d'application à grande échelle.

III. 3. 3. 2. 4. Coumarines :

● Définition :

Les coumarines sont des composés organiques aromatiques, qui ont une structure chimique caractéristique, composé d'un cycle benzénique et un noyau lactone [50]. Ces composés sont en effet présentés dans diverses espèces végétales, particulièrement dans les agrumes, le trèfle, le fenugrec et la cannelle [51]

● Classification :

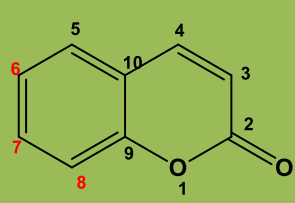
Les coumarines possèdent plusieurs fonction phénolique etherifiers ou non, et se caractérisent par la présence d'un noyau de benzopyrane, résultant de la fusion d'un noyau benzénique avec un cycle α -pyrone [52]. Ainsi que, on peut les classer en deux catégories : les coumarines simples et les coumarines complexe.

Chapitre III : Métabolites secondaire

➤ Coumarines simples :

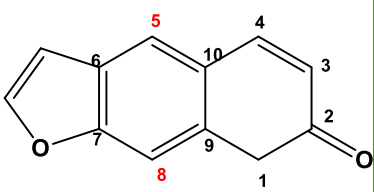
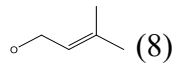
Les coumarines simples présentent les composés non substitués, caractérisés par un noyau de benzopyrane.

Tableau III.4. Substituants et dérivés glycosylés des coumarines (1-Benzopyrane-2-one)

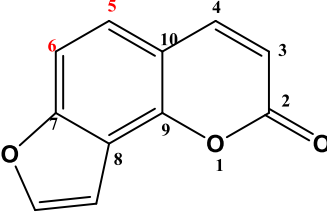
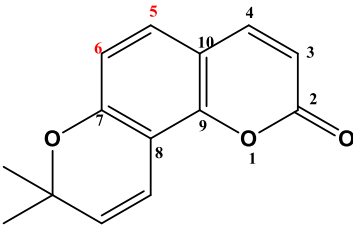
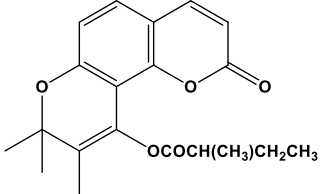
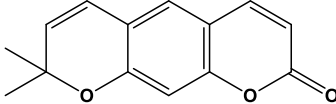
|  1-Benzopyrane-2-one | Les génines | Les hétérosides |
|--|-------------|---|
| | | ✓ Umbelliférone OH(2) ✓ Esculétol OH(1,2) ✓ Scopolétol OH (2) OCH ₃ (1) ✓ Herniarine OCH ₃ (2) ✓ Fraxétol OH (2,3) OCH ₃ (1) |

➤ Coumarines complexe :

Tableau III.5. Classification structurale des Coumarines complexe

| | | |
|--|---|---|
| Les furanocoumarines linéaire |  6,7 furocoumarines | ✓ Psoralène H (5,8) ✓ Bergaptène OCH ₃ (5) ✓ Xanthoxine OCH ₃ (8) ✓ Impératorine  (8) |
|--|---|---|

Chapitre III : Métabolites secondaire

| | | |
|--|---|---|
| <p style="text-align: center;">Les furocoumarines angulaire</p> |  <p style="text-align: center;">7,8 furocoumarines</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Angélicine H (5, 6) ✓ Pimpinelline OCH₃ (5,6) |
| <p style="text-align: center;">Les pyranocoumarines</p> |  <p style="text-align: center;">Pyranocoumarines</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Séséline  <ul style="list-style-type: none"> ✓ Xanthylétine  |

● Application potentiels des coumarines :

Les coumarines se sont des composés bioactifs connu par leur polyvalence dans diverse domaines, tel qu'à leurs propriétés biologiques, ainsi que leurs applications industrielles et scientifiques [53].

Sur le plan pharmacologique et médical, elles possèdent des effets anticoagulants, anti-inflammatoires, antibactériens et antifongiques. Ainsi que leur contribution dans le développement de traitements potentiels contre les maladies cardiovasculaires, les infections et les affections inflammatoires [54].

En parallèle, ils sont utilisés comme additifs dans les cosmétiques et les parfums en raison de leurs propriétés aromatiques. Ils sont également utilisés comme colorants fluorescents et comme sondes dans la recherche biomédicale [55,56].

Dans le domaine agricole, les coumarines jouent un rôle important comme agents pesticides et insecticides naturels, offrant une alternative respectueuse de l'environnement aux produits chimiques conventionnels [57].

III. 3. 3. 2. 5. Tanins :

● **Definition :**

Les tanins sont des substances phénoliques hydrosolubles complexes de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, largement présentes dans le règne végétal. Grâce à leurs structures ils se caractérisent par la capacité de se lier aux protéines [58].

● **Classification :**

On distingue deux classes différentes de tanins par leur structure et également par leur origine biogénétique : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés [59].

➤ **Tanin hydrolysable :**

Les tanins hydrolysables sont des composés phénoliques complexes, caractérisés par la présence d'esters d'acides galliques ou ellagiques liés à un noyau d'hydrates de carbone, souvent du glucose [60]. Ils peuvent être divisés en gallotanins et ellagitanins, tel que les gallotanins sont formés par l'estérification de groupes hydroxyles du D-glucose avec de l'acide gallique, tandis que les ellagitanins sont constitués d'un noyau de glucose entouré d'acides gallique et d'acides ellagiques [61,62].

➤ **Tanin condensés :**

Les tanins condensés (CT) sont des composés polyphénoliques constitués de sous-unités de flavan-3-ol qui forment des oligomères et des polymères. Ils se lient aux protéines [60]. Ils sont issus de la voie des flavonoïdes, une branche de la voie des phénylpropanoïdes, distincte de la synthèse des tanins hydrolysables [63].

● **Application :**

Les tanins, composés polyphénoliques naturels, présentent un large éventail d'applications tant en médecine que dans diverses industries. Sur le plan médical, leurs puissantes propriétés antioxydantes permettent de neutraliser les radicaux libres et de réduire le stress oxydatif, contribuant ainsi à la prévention et la prise en charge de maladies chroniques telles que le cancer et les affections cardiovasculaires [64,65]. Leur activité antimicrobienne confère aux tanins une

Chapitre III : Métabolites secondaire

efficacité notable contre divers agents pathogènes, ouvrant la voie au développement de nouveaux agents antimicrobiens [65]. De plus, ils montrent un potentiel prometteur dans la gestion du diabète de type 2, en favorisant l'absorption du glucose et en inhibant l'adipogenèse [66].

D'un point de vue industriel, les tanins jouent un rôle essentiel dans l'industrie du cuir, où ils sont utilisés pour le tannage des peaux grâce à leur capacité à réagir avec le collagène, conférant au cuir une meilleure stabilité et durabilité [67,68]. Leur aptitude à former des liaisons solides avec divers matériaux en fait également des composants clés dans la fabrication d'adhésifs et de revêtements, notamment dans les secteurs du bois et de la construction [69]. Dans l'industrie alimentaire, les tanins interviennent comme agents clarifiants dans les boissons fermentées telles que le vin et la bière, tout en jouant un rôle dans le profil sensoriel de certains aliments. Enfin, leurs propriétés de liaison avec les métaux lourds leur confèrent des applications précieuses dans le traitement des eaux usées, facilitant l'élimination des polluants et contribuant à la protection de l'environnement [70].

III. 3. 3. 3. Biosynthèse des composés phénoliques :

La biosynthèse des polyphénols est un processus complexe impliquant de multiples voies et mécanismes de régulation. Ils sont synthétisés principalement par les voies du shikimate et des phénylpropanoïdes.

III. 3. 3. 3. 1. Voie du shikimate :

Cette voie est cruciale pour la synthèse des acides aminés aromatiques, précurseurs de nombreux polyphénols. Elle implique une série de réactions enzymatiques qui transforment les glucides simples en composés aromatiques [71,72].

Chapitre III : Métabolites secondaire

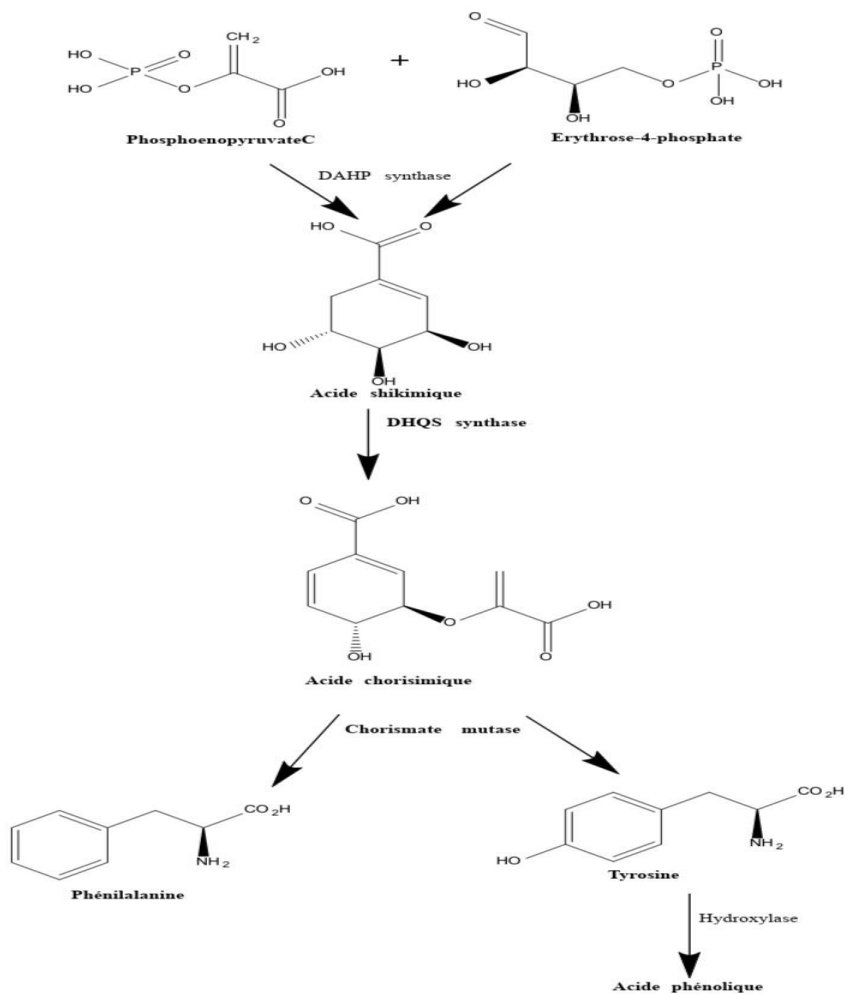


Figure III.7. Biosynthèse des composés phénoliques par voie shikimate

III. 3. 3. 3. 2. Voie des phénylpropanoïdes :

Cette voie est responsable de la production d'une grande variété de polyphénols, notamment des flavonoïdes, des stilbénoides et des hydroxycinnamates. Des enzymes clés telles que la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS) jouent un rôle central dans cette voie [73,72].

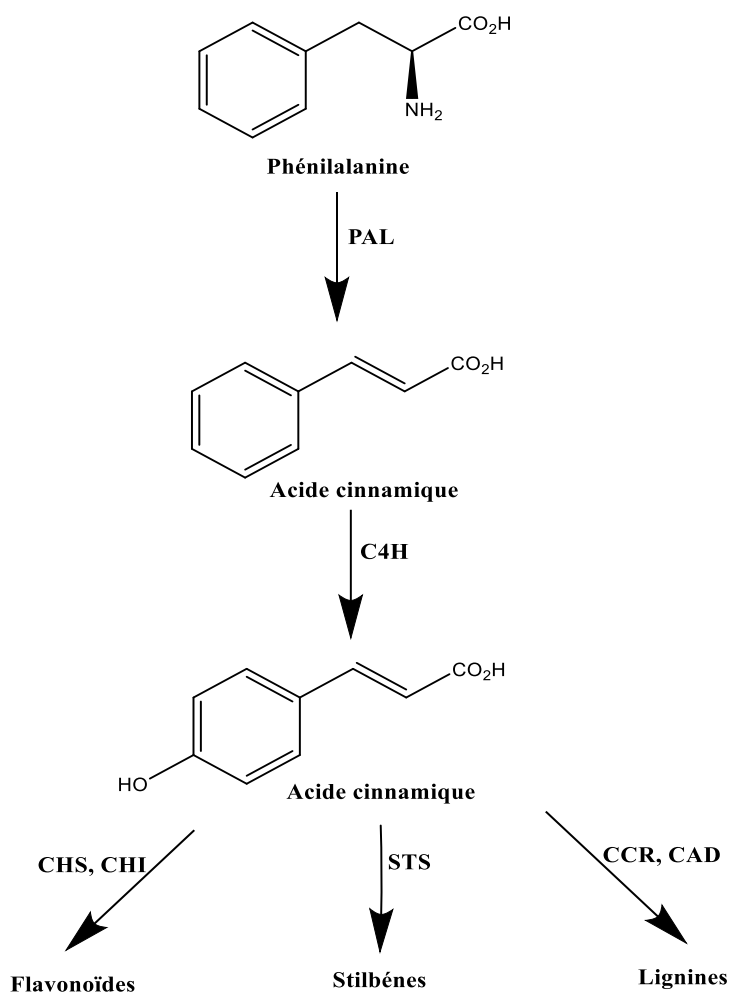


Figure III.8. Biosynthèse des composés phénoliques par voie phénylpropanoïdes.

III. 3. 4. Composés azotés :

III. 3. 4. 1. Définition :

Les composés azotés des métabolites secondaires désignent un ensemble de molécules organiques biosynthétisées par les plantes à partir d'acides aminés, et caractérisées par la présence d'au moins un atome d'azote dans leur structure chimique [74]. Ils incluent principalement les alcaloïdes, les glucosinolates et d'autres composés.

III. 3. 4. 2. Classification :

III. 3. 4. 2. 1. Alcaloïdes :

● Définition :

Les alcaloïdes sont des composés naturels caractérisés par la présence d'au moins un atome d'azote dans leur cycle hétérocyclique [75], comprenant plus de 6 000 composés.

● Classification :

Les alcaloïdes peuvent être classés en différentes classes en fonction de leur structure chimique, de leur activité biologique et de leurs voies de biosynthèse [75]. On trouve principalement : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes.

➤ Alcaloïdes vrais :

Les alcaloïdes vrais sont des dérivés des acides aminés, de structure hétérocyclique qui contiennent généralement un atome d'azote, à titre d'exemple on trouve : la nicotine, la morphine, la cocaïne et la quinidine [76].

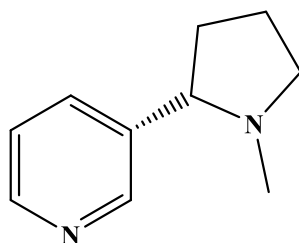


Figure III.9. Structure de nicotine

➤ Pseudo- alcaloïdes :

Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas des dérivés des acides aminés mais ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, parmi ces composés on trouve la caféine, la solanine, l'aconitine et la pilocarpine [77,78].

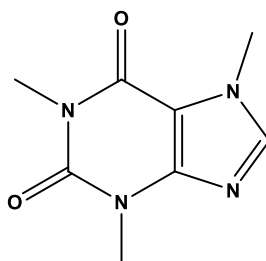


Figure III.10. Structure de caféine

➤ Proto- alcaloïdes :

Les proto-alcaloïdes sont des dérivés des acides aminés dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique mais forme plutôt des groupements aminés latéraux, parmi ces composés on trouve l'éphédrine, mescaline, l'adrénaline, l'hordenine et la tyramine [79].

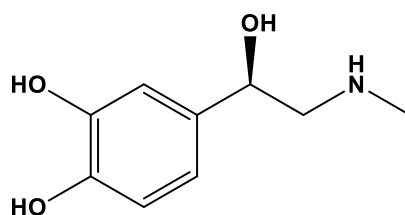


Figure III.11. Structure de l'adrénaline

III. 3. 4. 3. Propriétés thérapeutique :

Les alcaloïdes, extraits de plantes, d'organismes marins ou d'invertébrés, présentent un large éventail d'activités pharmacologiques. Parmi celles-ci, leurs effets anti-inflammatoires sont particulièrement notables, notamment par l'inhibition des voies du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) et de la cyclooxygénase-2 (COX-2). Ces mécanismes sont essentiels dans la prise en charge de l'inflammation chronique et des maladies neurodégénératives (MND) telles que la maladie d'Alzheimer, en interagissant notamment avec l'acétylcholinestérase (AChE) et d'autres voies neuroprotectrices [80,81].

Par ailleurs, les alcaloïdes stéroïdiens se sont révélés être des agents anticancéreux prometteurs, grâce à leur capacité à moduler des voies moléculaires impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. Leur efficacité a été démontrée dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, suggérant leur potentiel en tant que agents anticancéreux sélectifs [82,83]. Certains alcaloïdes ont montré une efficacité particulière contre le cancer colorectal, en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses, soulignant leur potentiel en tant qu'agents chimiothérapeutiques [84].

Leur activité antivirale a également été explorée, notamment dans le contexte de la COVID-19, où des composés tels que la berbérine et la quinine ont démontré leur capacité à

Chapitre III : Métabolites secondaire

inhiber des cibles protéiques virales et à réduire les marqueurs inflammatoires, en faisant des candidats prometteurs pour le développement de nouveaux traitements antiviraux [85].

Ainsi, la valeur thérapeutique des alcaloïdes est de plus en plus reconnue, et les recherches actuelles continuent d'explorer leur potentiel dans le traitement de maladies complexes telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et les infections virales.

III. 3. 5. Composés terpéniques :

III. 3. 5. 1. Définition :

Les terpénoïdes sont un groupe d'hydrocarbures produits en grande quantité par les plantes, principalement présents dans la sève et les vacuoles cellulaires [86], et ils sont dérivés de l'isoprène [87].

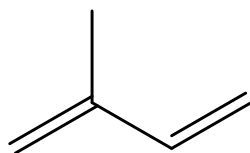


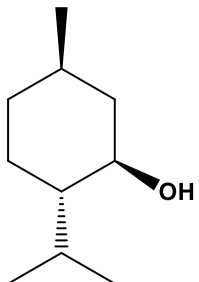
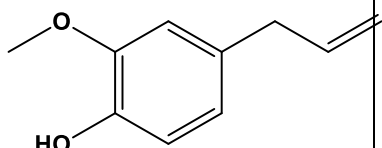
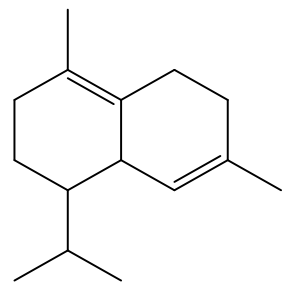
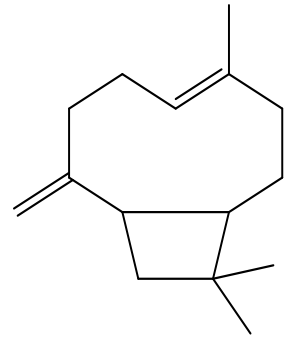
Figure III.12. Structure de l'isoprène

III. 3. 5. 2. Classification :

Les terpènes sont classés en quatre classes en fonction du nombre d'unités d'isoprène qu'ils contiennent, notamment les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30).

Chapitre III : Métabolites secondaire

Tableau III.6. Classification des Composés terpéniques.

| Classes | Définition | Structure |
|---------------------------|---|---|
| Les monoterpènes | Ces composés sont constitués de deux unités isoprène, parmi ces composés on trouve le menthol et l'eugénol. |  <p style="text-align: center;">Structure de menthol.</p>  <p style="text-align: center;">Structure d'eugénol.</p> |
| Les sesquiterpènes | Ils sont constitués de trois unités isoprène. Dans cette classe on peut cité le cadinène et le caryophyllène. |  <p style="text-align: center;">Structure de cadinene.</p>  <p style="text-align: center;">Structure de caryophyllène.</p> |
| Les Diterpènes | Ce sont composés de quatre unités d'isoprène. | |
| Les Triterpènes | C'est à cette famille qu'appartiennent les stéroïdes | |

III. 3. 5. 3. Application dans diverse domaine :

Les terpènes présentent un large éventail d'activités biologiques, notamment des propriétés antibactériennes, antivirales, antioxydantes et anticancéreuses. Ils sont utilisés dans le traitement de maladies telles que le cancer, le diabète et les troubles neurodégénératifs [87].

Par ailleurs, Les terpènes sont des composants clés des huiles essentielles et contribuent à leur utilisation dans les parfums, les produits de soin de la peau et autres articles de soins personnels [88].

D'autre part, Industrie alimentaire : Les terpènes sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour en améliorant les saveurs et les arômes, comme l'arôme fruité du baijiu chinois [87].

Chapitre III : Métabolites secondaire

Références:

- 1- Silva Júnior, J. O. C., Costa, R. M. R., Teixeira, F. M., & Barbosa, W. L. R. (2011). Processing and Quality Control of Herbal Drugs and Their Derivatives.
- 2- Šantić, Ž., Pravdić, N., Bevanda, M., & Galić, K. (2017). The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatria Danubina*, 29, 787–792.
- 3- Reddy, S. S., Singh, S., & Desai, P. (2023). An overview of Phytochemicals seen in plant sources. *International Journal of Pharmacognosy and Life Science*, 4(1), 55–59.
- 4- Barak, D. (2022). Role of plant metabolites in plant protection and their potential in integrated pest management. *Pharma Innovation*, 11(5), 699–704.
- 5- Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2), 232–249.
- 6- Michal, G., & Schomburg, D. (2012). *Biochemical pathways : an atlas of biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons.
- 7- Pathak, A. (2022). Exploring metabolism: understanding the fundamental processes. *Deleted Journal*, 02(01), 01–06.
- 8- Michal, G., & Schomburg, D. (2012). *Biochemical pathways : an atlas of biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons.
- 9- MohanKumar, G. N. (2022). Nutraceutical Horticulture : An overview of biochemical and molecular considerations. *Journal of Horticultural Sciences*, 17(1), 1–5.
- 10- Sheneni, V. D., Shaibu, I. E., & Momoh, I. S. (2023). Lipids in healthcare and medicine. *MOJ Biology and Medicine*, 8(3), 103–108.
- 11- Fernie, A. R., & Sweetlove, L. J. (2023). Editorial - Regulation of Metabolism Special Issue. *Plant Journal*, 114 5(5), 999–1000.
- 12- Hardie, D. (2012). *Organismal Carbohydrate and Lipid Homeostasis*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(5).
- 13- Wollam, J., & Antebi, A. (2011). Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 885–916
- 14- Mandal, S., Borah, D., Boruah, D., Kumar, N., Shrivastav, A. K., & Singh, A. (2024). Plant Secondary Metabolites (pp. 297–318).
- 15- Anila, P. S., Jayanthikumari, V. P., & Saraladevi, R. M. (2024). Secondary metabolite products of plants (pp. 79–92).
- 16- Bajčan, D., Šimanský, V., Tóth, T., & Árvay, J. (2015). Colour, phenolic content and antioxidant activity of the Slovak Alibernet red wine samples. *The Journal of Microbiology*,

Chapitre III : Métabolites secondaire

Biotechnology and Food Sciences, 4, 5–8.

17- Kafkas, N. E., Koşar, M., Oz, A. T., & Mitchell, A. E. (2018). Advanced Analytical Methods for Phenolics in Fruits. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–6.

18- Bajčan, D., Šimanský, V., Tóth, T., & Árvay, J. (2015). Colour, phenolic content and antioxidant activity of the Slovak Alibernet red wine samples. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 5–8.

19- Cheynier, V., Halbwirth, H., Stich, K., & Martens, S. (2017). Foreword focus on polyphenols. *Planta*, 246(2), 183.

20- Pereira, L., & Cotas, J. (2023). Therapeutic Potential of Polyphenols and Other Micronutrients of Marine Origin. *Marine Drugs*, 21(6), 323.

21- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243.

22- Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. *Molecules*, 28(4), 1845.

23- Vastrad, J. V., Badanayak, P., & Goudar, G. (2022). Phenolic compounds in tea: phytochemical, biological, and therapeutic applications. *Phenolic compounds-Chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications*, 23, 452.

24- Celik, S., Cakir, E., Akyuz, S., & Ozel, A. E. (2022). Flavonoids: Their Anticarcinogenic Effects and Molecular Modeling Studies. In *Handbook of Research on Natural Products and Their Bioactive Compounds as Cancer Therapeutics* (pp. 265-296). IGI Global Scientific Publishing.

25- Kozłowska, A., & Szostak-Węgierek, D. (2014). Flavonoids--food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(2), 79–85.

26- Zhang, Q., & Yue, S.-J. (2022). Editorial: Flavonoids and Cardiovascular Metabolism. *Frontiers in Nutrition*, 9.

27- Ullah, A., Munir, S. M., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H. M., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), 5243.

28- Kazazić, S. (2004). Antioxidative and antiradical activity of flavonoids. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 55(4), 279–290.

29- Farias, E. A. de O., & Araujo, T. D. S. (2014). Aplicações dos flavonóides em biotecnologia: propriedades terapêuticas e aplicações nanotecnológicas. 4(2).

Chapitre III : Métabolites secondaire

- 30- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241–272.
- 31- Narendra, P., M., S., & Rao, R. T. (2024). Flavanoids: an era of nutraceuticals turning in to medicinal agents. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9–17.
- 32- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- 33- Wang, X., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*, 28(13), 4982.
- 34- Afnan, A., Saleem, M., Akhtar, A., Sharif, B., Akhtar, R. A., Siddique, G. M., Ashraf, B. S., & Alghamdi, S. A. (2022). Anticancer, Cardio-Protective and Anti-Inflammatory Potential of Natural-Sources-Derived Phenolic Acids. *Molecules*, 27(21), 7286.
- 35- Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L. A., & Hameed, S. (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015, 823539.
- 36- Parus, A. (2013). Przeciwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych. *Post. Fitoter*, 1, 48-53.
- 37- Marinho, L. de F., Sganzerla, W. G., Velásquez-Piñas, J. A., Gomes da Silva, A. P., Rostagno, M. A., & Forster-Carneiro, T. (2024). A bibliometric analysis of phenolic acids over the last five years. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 56, 103044.
- 38- Rathod, N. B., Elabed, N., Punia, S., Ozogul, F., Kim, S.-K., & Rocha, J. (2023). Recent Developments in Polyphenol Applications on Human Health: A Review with Current Knowledge. *Plants*, 12(6), 1217.
- 39- Xie, J., Xiong, S., Li, Y., Xia, B., Li, M., Zhang, Z., ... & Liao, D. (2024). Phenolic acids from medicinal and edible homologous plants: A potential anti-inflammatory agent for inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 15, 1345002.
- 40- Sarankar, S. K., Rajak, B., Ojha, S., & Somkuwar, S. (2023). Exploring the utilization of phenolic compounds in pharmaceuticals and healthcare. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*.
- 41- Singh, V. K., Dwivedi, J., Yadav, A. K., & Singh, R. K. (2022). Dietary Polyphenols in Viral Infections. In *Dietary Polyphenols in Human Diseases* (pp. 184-194). CRC Press.
- 42- Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants—Natural health products for human health. *Molecules*, 28(4), 1845.
- 43- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93.

Chapitre III : Métabolites secondaire

- 44- Panzella, L. (2020). Natural phenolic compounds for health, food and cosmetic applications. *Antioxidants*, 9(5), 427.
- 45- Valanciene, E., Jonuskiene, I., Syrpas, M., Augustiniene, E., Matulis, P., Simonavicius, A., & Malys, N. (2020). Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. *Biomolecules*, 10(6), 874.
- 46- Slanina, J. (2000). Biological and Pharmacological Activity of Lignans. *Chemicke Listy*, 94(2).
- 47- Li, N., Chen, G., & Zhou, D. (2020). Lignan compound and preparation method and application thereof.
- 48- Singh, R., Iqbal, N., Umar, S., & Ahmad, S. (2024). Lignan Enhancement: An Updated Review on the Significance of Lignan and Its Improved Production in Crop Plants. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 0(0), 1–10.
- 49- Sangiorgio, P., Errico, S., Verardi, A., Moliterni, S., Tamasi, G., Rossi, C., & Balducchi, R. (2023). Bioactive Lignans from Flaxseed: Biological Properties and Patented Recovery Technologies. *Nutraceuticals*, 3(1), 58–74.
- 50- Chattha, F. A., Nisa, M., Munawer, M. A., & Kousar, S. (2016). Coumarin-Based Heteroaromatics as Plant Growth Regulators.
- 51- Lončar, M., Jakovljević, M., Šubarić, D., Pavlić, M., Buzjak Služek, V., Cindrić, I., & Molnar, M. (2020). Coumarins in Food and Methods of Their Determination. *Foods*, 9(5), 645.
- 52- Kumari, S., Sharma, A., & Yadav, S. (2023). Pharmacological Potential of Coumarin-Based Derivatives: (A Comprehensive Brief Review). *Oriental Journal of Chemistry*, 39(3), 568–576.
- 53- Ahmed, F. (2024). A current summary of coumarin-based compounds and their therapeutic applications. *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(13), 1417–1437.
- 54- Venugopala, K., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, 2013, 963248.
- 55- Szwaczko, K. (2022). Coumarins Synthesis and Transformation via C–H Bond Activation—A Review. *Inorganics (Basel)*, 10(2), 23.
- 56- Bräse, S., Gläser, F., & Hurre, T. (2015). Chapter 11: Coumarins (pp. 287–311).
- 57- Цивилева, О. М., & Koftin, O. V. (2023). Fungal coumarins: biotechnological and pharmaceutical aspects (pp. 441–479). Elsevier BV.
- 58- Gupta, P. (2016). An overview on tannins. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 4(37)
- 59- Zaprometov, M. N. (1988). Tannins, Lignans, and Lignins (pp. 89–97). Academic Press.
- 60- Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., & Huntley, N. F. (2017). The role of

Chapitre III : Métabolites secondaire

condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 46(12), 929–949.

61- Zhang, L. L., & Lin, Y. M. (2009). Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. *African Journal of Biotechnology*, 8(10), 2301–2309.

62- Rippin, V., Beniwal, A., Sharma, S., Ramniwas, K., Sak, S. K., & Sharma, A. K. (2023). Ginnalin A and hamamelitannin: the unique gallotannins with promising anti-carcinogenic potential. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, 4(2), 208–216.

63- Mora, J. I., Pott, D. M., Rojas Osorio, S. C., & Vallarino, J. G. (2022). Regulation of Plant Tannin Synthesis in Crop Species. *Frontiers in Genetics*, 13.

64- Singh, A. P., & Kumar, S. (2020). Applications of tannins in industry. *Tannins-structural properties, biological properties and current knowledge*, 1, 1-13.

65- Orlova, A. A., & Povydysh, M. N. (2019). Review of methods for the qualitative and quantitative analysis of tannins in plant materials. 4, 29–45.

66- Kumari, M., & Jain, S. (2015). Screening of Potential Sources of Tannin and Its Therapeutic Application. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(2), 26.

67- Pagliaro, M., Albanese, L., Scurria, A., Zabini, F., Meneguzzo, F., & Ciriminna, R. (2021). Tannin: A New Insight into a Key Product for the Bioeconomy in Forest Regions.

68- Das, A. K., Islam, Md. N., Faruk, Md. O., Dungani, R., Rosamah, E., Hartati, S., & Rumidatul, A. (2019). Hardwood Tannin: Sources, Utilizations, and Prospects.

69- Fraga-Corral, M., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Technological Application of Tannin-Based Extracts. *Molecules*, 25(3), 614.

70- Koopmann, A.-K., Schuster, C., Torres-Rodríguez, J., Kain, S., Pertl-Obermeyer, H., Petutschnigg, A., & Hüsing, N. (2020). Tannin-Based Hybrid Materials and Their Applications: A Review. *Molecules*, 25(21), 4910.

71- Zagoskina, N., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*.

72- Chettry, U., Chrungoo, N. K., & Pathak, J. (2024). Flavonoid Biosynthesis and Regulation: Keys to Understanding Plant Adaptation. *International Journal For Multidisciplinary Research*, 6(1).

73- Kundu, D., Talukder, P., & Raychaudhuri, S. S. (2019). In Vitro Biosynthesis of Polyphenols in the Presence of Elicitors and Upregulation of Genes of the Phenylpropanoid

Chapitre III : Métabolites secondaire

- Pathway in *Plantago ovata* (Vol. 60, pp. 299–344). Elsevier.
- 74- Kishimoto, S., Sato, M., Tsunematsu, Y., & Watanabe, K. (2016). Evaluation of Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*, 21(8), 1078.
- 75- Perera, W. H. P. A. D., Senadeera, M. N., & Udukala, D. N. (2024). Past, Present, and Future of Alkaloid-Based Anticancer Agents (pp. 22–47).
- 76- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- 77- Wink, M. (2010). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. (Annual Plant Reviews, Vol. 40).
- 78- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Associates.
- 79- Roberts & Wink (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer.
- 80- Aryal, B., Raut, B. K., Bhattarai, S., Bhandari, S., Tandan, P., Gyawali, K., Sharma, K., Ranabhat, D., Thapa, R., Aryal, D., Ojha, A. K., Devkota, H. P., & Parajuli, N. (2022). Potential Therapeutic Applications of Plant-Derived Alkaloids against Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 1–18.
- 81- Ka, S., Koirala, M., Merindol, N., & Desgagné-Penix, I. (2020). Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*, 25(21), 4901.
- 82- Dey, P. K., Kundu, A., Chakraborty, H. J., Kar, B., Choi, W. S., Lee, B. M., Bhakta, T., Atanasov, A. G., Atanasov, A. G., & Kim, H. S. (2019). Therapeutic value of steroidal alkaloids in cancer : Current trends and future perspectives. *International Journal of Cancer*, 145(7), 1731–1744.
- 83- Madla, S., & Graidist, P. (2016). Several Alkaloids Derived from Plants and Their Underlying Molecular Mechanisms of Action in the Fight Against Cancer. *Southern Medical Journal*, 35(1), 83–94.
- 84- Khan, H. R., Alam, W., Alsharif, K. F., Aschner, M., Pervez, S., & Saso, L. (2022). Alkaloids and Colon Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications for Cell Cycle Arrest. *Molecules*, 27(3), 920.
- 85- Araújo, D. C. de M. (2022). The naturally-derived alkaloids as a potential treatment for COVID-19: A scoping review. *Phytotherapy Research*, 36(7), 2686–2709.
- 86- Mierza, V., Antolin, A., Ichسانی, A., Dwi, N. R. D. N., Sridevi, S., & Dwi, S. (2023). Research Article: Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid. *Jurnal Surya Medika*, 9(2), 134–

Chapitre III : Métabolites secondaire

141.

87- Fan, M., Yuan, S., Li, L., Zheng, J., Zhao, D., Wang, C., Wang, H., Liu, X., & Liu, J. (2023). Application of Terpenoid Compounds in Food and Pharmaceutical Products. *Fermentation*, 9(2), 119.

88- Santos, L. S., Pavam, C. H., Almeida, W. P., Coelho, F., & Eberlin, M. N. (2004). Probing the mechanism of the Baylis–Hillman reaction by electrospray ionization mass and tandem mass spectrometry. *Angewandte Chemie*, 116(33), 4430-4433.

Partie expérimentale

Chapitre IV

Matériels et méthodes

IV .1. Introduction :

Afin d'effectuer cette étude, un protocole expérimentale précis a été élaboré dans le but d'évaluer à la fois les propriétés phytochimiques ainsi que les activités biologiques de deux plantes endémiques de l'Est algérien à savoir : *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* et *Brassica insularis* Moris, espèces appartenant à la famille des Brassicacées, reconnue pour la richesse de ses métabolites et son potentiel bioactif.

Cette section expose de manière précise l'ensemble des étapes expérimentales suivies, depuis la collecte des espèces étudiées jusqu'à l'application des différentes techniques de phytochimie (extraction, analyse quantitative et qualitative des extraits) ainsi que les méthodes utilisés pour l'évaluation des propriétés biologiques.

Le but est de garantir la robustesse et la fiabilité des résultats, tout en soulignant la pertinence méthodologique des approches sélectionnées pour la comparaison des deux espèces végétales.

IV. 2. Matériel végétal :

IV. 2. 1. Présentation des espèces étudiées :

Pour ce travail, deux espèces endémiques de la famille des Brassicaceae ont été choisies : *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* (Coss) et *Brassica insularis* Moris.

Brassica fruticulosa subsp. *Numidica* (Coss) représente une sous-espèce exclusivement endémique de la région nord-est de l'Algérie, principalement présente dans les régions côtières et sublittorales de Kabylie et de l'Est algérien [1,2]. Malgré son affiliation au genre *Brassica*, qui est connu pour la diversité de ses métabolites secondaires, cette plante est rarement examinée.

Brassica insularis Moris est une espèce méditerranéenne peu commune, observée en Algérie dans quelques localités de l'Est, généralement en symbiose avec des environnements rocheux et littoraux. En raison de son statut endémique régional et de sa faible population [1], cette espèce suscite un intérêt particulier pour des études approfondies, à la fois en termes de biodiversité et de valorisation chimique et pharmacologique.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Ces deux espèces constituent un précieux patrimoine naturel qui n'a pas encore été pleinement exploré, ce qui justifie la nécessité d'approfondir leur étude sur le plan phytochimique et biologique.

IV. 2. 2. Présentation de la région d'étude :

La wilaya d'Annaba, localisée dans le nord-est de l'Algérie, s'étend sur une superficie d'environ 1439 km² et est distante d'environ 600 km d'Alger. La région est délimitée au nord par la mer Méditerranée, à l'est par la wilaya d'El Tarf, à l'ouest par Skikda et au sud par Guelma. Le paysage est diversifié, incluant une côte étendue avec des plages et des promontoires rocheux, des plaines fertiles telles que celle de la Seybouse, ainsi que la chaîne forestière de l'Edough qui s'élève à plus de 1000 mètres d'altitude.

D'un point de vue floristique, on observe à Annaba une végétation méditerranéenne caractérisée par la présence de forêts de chêne-liège (*Quercus suber*), de pin d'Alep (*Pinus halepensis*) et de chêne zéen (*Quercus canariensis*). Cette région constitue également un important réservoir de biodiversité, hébergeant diverses espèces endémiques et médicinales, notamment celles appartenant à la famille des Brassicaceae, telles que *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* et *Brassica insularis*, qui sont l'objet de la présente étude [1].

Les deux sites d'étude situés dans la wilaya d'Annaba au nord-est de l'Algérie, la Voile Noire et le Cap de Garde constituent deux sites littoraux d'intérêt écologique majeur.

L'île rocheuse conique de La Voile Noire s'élève à 143 mètres au-dessus du niveau de la mer, se situant à l'extrémité d'une pointe avancée s'étendant sur environ 800 mètres en mer, rappelant la forme d'un navire à voile. Elle est une composante essentielle du site littoral de Seraïdi, localisé à l'est d'Annaba (Figure IV.1).

Le Cap de Garde, connu également sous le nom de Ras el-Hamra, délimite la baie d'Annaba et couvre une superficie d'environ 30 hectares, située à seulement 8 km du centre-ville et à 5 km de la zone urbaine. Il s'avance vers l'océan en s'étendant sur trois côtés (nord, est, sud), comportant un phare historique construit en 1862 qui s'élève à environ 17,5 mètres au-dessus du niveau de la mer. Idéalement situé au pied du massif de l'Edough, un massif montagneux couvert de forêts méditerranéennes dominé par les chênes lièges, les bruyères et

Chapitre IV : Matériels et méthodes

l'arbousier, et désigné parc national en 2018, le Cap de Garde profite d'un climat méditerranéen humide avec des brumes estivales qui favorisent une biodiversité abondante (Figure IV.1.).

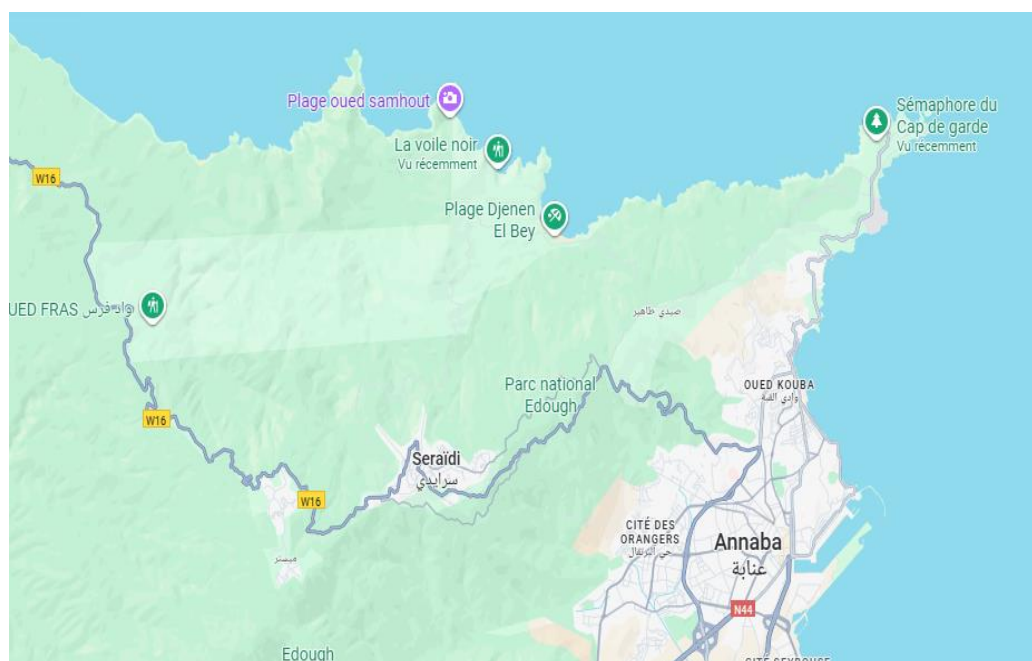


Figure IV.1. Situation géographique de la région d'étude.

Ces deux lieux sont des écosystèmes côtiers rocheux singuliers, définis par leurs microclimats, orientations et types de végétation propres. Ces zones ont été sélectionnées comme sites d'étude en raison de la présence d'espèces endémiques à haute valeur phytochimique telles que *Brassica insularis* Moris (Voile Noire) et *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* (falaises calcaires du Cap de Garde).

IV. 2. 3. Collecte et identification botanique :

La collecte de *Brassica insularis* Moris a été réalisée en mars 2022, tandis que celle de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* a eu lieu en décembre 2023.

Les plantes ont été collectées de manière manuelle, puis déposés dans des sacs en papier kraft avant d'être transportés au laboratoire en vue de leur traitement.

L'identification botanique a été effectuée à l'aide de la flore de référence « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales » [1], et confirmée par le professeur Hamel Tarek, botaniste du département de biologie de, Université BADJI Mokhtar -Annaba.

IV. 2. 4. Préparation des échantillons :

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Les plantes collectées ont été méticuleusement nettoyées, puis séchées à température ambiante (25-30 °C), à l'abri de la lumière et dans un environnement bien ventilé, dans le but de conserver les composés sensibles à la chaleur et à la lumière [3]. Une fois les plantes complètement sèches, les échantillons ont été réduits en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisés. Ils ont ensuite été stockés dans des flacons en verre hermétiques, protégés de la lumière et de l'humidité, en attendant leur utilisation.

IV. 3. Méthodes d'extraction :

L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée à partir de la poudre sèche issue des parties aériennes de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* et de *Brassica insularis* Moris, utilisée comme matière première.

IV. 3. 1. Extraction par macération :

La poudre végétale séchée a été soumise à une extraction par macération. Une masse de 10 g de poudre a été ajoutée à un erlenmeyer renfermant 100 mL d'un solvant adéquat tel que l'éthanol, l'acétate d'éthyle ou le dichlorométhane. Le mélange a été agité de manière intermittente et maintenu à température ambiante pendant 24 heures.

À l'issue de cette période de contact, le macérât est filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman n°4. Les résidus solides sont ensuite remacérés dans une nouvelle quantité de solvant, selon le même protocole expérimental. Cette opération a été effectuée trois fois successivement afin d'assurer une extraction maximale des constituants.

Les filtrats issus des trois macérations ont été regroupés, puis concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température contrôlée, comprise entre 35 et 40 °C, jusqu'à obtention d'un extrait brut [4]. Le poids de l'extrait sec obtenu est mesuré, puis l'échantillon a été conservé dans un flacon hermétique, à l'abri de la lumière et maintenu à basse température (4 °C), en vue des analyses ultérieures.

IV. 3. 2. Extraction par ultrasons :

Chapitre IV : Matériels et méthodes

L'extraction par ultrasons a été effectuée dans un bain à ultrasons (fréquence : 40 kHz ; puissance : 200 W), à température ambiante (30–35 °C). La poudre végétale (10 g) a été mise en suspension dans 100 ml de solvant (méthanol, éthanol), et soumise à une sonication de 30 minutes, afin de faciliter la libération des composés phytochimiques en perturbant les parois cellulaires [5]. Après filtration, l'extrait a été concentré au rotavapor, puis séché à l'étuve à 40 °C [4].

IV. 3. 3. Extraction par Soxhlet :

La méthode de Soxhlet a été mise en œuvre en prenant 25 g de poudre végétale, introduit dans une cartouche en cellulose, puis soumis à une extraction séquentielle avec des solvants de polarité croissante : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol. Chaque extraction a duré environ 2 à 3 heures, avec un volume de 250 ml de solvant. Les extraits ont ensuite été concentrés par évaporation rotative, puis conservé à une température de 4°C dans des flacons en verre ambré.

Tableau IV.1. Protocole d'extraction par Soxhlet de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*.

| Solvants | Héxane | Chloroforme | Acétate d'éthyle | Éthanol |
|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| Nombre de cycles | 6 | 7 | 5 | 7 |
| Durée de cycle | 40 - 35 min | 25 - 18 min | 20 - 15min | 30 - 25 min |

Tableau IV.2. Protocole d'extraction par Soxhlet de *Brassica insularis* Moris.

| Solvants | Héxane | Chloroforme | Acétate d'éthyle | Éthanol |
|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| Nombre de cycles | 8 | 9 | 5 | 10 |
| Durée de cycle | 20 - 15 min | 25 - 20 min | 20 - 15 min | 30 - 20 min |

IV. 3. 4. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction a été déterminé en utilisant selon l'équation :

$$R(\%) = \frac{M_E}{M_P} \times 100$$

M_E : masse de l'extrait sec obtenu (g),

M_P : masse initiale de la poudre végétale utilisée (g).

IV. 3. 5. Préparation des échantillons pour les analyses :

Après l'obtention des extraits bruts par différentes techniques d'extraction (macération, ultrasons et Soxhlet), des préparations spécifiques ont été effectuées en vue des analyses phytochimiques qualitatives et quantitatives.

➤ Séchage et conservation des extraits

Les extraits concentrés ont été séchés dans une étuve à 40 °C afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant.

Les poudres sèches obtenues ont été conservées dans des flacons en verre ambré, hermétiquement fermés, et stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

➤ Préparation des solutions mères

Pour chaque analyse, une solution mère de concentration 5 mg/ml a été préparée en dissolvant une quantité appropriée de l'extrait sec dans le solvant adéquat le méthanol, ou le DMSO selon le test.

IV. 4. Analyse phytochimique :

IV. 4. 1. Criblage phytochimique :

Une analyse qualitative de criblage phytochimique a été effectuée en suivant la technique de Harborne [3], afin de révéler la présence des grands groupes chimiques tels que les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les coumarines, les alcaloïdes, les cardénolides, les stérols, les terpènes et les lipides.

IV. 4. 1. 1. Test des flavonoïdes :

Macérer 2g de poudre végétale pulvérisée dans 40ml de HCl dilué à 1% pendant 24h. Après filtration, prendre 2 ml du filtrat et ajouter de NH₄OH pour le rendre basique. La présence des flavonoïdes est indiquée par l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure de tube.

IV. 4. 1. 2. Test des tanins :

Faire macérer 2g de poudre végétal dans l'éthanol à 1% pendant 2 heures. Après filtration, ajouter au filtrat quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ à 2% (2g FeCl₃ dans 100ml de C₂H₅OH). La présence des tanins s'indique par l'apparition soit d'une couleur verte (tanins cathéchiques) ou bleu-noir (tanins galliques).

IV. 4. 1. 3. Test des saponines :

Faire chauffer un mélange de 2g de matériel végétal dans 50ml de H₂O jusqu'à ébullition, après filtration laisser le mélange refroidir. Puis mettre quelques millilitres du filtrat dans un tube à essais et l'agite fortement. L'apparition d'une partie mousseuse indique la présence des saponines.

IV. 4. 1. 4. Test des coumarines :

La solution à examiner a été obtenue par macération de 0,5 g du lyophilisat préalablement préparé dans 10 ml d'éther éthylique pendant 24 heures. Par la suite, le mélange est filtré et le volume est ajusté à 10 ml. Un volume de 1 ml est prélevé, suivi de l'évaporation du solvant et de l'addition de 400 µl d'eau chaude au résidu. Par la suite, le mélange obtenu est réparti dans deux tubes à essai. Nous avons incorporé 100 µl de NH₄OH (25 %) à l'un des contenus. Nous avons soigneusement agité le mélange et procédé à l'observation de la fluorescence sous une lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 366 nm.

La détection des coumarines se manifeste par l'émission de fluorescence observée dans le tube.

IV. 4. 1. 5. Test des cardénolides :

Effectuer une macération de 2g de matière végétale dans 40 millilitres d'eau distillée pendant 2 heures. Après filtration, prélever 5ml du filtrat, puis l'extraire avec un mélange de 5ml de chloroforme et d'éthanol. Éliminer la phase organique par évaporation et solubiliser le précipité dans 1,5 ml d'acide acétique. Incorporer quelques gouttes de FeCl_3 suivies de 0,5 ml de H_2SO_4 concentré.

L'observation de l'émergence d'une couleur vert-bleuté dans la phase acide, cela signale la présence de cardénolides.

IV. 4. 1. 6. Test des alcaloïdes :

Consiste à faire une macération de 1g de poudre végétale dans 10 ml de HCl à 1% sous agitation, pendant 2h. Après filtration, on ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer au filtrat. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

IV. 4. 1. 7. Test des stérols et terpènes :

Macération de 2g de drogue végétal dans 30ml d'éther de pétrole, pendant 24 heures. Après filtration et évaporation, faire dissoudre le résidu obtenu dans 0,5ml d'anhydride acétique et 0,5ml de CHCl_3 . L'ajout d'environ 1ml d'acide sulfurique concentré provoque l'apparition d'un cercle violet ou marron, qui vire progressivement au gris, cela indique la présence des stérols et de terpènes.

IV. 4. 1. 8. Test des lipides :

Macérer 3g de matière végétal dans 50 ml d'hexane pendant 24h. L'obtention d'un extrait brute de texture huileuse après filtration et évaporation de mélange indique la présence des lipides.

IV. 4. 2. Dosage quantitatif :

IV. 4. 2. 1. Dosage des polyphénols totaux :

● Principe :

Le réactif de Folin–Ciocalteu subit une réduction par les composés phénoliques en milieu alcalin, ce qui conduit à la formation d'un complexe bleu qui est mesuré à 765 nm.

Les résultats sont exprimés en μg équivalents d'acide gallique par mg d'extrait sec [6,7].

● Protocole :

L'évaluation des taux des polyphénols totaux de l'extrait brut est réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Dans une fiole jaugée de 25 ml contenant initialement 9 ml d'eau distillée, on introduit 1ml d'extrait de plante ou de la solution de l'acide gallique à des concentrations (20, 40, 60, 80, 100 mg/l). Suite à l'ajout de 1,0 ml de réactif de Folin–Ciocalteu et son agitation, la solution a été laissée en réaction pendant 5 min. Ensuite, 10,0 ml de Na_2CO_3 (7 % m/v) ont été introduite, puis le volume a été ajusté jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Après incubation de 90 min à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc (une solution de méthanol [8]).

La teneur en polyphénols des échantillons analysés sont déterminées par la relation suivante :

$$\text{Teneur totale en polyphénols } (\mu\text{g EAG} / \text{mg ES}) = (C \times V) / m_{\text{ES}}$$

C = concentration équivalente en acide gallique ($\mu\text{g/ml}$),

V = volume total de l'extrait (ml),

m_{ES} = masse d'extrait sec (mg, d'extrait sec).

IV. 4. 2. 2. Dosage des flavonoïdes totaux :

● Principe :

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique dérivé des protocoles classiques avec quelques ajustements. Le principe de cette méthode repose sur la

Chapitre IV : Matériels et méthodes

réaction de formation d'un complexe entre les flavonoïdes et AlCl_3 , ce qui entraîne une coloration rose dont l'intensité varie en fonction de la concentration en flavonoïdes. La couleur est quantifiée par spectrophotomètre et ensuite confrontée à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la catéchine comme standard [9].

● **Protocole :**

Dans des fioles jaugées de 10 ml contenant 4 ml d'eau distillée, 1 ml d'extrait ou de solution étalon de catéchine (20, 40, 60, 80 et 100 mg/l) a été ajouté. À l'instant $t = 0$, 0,3 ml de NaNO_2 à 5 % (p/v) ont été introduits ; après 5 minutes, 0,3 ml de AlCl_3 à 10 % (p/v) ont été incorporés, suivis, 5 minutes plus tard, de l'addition de 2 ml de NaOH 1M. Immédiatement après, 2,4 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange réactionnel, puis celui-ci a été agité vigoureusement. L'absorbance de la solution rose obtenue a été effectuée à une longueur d'onde de 510 nm en comparaison avec un blanc (méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre. Le teneur des flavonoïdes totaux a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la catéchine comme standard. Les résultats ont été rapportés en microgrammes équivalents catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EC}/\text{mg ES}$). Les analyses ont été effectuées en trois répétitions afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus.

IV. 4. 3. Caractérisation des métabolites par LC-MS/MS :

IV. 4. 3. 1. Principe de l'analyse LC-MS/MS :

L'analyse par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-ESI-MS/MS) repose sur deux étapes complémentaires.

Séparation chromatographique (UPLC) : les composés phénoliques et flavonoïdiques présents dans les extraits sont séparés sur une colonne C18 en fonction de leurs affinités différentielles avec la phase stationnaire et la phase mobile (mélange eau/acide formique et méthanol). L'utilisation d'un gradient d'élution permet de séparer efficacement les molécules, même lorsqu'elles sont de structures proches.

Détection et identification (MS/MS) : à la sortie de la colonne, les molécules sont ionisées par électrospray (ESI) et introduites dans l'analyseur de masse. En mode MRM

Chapitre IV : Matériels et méthodes

(Multiple Reaction Monitoring), un ion précurseur caractéristique de chaque composé est sélectionné, fragmenté, puis un ou plusieurs ions produits spécifiques sont détectés. Cette approche assure une grande sensibilité et une sélectivité élevée, permettant à la fois l'identification et la quantification précise des analytes par rapport à des standards.

IV. 4. 3. 2. Protocole expérimental (UPLC-ESI-MS/MS) :

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un système Shimadzu UPLC-ESI-MS/MS 8040 équipé de la technologie UFMS. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Restek Ultra C18 (3 μ m, 150 \times 4,6 mm) maintenue à 30 °C. La phase mobile était constituée de solvant A (eau + 0,1 % d'acide formique) et de solvant B (méthanol), selon un gradient spécifique (tableau

Tableau IV.3. Conditions du gradient d'élution

| Extrait | Gradient |
|--|-------------------------|
| Extrait acétate d'éthyle de <i>Brassica insularis</i> Moris (extraction par macération) | 0 min to 0.2min A 98 % |
| | 0.2 min to 7.5min A 25% |
| | 7.5 min to 12.5min A 0% |
| | 12.5 min to 17min A 0% |
| | 17 min to 18min A 98% |
| Extrait éthanolique de <i>Brassica insularis</i> Moris (extraction par macération); | 0 min to 0.2min A 98 % |
| | 0.2 min to 7.5min A 25% |
| | 7.5 min to 12.5min A 0% |
| | 12.5 min to 17min A 0% |
| | 17 min to 18min A 98% |
| Extrait éthanolique de <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> (extraction par macération). | 0.1min to 2 min A 95% |
| | 2 min to 15min A 95% |
| | 15 min to 18min A 5% |
| | 18 min to 20min A 5% |
| | 20 min to 30 min A 95% |
| Extrait acétate d'éthyle <i>Brassica</i> | 0.1min to 2 min A 95% |

Chapitre IV : Matériels et méthodes

| | | |
|---|--------------------|--------|
| <i>fruticulosa</i> (extraction par macération). | 2 min to 15min | A 95% |
| | 15 min to 18min | A 5% |
| | 18 min to 20min | A 5% |
| | 20 min to 30 min | A 95% |
| Extrait éthanolique de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> (extraction par ultrasons). | 0.1min to 2 min | A 95% |
| | 2 min to 15min | A 95% |
| | 15 min to 18min | A 5% |
| | 18 min to 20min | A 5% |
| Extrait méthanolique de <i>Brassica fruticulosa subsp. Numidica</i> (extraction par ultrasons). | 0 min to 0.2min | A 98 % |
| | 0.2 min to 7.5min | A 25% |
| | 7.5 min to 12.5min | A 0% |
| | 12.5 min to 17min | A 0% |
| | 17 min to 18min | A 98% |
| | 18 min to 21min | A 98% |

Le débit était de 0,20 mL/min, le volume d'injection de 5 µL, pour une durée totale d'analyse de 21 min.

Les conditions de la source ESI ont été fixées comme suit : gaz CID 230 kPa, tension de dynode de conversion -6,0 kV, température DL 250 °C, température du bloc chauffant 400 °C, débit de gaz de nébulisation 3,0 L/min, et débit de gaz de séchage 10,0 L/min.

Les données ont été acquises en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), permettant de sélectionner pour chaque analyte un ion précurseur et un ou plusieurs ions produits caractéristiques. La quantification a été réalisée par interpolation sur une courbe d'étalonnage établie à partir de standards préparés dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en µg de composé par g de matière sèche (µg/g MS) [10, 11].

IV. 5. Activités biologiques :

IV. 5. 1. Évaluation de l'activité antioxydante :

IV. 5. 1. 1. Piégeage du radical DPPH :

IV. 5. 1. 1. 1. Principe :

Le principe du test utilisant le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) repose sur la capacité des molécules antioxydantes à neutraliser ce radical libre stable, caractérisé par sa couleur violette intense. La réduction du DPPH par un antioxydant se manifeste par une diminution de l'intensité de couleur mesurable par spectrophotomètre, en corrélation avec la capacité de piégeage des radicaux libres des extraits [12].

IV. 5. 1. 1. 2 Protocole :

Une solution méthanolique de DPPH à 0,004% (P/V) (100 μ M) a été préparée fraîchement. 0,1 ml d'extraits ou de solution d'étalonnage de vitamine C à différente concentration ont été introduite dans 2,9ml de DPPH. Ensuite, le mélange a été incubé à l'obscurité, à température ambiante, pendant 30 minutes.

La mesure d'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant le méthanol comme blanc. L'activité antioxydante a été quantifiée en valeur IC_{50} (concentration inhibant 50 % du radical).

IV. 5. 1. 2. Piégeage du radical ABTS :

IV. 5. 1. 2. 1. Principe :

Le protocole du test utilisant l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) repose sur la formation du radical cation $ABTS^{+\bullet}$, qui présente une couleur bleu verte. Les antioxydants contenus dans les extraits réduisent ce radical, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance mesurable, proportionnelle à leur capacité de piégeage [13].

IV. 5. 1. 2. 2. Protocole :

Le radical ABTS^{•+} a été formé par la réaction entre une solution d'ABTS (7 mM) et de persulfate de potassium (2,45 mM), suivie d'une incubation à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. Avant utilisation, la solution a été diluée avec du méthanol afin d'obtenir une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à une longueur d'onde de 734 nm. Après avoir mélangé 0,1 ml d'extraits ou de solution d'étalonnage de vitamine C avec 4,9 ml de solution ABTS, l'absorbance a été mesurée suite à une incubation de 10 minutes. L'activité antioxydante a été exprimée en IC₅₀.

IV. 5. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique *in-vitro* :

IV. 5. 2. 1. Inhibition de l' α -amylase :

IV. 5. 2. 1. 1. Principe :

L'enzyme α -amylase catalyse la dégradation de l'amidon en sucres réducteurs. Le DNSA (acide 3,5-dinitrosalicylique) réagit avec ces sucres en présence de chaleur, ce qui conduit à la formation d'un complexe orangé dont l'absorbance est mesurée à 540 nm. La réduction de l'absorbance en présence d'un extrait indique une inhibition enzymatique [14].

IV. 5. 2. 1. 2. Protocole :

25 μ l d'extrait ont été mélangés avec 50 μ l d'une solution d' α -amylase, puis incubés pendant 10 minutes à 37°C. Par la suite, il convient d'ajouter un volume de 50 μ l d'amidon. Une deuxième période d'incubation de 10 minutes à une température de 37°C a été effectuée. Suite à l'incubation, on a ajouté 25 μ l d'acide hypochloreux (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iodé ont été introduits. L'absorbance a été mesurée à 630 nm. En utilisant l'acarbose comme substance de référence.

IV. 5. 2. 2. Inhibition de l' α -glucosidase :

IV. 5. 2. 2. 1. Principe :

L'enzyme α -glucosidase provenant de la levure catalyse la réaction d'hydrolyse du p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG) pour former du p-nitrophénol jaune, dont l'absorbance est mesurée à 405 nm. La diminution de l'absorbance en présence d'un extrait est indicative de l'inhibition [14].

IV. 5. 2. 2. 2. Protocole :

50 μ l d'extrait ont été mélangé avec 100 μ l de solution d'enzyme, avant d'incorporer 50 μ l d'une solution de substrat (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside).

Par la suite, il convient d'utiliser un spectrophotomètre pour quantifier l'absorbance à une longueur d'onde 405 nm, à une température de 37 °C. La première absorbance est effectuée 10 minutes après l'addition du substrat, suivie d'une deuxième mesure est après 30 minutes d'incubation.

IV. 5. 3. Activité anti-Alzheimer — Inhibition de l'AChE et de la BChE :

IV. 5. 3. 1. Principe :

L'enzyme AChE (ou BChE) catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylthiocholine (ou butyrylthiocholine) pour former de la thiocholine. La réaction de la thiocholine avec le réactif DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate), également connu sous le nom de réactif d'Ellman conduit à la formation d'un ion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate qui peut être mesuré par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 412 nm. La réduction de l'absorbance en présence d'un extrait indique l'inhibition de l'enzyme [15].

IV. 5. 3. 2. Protocole :

Le protocole consiste à incuber 20 μ L d'une solution d'AChE ou BChE dans un tampon de phosphate de sodium à 100 mM (pH 8,0) à 25°C pendant 15 minutes, en présence de 10 μ L de DTNB (0,5 mM) et 10 μ L d'acétylthiocholineiodure ou de S-butrylthiocholineiodure. Les

Chapitre IV : Matériels et méthodes

mesures sont ensuite prises à une longueur d'onde de 412 nm moment distincts : 0 minute pour la première mesure, 5 minutes pour la deuxième mesure, 10 minutes pour la troisième et 15 minutes pour la quatrième mesure.

Pour évaluer le pourcentage d'inhibition des enzymes AChE ou BChE par rapport au blanc (éthanol avec un tampon phosphate pH 8), on utilise la formule $(E - S) / E * 100$.

IV. 5. 4. Évaluation de l'activité antimicrobienne :

IV. 5. 4. 1. Principe :

L'activité antimicrobienne a été évaluée contre plusieurs micro-organismes pathogènes d'importance clinique, en utilisant la méthode de micro dilution en milieu liquide. Cette technique est recommandée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la plus faible concentration d'extrait capable d'inhiber totalement la croissance visible du micro-organisme testé [16].

IV. 5. 4. 2. Micro-organisme testés :

- ◆ **Bactéries à Gram négatif** : *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- ◆ **Bactéries à Gram positif** : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*.
- ◆ **Levures pathogènes (*Candida spp.*)** : *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* et *Candida tropicalis*.

IV. 5. 4. 3. Protocole :

Les extraits ont été solubilisés dans du DMSO et dilués en série dans des microplaques stériles de 96 puits (3,0–0,18 mg/ml), en maintenant une concentration finale de DMSO < 1 %. Les inocula microbiens, préparés à partir de cultures fraîches (18–24 h) et ajustés à $4,6 \times 10^7$ UFC/ml, ont été ajoutés aux puits (100 μ l), portant le volume final à 200 μ l. Les contrôles incluaient : amikacine (AK10) et amoxicilline-acide clavulanique (AMC30) pour les bactéries, amphotéricine B (AM-B) pour les levures (contrôles positifs), DMSO < 1 % (contrôle négatif)

Chapitre IV : Matériels et méthodes

et milieu seul (contrôle stérile). Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h, puis la croissance microbienne a été évaluée par lecture de l'absorbance à 620 nm. La CMI a été déterminée comme la plus faible concentration d'extrait inhibant totalement la croissance microbienne [17].

IV. 5. 5. Évaluation du potentiel inhibiteur de la formation de biofilm :

IV. 5. 5. 1. Principe :

Les biofilms bactériens constituent un mode de croissance communautaire associé à une forte tolérance aux antibiotiques et à des infections chroniques récurrentes. L'évaluation du potentiel inhibiteur des extraits sur la formation de biofilm a été réalisée à l'aide de la méthode de coloration au cristal violet en microplaque. Cette méthode permet de quantifier la biomasse totale du biofilm formé en présence ou en absence d'extraits végétaux [18, 19].

IV. 5. 5. 2. Micro-organismes testés :

Quatre souches cliniquement pertinentes ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des biofilms et leur implication dans les infections nosocomiales :

- ✓ *Acinetobacter baumannii*
- ✓ *Klebsiella pneumoniae*
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ *Enterococcus faecium*

Ces espèces sont fortement associées à la résistance antimicrobienne et aux infections persistantes liées aux biofilms [18, 19].

IV. 5. 5. 3. Protocole :

Les bactéries ont été cultivées pendant une nuit dans un bouillon BHI supplémenté en 1 % de glucose, puis diluées à 5×10^5 UFC/mL. Dans des microplaques stériles en PVC à 96 puits, 100 µL de suspension bactérienne et 100 µL d'extrait (méthanolique ou éthanolique) à concentration sub-inhibitrice (Sub-MIC) ont été ajoutés. Les contrôles comprenaient : milieu seul (contrôle négatif), inoculum sans extrait (contrôle de croissance) et ciprofloxacine à faible

Chapitre IV : Matériels et méthodes

concentration (contrôle positif). Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS stérile (pH 7,2), puis les biofilms colorés avec du cristal violet à 0,1 % pendant 15 min. Après rinçage et séchage, le colorant fixé a été solubilisé avec de l'éthanol 95 % (ou acide acétique 33 %) et l'absorbance mesurée à 570 nm [20].

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{OD_{\text{contrôle}} - OD_{\text{échantillon}}}{OD_{\text{contrôle}}} \times 100$$

OD_{contrôle} : absorbance du biofilm formé sans extrait (contrôle de croissance).

OD_{échantillon} : absorbance du biofilm formé en présence d'extrait.

IV. 5. 6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro :

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro des extraits a été réalisée à travers le test d'inhibition de la dénaturation des protéines, méthode largement utilisée comme modèle simple et fiable pour la mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires des composés naturels et de synthèse.

IV. 5. 6. 1. Principe :

La dénaturation des protéines est un processus qui peut être induit par la chaleur ou par divers agents dénaturants. Elle se traduit par une perte de la structure tridimensionnelle native de la protéine, entraînant une altération de sa fonction biologique. Ce phénomène est impliqué dans plusieurs processus inflammatoires.

La capacité d'un composé à inhiber la dénaturation protéique est donc considérée comme un indicateur de son potentiel anti-inflammatoire.

Dans ce travail, l'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée comme protéine modèle. Les extraits à tester ont été comparés à un contrôle positif, le Diclofénac sodique (75 mg/3 ml), et à un contrôle négatif (BSA seul) [21, 22].

IV. 5. 6. 2. Réactifs utilisés :

-Albumine sérique bovine (BSA) : Protéine modèle utilisée pour évaluer la dénaturation.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Sert de substrat sensible aux conditions de dénaturation.

-Tampon (souvent : phosphate salin PBS ou Tris-HCl, pH 6,4 – 7,4) : Maintient un environnement stable pour la protéine.

-Contrôle positif : Diclofénac sodique (75 mg/3 ml injectable) : Anti-inflammatoire de référence, utilisé pour comparaison.

-Eau distillée (ou ultra pure) : Pour la préparation des solutions et dilutions.

-Solution de NaOH (1N ou 0,1N, selon méthode) : Parfois utilisée pour ajuster le pH après chauffage et stabiliser la lecture optique.

IV. 5. 6. 3. Protocole :

L'activité anti-inflammatoire in-vitro a été évaluée par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines, en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine modèle. Dans ce cadre, la BSA a été incubée en présence des échantillons à tester et comparée à deux témoins : un témoin négatif constitué de la protéine seule et un témoin positif représenté par le diclofénac sodique. Les mélanges obtenus ont été soumis à des conditions dénaturantes contrôlées, provoquant une altération de la conformation native de la protéine.

Après refroidissement, l'ampleur de la dénaturation a été évaluée par mesure spectrophotométrique de l'absorbance, puis les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Extract Abs} - \text{Control Abs})}{\text{Extract Abs}} \times 100 \right\}$$

Où Abs_{Extrait} correspond à l'absorbance du mélange contenant la BSA et l'échantillon étudié, tandis que Abs_{Contrôle} désigne l'absorbance du témoin négatif.

Les essais ont été réalisés en répliques afin d'assurer la fiabilité des données, et les résultats ont été soumis à une analyse statistique appropriée afin d'évaluer la signification des différences observées entre les échantillons et les témoins.

IV. 5. 7. Analyse statistique :

Toutes les données expérimentales ont été présentées comme la moyenne \pm écart-type (SD) sur la base de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant une analyse de variance à un facteur (ANOVA), suivie

Chapitre IV : Matériels et méthodes

du test post hoc de Tukey pour déterminer les différences significatives, avec un seuil de $p < 0,05$ considéré comme statistiquement significatif. Les valeurs d'IC₅₀ et les concentrations efficaces ont été déterminées par analyse de régression non linéaire. L'analyse des données et la génération de graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (Version 9.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Référence:

- 1-Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Eds. du Centre Nat. de la Recherche Scientifique.
- 2-Leïla, T. O. U. A. T. I., Tarek, H. A. M. E. L., & Amel, M. H. (2021). Analysis of rare and endemic flora in northeastern Algeria: the case of the wilaya of Souk Ahras. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 90(ISSN: 0037-9565).
- 3-Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- 4-M. N. J. Aripin, H. Julian, and T. W. Samadhi, “Enhancing the Quality of Natural Food Colorants by Novel Extraction and Concentration Processes,” *Food Reviews International* 40 (2024): 3899–3937.
- 5-Y.-W. Lin, C.-L. Tsai, C.-J. Chen, P.-L. Li, and P.-H. Huang, “Insights Into the Effects of Multiple Frequency Ultrasound Combined With Acid Treatments on the Physicochemical and Thermal Properties of Brown Rice Postcooking,” *LWT* 188 (2023): 115423.
- 6-Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *NOV'AE-Ingénierie et savoir-faire innovants, (spécial Cahier des techniques)*, 79-82.
- 7-VI, S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- 8-Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., & Sener, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 35-40.
- 9-Cédric, S. O., Joseph-Privat, O., Louis-Clément, O. E., Guy-Stéphane, P., Cheikna, Z., Jean-Bernard, B. O. N. G. U. I., ... & Edouard, T. A. (2016). Phytochemical screening, evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Erythrophleum ivorense* A. Chev (Leguminosae) and *Megaphrynium macrostachyum* Benth (Marantaceae), medicinal plants from Gabon. *International Journal of Biosciences*, 8(6), 43-53.
- 10-Wassima, L., Neghmouche Nacer, S., Abderrezzak, A., Bachir, H., Dehliz, A., Hammi, H., & Elsharkawy, E. R. (2024). Unveiling the therapeutic potential of *Haloxylon articulatum* extract: a comprehensive study on its phytochemical composition, antioxidant, antifungal, and antibacterial activities. *International Journal of Food Properties*, 27(1), 1290-1301.
- 11-Nacer, S. N., Wassima, L., Boussebaa, W., Abadi, A., Benyahia, I., Mouhoubi, D., ... & Moussaoui, Y. (2024). Phytochemical screening, antioxidant, antibacterial, and antifungal

Chapitre IV : Matériels et méthodes

properties of the *Cymbopogon citratus* methanolic extract. *Pharmacological Research-Natural Products*, 5, 100094.

12-Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.

13-Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

14-Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food chemistry*, 141(3), 2170-2176.

15-Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

16-Yang, B., Yang, H., Liang, J., Chen, J., Wang, C., Wang, Y., ... & Guo, J. (2025). A review on the screening methods for the discovery of natural antimicrobial peptides. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 15(1), 101046.

17-Dubale, S., Kebebe, D., Zeynudin, A., Abdissa, N., & Suleman, S. (2023). Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants in Ethiopia. *Journal of experimental pharmacology*, 51-62.

18-Vishwakarma, A., Dang, F., Ferrell, A., Barton, H. A., & Joy, A. (2021). Peptidomimetic polyurethanes inhibit bacterial biofilm formation and disrupt surface established biofilms. *Journal of the American Chemical Society*, 143(25), 9440-9449.

19-Sun, Y., Jiang, W., Zhang, M., Zhang, L., Shen, Y., Huang, S., ... & Zhang, K. (2021). The inhibitory effects of ficin on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *BioMed Research International*, 2021(1), 6692328.

20-Mary, T. R. J., Kannan, R. R., Iniyar, A. M., Ramachandran, D., & Vincent, S. G. P. (2021). Cell wall distraction and biofilm inhibition of marine *Streptomyces* derived angucycline in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104712.

21-Ariyo, O. O., Ajayi, A. M., Ben-Azu, B., & Aderibigbe, A. O. (2020). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract and fractions of *Morus mesozygia* Stapf (Moraceae) leaves and its underlying mechanisms in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 259, 112934.

22-Kim, J. K., Choi, E., Hong, Y. H., Kim, H., Jang, Y. J., Lee, J. S., ... & Cho, J. Y. (2021). Syk/NF- κ B-targeted anti-inflammatory activity of *Melicope accedens* (Blume) TG Hartley

Chapitre IV : Matériels et méthodes

methanol extract. Journal of Ethnopharmacology, 271, 113887.

Chapitre V

Résultats et discussion

V. 1. Criblage phytochimique :

Dans notre travail, les essais phytochimiques ont été réalisés selon les techniques Classiques décrites par Harborne [1].

L'analyse phytochimique des extraits de *Brassica insularis* Moris et *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* a révélé la présence de diverses classes marquantes de métabolites secondaires, avec différences significatives en termes d'intensité selon l'espèce dans le (Tableau V.1.). Ce genre de dépistage représente une étape cruciale dans la détermination la valorisation biologique et pharmacologique des espèces végétales [2].

Les résultats sont classés selon :

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

Tableau V.1. Screening phytochimique des deux plantes étudiées

| Métabolites secondaires | <i>Brassica insularis</i> Moris | <i>Brassica fruticulosa</i> subsp. <i>Numidica</i> |
|------------------------------|---------------------------------|--|
| Alcaloïdes | - | - |
| Flavonoïdes | +++ | +++ |
| Saponines | ++ | +++ |
| Tanins | +++ | +++ |
| Cardénolides | ++ | - |
| Stéroïdes et terpènes | +++ | ++ |
| Lipides | ++ | + |
| Coumarines | + | + |

L'absence des alcaloïdes chez les deux espèces est en accord avec les observations généralement constatées pour la majorité des espèces du genre *Brassica*, qui ont tendance à être pauvres en alcaloïdes ou à ne pas en accumuler de manière notable [3].

Cependant, elles possèdent toutes les deux une concentration élevée en flavonoïdes et tanins (+++), des éléments couramment répandus dans les Brassicaceae [4, 5], reconnus pour

Chapitre V : Résultats et discussion

leurs fortes capacités antioxydantes, anti-inflammatoires et leurs rôles protecteurs contre le stress oxydatif [4, 6].

Les saponines sont présentes de manière modérée dans *B. insularis* (++) mais fortement exprimées dans *B. fruticulosa* (+++), ces composés amphiphiles laissent entrevoir un potentiel immunomodulateur et antimicrobien plus prononcé chez cette dernière [7].

Les cardénolides qui sont absents chez *B. fruticulosa*, ont été identifiés en quantité modérée (++) chez *B. insularis*, ce qui représente une découverte significative étant donné que ces composés possèdent une activité cardiotonique et sont rarement signalés chez les *Brassicaceae* [8].

En ce qui concerne les stérols et terpènes, on observe une présence significative (+++) par rapport à *B. insularis*.

Les deux espèces renferment les lipides, avec une concentration abondante légèrement supérieure chez *B. insularis* [9]. Leur présence dans les extraits végétatifs pourrait indiquer un potentiel pour des usages cosmétiques ou dermatologiques.

Enfin, les deux espèces contiennent une quantité modeste (+) de coumarines en faible quantité (+), des composés aromatiques dotés de propriétés effets antioxydants et antimicrobiens bien établies [10].

Dans l'ensemble, malgré des profils phytochimiques similaires, *B. insularis* se caractérise par la présence exclusive de cardénolides ainsi qu'une concentration plus élevée en stérols et lipides, tandis que *B. fruticulosa* se distingue par sa teneur élevée en saponines, suggérant des applications thérapeutiques distinctes.

V. 2. Étude phytochimique et biologique des extraits de *B. insularis* Moris :

V. 2. 1. Extraction par macération :

V. 2. 1. 1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes :

Tableau V.2. Rendement et taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par macération de la partie aérienne de *Brassica insularis* Moris.

| Extrait | Rendement % | Polyphénols $\mu\text{g EAG/mg}$ | Flavonoïdes $\mu\text{g EC/mg}$ |
|------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Dichlorométhane | 0,39% | 118,18 \pm 0,88 | 101,69 \pm 1,53 |
| Acétate d'éthyle | 4,30% | 163,74 \pm 0,58 | 75,15 \pm 0,13 |
| Éthanolique | 12,60% | 254,49 \pm 0,35 | 34,54 \pm 0,38 |

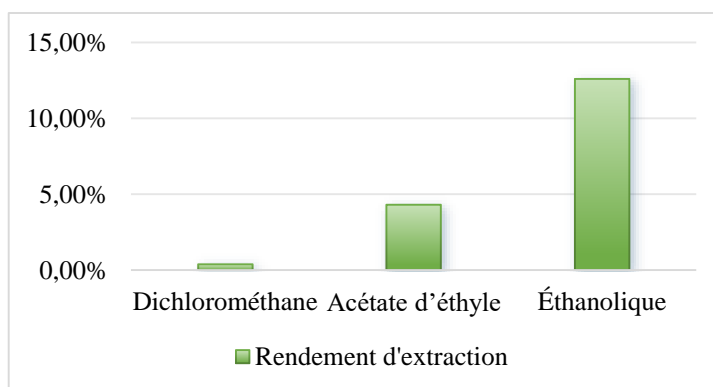


Figure V.1. Rendement d'extraction des extraits obtenus par macération de la partie aérienne de *Brassica insularis* Moris.

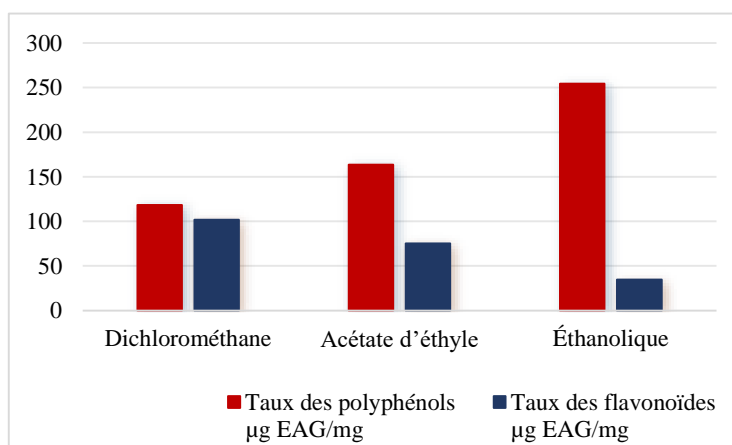


Figure V.2. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par macération de la partie aérienne de *Brassica insularis* Moris.

Chapitre V : Résultats et discussion

L'analyse des résultats présente dans le (Tableau V.2). Des extraits de *Brassica insularis Moris* obtenus à l'aide de solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétate d'éthyle et éthanol) a révélé des variations significatives en ce qui concerne le rendement d'extraction, ainsi que le taux en polyphénols et en flavonoïdes.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'impact significatif du solvant sur le rendement d'extraction et également sur la composition chimique des substances extraites comme il montre la (Figure V.1). L'éthanol solvant polaire donne un rendement d'extraction élevé avec un pourcentage de 12,60%, expliquant par la capacité des solvants polaire comme l'éthanol à extraire les métabolites secondaires hydrosoluble [11]. A l'inverse, le dichlorométhane, solvant apolaire donne le pourcentage de rendement le plus faible avec une valeur de 0,39 %, cela indique que la *Brassica insularis Moris* contient peu de composés lipophiles extraites dans ces conditions, et que leurs solubilités restent limitées dans les solvants apolaires [12]. D'autre part, l'acétate d'éthyle moyennement polaire présente un pourcentage de rendement moyen avec une valeur de 4,30%.

Concernant la teneur en polyphénols totaux, exprimée en μg équivalents d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg) (Figure V.2), l'extrait éthanolique présente le taux le plus élevé ($254,49 \pm 0,35 \mu\text{g}$ EAG/mg), suivi par l'acétate d'éthyle ($163,74 \pm 0,58 \mu\text{g}$ EAG/mg) et le dichlorométhane ($118,18 \pm 0,88 \mu\text{g}$ EAG/mg).

Les résultats obtenus sont cohérents avec plusieurs travaux antérieurs sur le genre *Brassica*, notamment *B. oleracea* et *B. rapa*, qui montrent également une extraction optimale des polyphénols avec des solvants polaires comme l'éthanol ou le méthanol confirment l'efficacité de l'éthanol pour l'extraction de composés phénoliques [13].

En revanche, on observe une évolution inverse en ce qui concerne la quantité totale de flavonoïdes, exprimée en μg équivalents de catéchine par mg d'extrait (μg EC/mg) Figure B. Le taux le plus élevé est déterminé avec l'extrait de dichlorométhane ($101,69 \pm 1,53 \mu\text{g}$ EC/mg), suivi par l'acétate d'éthyle ($75,15 \pm 0,13 \mu\text{g}$ EC/mg), alors que l'éthanol démontre la valeur la plus basse ($34,54 \pm 0,38 \mu\text{g}$ EC/mg). Cette répartition pourrait être attribuée à la composition chimique des flavonoïdes contenus dans l'échantillon, certains étant potentiellement plus hydrophobes, en particulier ceux comportant des groupes méthoxylés ou acétylés.

Chapitre V : Résultats et discussion

V. 2. 1. 2. Analyse chromatographique par LC-MS-MS :

L'analyse effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse -LC-MS-MS (voir annexe 1) a permis d'identifier qualitativement les composés chimiques présents dans les extraits éthanolique et acétate d'éthyle de *Brassica insularis* Moris, comme le montre (Tableau V.3.).

Tableau V.3. Composition chimique des extraits éthanoliques et acétate d'éthyle de *Brassica insularis* Moris déterminée par LC-MS-MS

| Extrait éthanolique | | | Extrait acétate d'éthyle | | |
|---------------------|--------|------------|--------------------------|--------|------------|
| Composés | Tr | % Relative | Composés | Tr | % Relative |
| Acide syringique | 4,853 | 0,06% | Acide férulique | 6,645 | 0,04% |
| Acide p-coumarique | 8,588 | 0,24% | Acide syringique | 7,606 | 0,03% |
| Resvératrol | 9,863 | 0,34% | Acide p- coumarique | 8,545 | 0,11% |
| Naringénine | 10,812 | 0,08% | Lutéoline | 8,584 | 0,03% |
| Thymol | 11,736 | 0,05% | Resvératrol | 9,865 | 0,16% |
| Acide folique | 12,567 | 0,01% | Curcumine | 10,490 | 0,004% |
| Riboflavine | 14,740 | 98,62% | Naringénine | 10,814 | 0,09% |
| Épicatéchine | 14,763 | 0,01% | Thymol | 11,577 | 0,04% |
| Bêta-Carotène | 15,540 | 0,58% | Acide cinnamique | 12,214 | 0,11% |
| Acide oléanolique | 16,572 | 0,008% | Acide folique | 12,438 | 0,02% |
| Acide picrique | 19,122 | 0,002% | Acide oléanolique | 14,601 | 0,006% |
| | | | Riboflavine | 14,741 | 99,23% |
| | | | Bêta-Carotène | 15,538 | 0,10% |
| | | | Acide caféique | 20,202 | 0,03% |

Les résultats révèlent des différences significatives dans la qualité et la distribution relative des substances bioactives entre les deux extraits. Ces variations, particulièrement marquées pour les composés phénoliques, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les vitamines et les triterpènes, illustrent l'influence majeure du solvant utilisé lors du processus d'extraction.

Chapitre V : Résultats et discussion

L'extrait éthanolique se distingue par une concentration particulièrement élevée en riboflavine (98,62 %), cela représente une caractéristique exceptionnelle en comparaison des profils phytochimiques généralement observés dans les espèces du genre Brassica [14]. La riboflavine, également connue sous le nom de vitamine B2, est essentielle pour les réactions d'oxydo-réduction en raison de ses formes Coenzymatiques (FMN et FAD) [15] ; Également, une concentration élevée de cette vitamine suggère un potentiel nutritif significatif pour cette espèce endémique. Des recherches indiquent que la riboflavine pourrait avoir un effet neuroprotecteur en améliorant le métabolisme énergétique des neurones et en réduisant le stress oxydatif, deux éléments essentiels dans le développement de la maladie d'Alzheimer [16].

En plus de la riboflavine, plusieurs autres composés antioxydants ont été identifiés, tels que le bêta-carotène (0,58 %), le resvératrol (0,34 %), l'acide p-coumarique (0,24 %), ainsi que des quantités plus faibles de naringénine, thymol, acide folique, acide syringique et acide oléanolique (**Tableau V.3.**). Ces composés métaboliques dérivés sont largement reconnus pour leurs diverses propriétés biologiques, y compris des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antidiabétiques et neuroprotecteurs [17].

Ce profil indique que l'éthanol, en tant que solvant polaire, facilite l'extraction de composés hydrosolubles ainsi que de certains composés lipophiles légèrement polaires tels que les polyphénols.

Le profil de l'extrait à l'acétate d'éthyle est également semblable, avec une prédominance marquée de riboflavine (99,23 %). Cependant, on remarque des différences notables. Par exemple, on note une extraction supérieure de certains composés phénoliques comme l'acide férulique (0,04 %), l'acide cinnamique (0,11 %) et l'acide p-coumarique (0,11 %), ce qui indique une préférence accrue de ce solvant pour les composés légèrement moins polaires [18].

L'acide férulique, en particulier, est attribué d'une activité antidiabétique et neuroprotectrice, grâce à ses propriétés antioxydantes, sa faculté à diminuer l'inflammation neurologique et prévenir les troubles cognitifs [19].

L'existence de la lutéoline (0,03%) et de la curcumine (0,004%), même en petites quantités, démontre également une extraction réussie de flavonoïdes possédant des capacités

Chapitre V : Résultats et discussion

antioxydantes, antidiabétiques [20 21], et neuroprotectrices puissantes [22, 23].

Les analyses LC-MS-MS menées révèlent une composition chimique variée et riche dans les extraits analysés, avec des différences marquées selon le solvant utilisé. L'extraction à l'éthanol a une portée plus large, englobant des composés aussi bien polaires que non polaires, tandis que l'acétate d'éthyle privilégie une extraction plus ciblée de certains acides phénoliques et flavonoïdes.

V. 2. 1. 3. Activités antioxydante :

L'activité antioxydante des extraits de *Brassica insularis* Moris représentée dans le **Tableau V.4.** A été évaluée via les méthodes DPPH et ABTS, montrant ainsi une capacité antioxydante remarquable, qui varie selon le solvant utilisé pour l'extraction.

Tableau V.4. Activité antioxydante des extraits obtenus par macération de *Brassica insularis* Moris évaluée par les tests DPPH et ABTS.

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Dichlorométhane | 12,98 ±0,04 | 71,84 ±1,59 |
| Acétate d'éthyle | 8,33 ±0,12 | 59,88 ± 1,50 |
| Éthanolique | 5,31 ±0,02 | 58,53 ±3,81 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3±7,4 |

Le test DPPH a démontré une activité antioxydante puissante avec une valeur d'IC₅₀ de 5,31 µg/ml surpassant même l'acide ascorbique (7,96 µg/ml) qui est utilisé comme antioxydant de référence. L'extrait à l'acétate d'éthyle exhibe une activité antioxydante notable (IC₅₀ = 8,33 µg/ml), tandis que l'extrait au dichlorométhane s'est avéré le moins actif (IC₅₀ = 12,98 µg/ml).

Cette efficacité est en accord avec la polarité des solvants utilisés, indiquant que la majorité des composés métabolique responsable de l'activité antioxydante sont principalement polaire ou semi-polaire, comme le démontre les résultats de l'analyse chromatographique. De plus, l'efficacité réduite de l'extrait dichlorométhane pourrait être due à sa capacité limite à extraire les composés hydrosolubles.

Chapitre V : Résultats et discussion

Les résultats du test ABTS subir une tendance similaire, même si les valeurs d'IC₅₀ soient globalement plus élevées pour tous des extraits. L'extrait éthanolique se distingue comme étant le plus actif (IC₅₀ = 58,53 µg/mL), démontrant une efficacité similaire à celle de l'acide ascorbique (58,3 µg/mL), suivi de près par l'extrait d'acétate d'éthyle (59,88 µg/mL). L'activité de l'extrait dichlorométhane est plus modérée, s'élevant à (71,84 µg/mL). Il est à souligner que le radical ABTS présente une sensibilité à une variété plus étendue de composés antioxydants, qu'ils soient hydrophiles ou lipophiles, ce qui pourrait expliquer les divergences constatées par rapport au test DPPH [24]

V. 2. 1. 4. Activité inhibition d'enzyme :

Les extraits de *Brassica insularis* Moris ont été analysés pour leurs potentiels inhibiteurs sur quatre enzymes clés : l'acétylcholinestérase (AChE), la butyrylcholinestérase (BChE), l' α -amylase et l' α -glucosidase. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau V.5. Évaluation in vitro de l'activité anti-cholinestérase et anti-diabétique des extraits par macération de *Brassica insularis* Moris

| Extrait | IC ₅₀ AChE (µg/ml) | IC ₅₀ BChE (µg/ml) | IC ₅₀ α - Amylase (µg/ml) | IC ₅₀ α - Glucosydase (µg/ml) |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|---|
| Dichlorométhane | 10,19 ±0,19 | 12,48 ±0,10 | 5079,20 ±1,47 | 175,96 ±1,24 |
| Acétate d'éthyle | 14,84 ±0,67 | 21,29 ±0,40 | 3404,39 ±0,93 | 149,59 ±0,01 |
| Éthanolique | 19,97 ±3,60 | 44,58 ±0,39 | 4264,12 ±0,12 | 122,46 ±0,45 |
| Galantamine* | 6,27 ±1,15 | 34,75 ±1,99 | - | - |
| Acarbose* | - | - | 3650,9 ±10,7 | 275,43 ±1,59 |

Les résultats soulignent le potentiel prometteur de ces extraits, notamment ceux issus de l'acétate d'éthyle et de l'éthanol, dans la régulation enzymatique associée aux troubles neurodégénératifs et au diabète de type 2.

Chapitre V : Résultats et discussion

L'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase sont deux types d'enzymes cholinestérases qui jouent un rôle crucial dans la décomposition des esters de choline par hydrolyse [25]. Il est important de souligner que l'acétylcholinestérase se caractérise par sa capacité à dégrader l'acétylcholine (ACh) de manière plus rapide que d'autres esters de choline, tandis qu'elle montre une activité réduite envers la butyrylcholine (BuCh) [26]. En contrepartie, la butyrylcholinestérase métabolise le BuCh et la propionylcholine plus efficacement que l'ACh [27].

Il est intéressant de mentionner aussi que le blocage de l'activité cholinestérasique peut favoriser la restauration de l'équilibre cholinergique, cette approche est fréquemment utilisée pour soulager les symptômes de la maladie d'Alzheimer [28].

Selon nos résultats, l'extrait de dichlorométhane révéla une forte capacité inhibitrice sur les enzymes cholinestérase AChE et BChE, avec des valeurs d'IC₅₀ de 10,19 et 12,48 µg/ml respectivement, valeurs qui se rapprochent de celles de la Galantamine, un inhibiteur de référence utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [29]. Ces résultats suggèrent que les composés lipophiles extraits par le dichlorométhane interagissent de manière efficace avec les sites hydrophobes des enzymes cholinestérases.

En outre, l'extrait acétate d'éthyle a présenté une activité modérée avec des valeurs d'IC₅₀ de 14, µg/ml pour l'AChE et de 21,29 µg/ml pour la BChE, tandis que l'extrait éthanolique a montré une activité plus faible, avec des valeurs d'IC₅₀ de 19,97 µg/ml pour l'AChE et de 44,58 µg/ml pour la BChE, soulignant ainsi une plus grande sélectivité envers l'AChE.

Cela pourrait être expliqué par la faible quantité d'acide oléanolique dans l'extrait éthanolique (**Tableau V.3.**), reconnu pour son activité neuroprotectrice [30]. Ainsi que, la faible concentration de curcumine dans l'extrait d'acétate d'éthyle (**Tableau V.3.**), qui est bien documentée pour ses effets antioxydants, anti-inflammatoires, et pour son activité inhibitrice des cholinestérases. En particulier, la curcumine est bien documentée pour ses effets antioxydants, anti-inflammatoires, ainsi que pour son activité inhibitrice des enzymes cholinestérases [31].

Cependant, la quantité limitée de ces composés pourrait justifier l'activité relativement

Chapitre V : Résultats et discussion

faible par rapport à l'extrait de dichlorométhane, dont le profil LC-MS n'a pas été établi dans cette étude, mais qui pourrait renfermer des composés hydrophobes actifs à des concentrations plus élevées.

D'autre part, les enzymes α -amylase et α -glucosidase sont des glucosides hydrolases agissant de manière exogène, également connues sous le nom glucosidases, ils sont indispensables pour l'hydrolyse des glucides au niveau de tractus intestinal [32].

L' α -amylase hydrolyse spécifiquement les liaisons α -D-(1,4) -glucane dans l'amidon, tandis que l' α -glucosidase hydrolyse les résidus terminaux non réducteurs de divers substrats glucidiques, entraînant la libération de l' α -glucosidase [33]. Les inhibiteurs de ces enzymes peuvent ralentir ce processus, ce qui les rend importants dans la prise en charge des troubles liés à l'absorption des glucides, tels que le diabète de type 2 et l'obésité [34].

En termes d'activité anti-enzymatique (α -amylase et α -glucosidase), tous les extraits de *Brassica insularis* Moris ont démontré une meilleure capacité inhibitrice contre les deux enzymes, surpassant l'acarbose (inhibiteur standard), en termes d'inhibition de l' α -glucosidase. L'extrait éthanolique s'est révélé être le plus actif avec une valeur de $IC_{50} = 122,46 \mu\text{g/ml}$, suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 149,59 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait au dichlorométhane qui a la plus grande valeur ($IC_{50} = 175,96 \mu\text{g/ml}$), tandis que l'acarbose a montré une valeur plus élevée ($IC_{50} = 275,43 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats valident l'efficacité antidiabétique de la plante étudiée, vraisemblablement due à la présence de resvératrol, dont les effets hypoglycémians ont été largement étudiés [35].

En ce qui concerne l'inhibition de l' α -amylase, elle s'est révélée être plus modeste pour tous les extraits, présentant une efficacité similaire à celle de l'acarbose uniquement pour l'extrait d'acétate d'éthyle ($IC_{50} = 3404,39 \mu\text{g/ml}$) contre une valeur de $3650,9 \mu\text{g/ml}$ pour l'acarbose.

Cette préférence marquée pour l'inhibition de l' α -glucosidase par rapport à l' α -amylase est bénéfique car elle contribue à réduire les effets indésirables gastro-intestinaux liés à une inhibition excessive de l' α -amylase [36].

V. 2. 2. Extraction par ultrasons :

Chapitre V : Résultats et discussion

Cette méthode a pour objectif principal de diminuer le temps d'extraction tout en améliorant le rendement.

V. 2. 2. 1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :

Nous avons regroupé dans le tableau suivant les valeurs des rendements d'extraction ainsi que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux de la partie aérienne de *Brassica insularis* Moris.

Tableau V.6. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de *Brassica insularis* Moris obtenus par extraction ultrasonique

| Extrait | Rendement % | Polyphénols $\mu\text{g EAG/mg}$ | Flavonoïdes $\mu\text{g EC/mg}$ |
|--------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Éthanolique | 11,13 | 310,56 \pm 0,44 | 28,69 \pm 0,13 |
| Méthanolique | 14,5 | 355,61 \pm 5,55 | 26,56 \pm 0,09 |

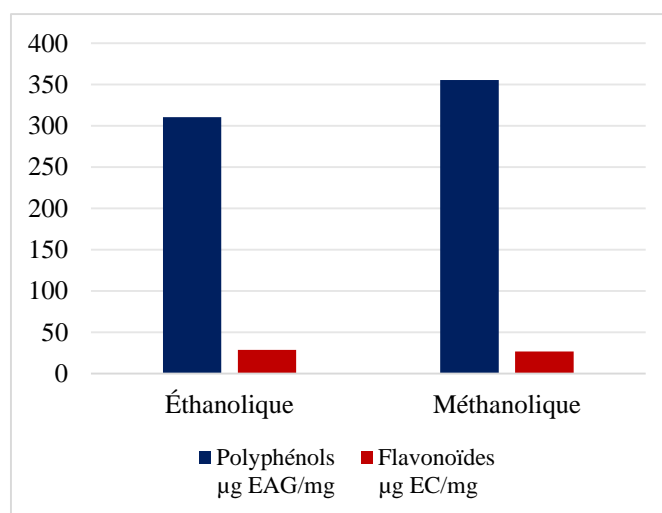


Figure V.3. Taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits méthanolique et éthanolique obtenus par extraction ultrasonique de *Brassica insularis* Moris.

Chapitre V : Résultats et discussion

Comme on peut le voir, les rendements varient en fonction du solvant employé. L'extrait méthanolique a présenté la valeur la plus élevée (14,5 %), tandis que l'extrait éthanolique a présenté une valeur de 11,13 %. Cette disparité peut s'expliquer par la polarité accrue du méthanol, qui facilite la dissolution d'une variété de composés polaires, tels que les polyphénols et certains flavonoïdes hydrosolubles [37].

Concernant le taux des composés polyphénoliques (**Figure V.3.**), l'extrait méthanolique a également révélé une valeur plus élevée (355,61 $\mu\text{g EAG/mg}$) comparativement à l'extrait éthanolique (310,56 $\mu\text{g EAG/mg}$). Plusieurs études précédentes ont démontré que le méthanol est généralement plus performant pour l'extraction des polyphénols des espèces appartenant au genre *Brassica* [38, 39], ce qui confirme notre résultat.

En outre, les résultats démontrent que l'extrait éthanolique est plus riche en flavonoïdes totaux avec une concentration de 28,69 $\mu\text{g EC/mg}$ par rapport à l'extrait méthanolique (26,56 $\mu\text{g EC/mg}$).

La différence des profils d'extraction observée entre les deux solvants souligne la nécessité de sélectionner soigneusement le solvant pour optimiser la valorisation des composés bioactifs.

Ainsi que, La combinaison de l'extraction assistée par ultrasons avec l'utilisation de solvants polaires a conduit à l'obtention d'extraits contenant une concentration élevée de polyphénols et de flavonoïdes. Le méthanol s'est avéré être plus efficace dans l'extraction des polyphénols totaux, alors que l'éthanol a légèrement amélioré l'extraction des flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec les informations disponibles dans la littérature concernant l'interaction synergique entre la polarité du solvant et l'ultrasonication pour améliorer l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques.

V. 2. 2. 2. Activité antioxydante :

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits éthanolique et méthanolique obtenus par extraction ultrasonique a été effectuée en utilisant les tests DPPH et ABTS (Tableau V.7).

Tableau V.7. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de *Brassica insularis Moris* obtenus par extraction ultrasonique

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Éthanolique | 7,25 ±0,03 | 58,07 ±8,45 |
| Méthanolique | 7,01 ±0,06 | 50,48 ±3,42 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3 ±7,4 |

Les deux extraits ont démontré une activité antioxydante significative, caractérisée par des valeurs d'IC₅₀ très faibles lors du test DPPH (environ 7 µg/mL). Ces valeurs sont similaires, voire légèrement supérieures, à celles de l'acide ascorbique (7,96 µg/mL), ce qui confirme le fort potentiel antioxydant de cette espèce. L'extrait méthanolique (7,01 µg/mL) présente une activité légèrement supérieure à celle de l'extrait éthanolique, ce qui suggère une plus grande efficacité du méthanol dans l'extraction des composés responsables de cette activité.

Lors du test ABTS, les deux extraits se distinguent de manière similaire, cependant l'extrait méthanolique (50,48 µg/mL) montre une activité plus prononcée que l'extrait éthanolique (58,07 µg/mL) ainsi que l'acide ascorbique (58,3 µg/mL). Cette disparité reflète une capacité accrue de capture des radicaux libres par l'extrait méthanolique, vraisemblablement due à sa haute teneur en composés phénoliques hydrosolubles.

Ces résultats reflètent avec diverses études portant sur le genre *Brassica*, qui mettent en évidence une activité antioxydante significative due à la présence de polyphénols, de flavonoïdes et de glucosinolates [40, 41].

De plus, l'utilisation de l'extraction assistée par ultrasons est un paramètre indispensable car elle permet de rompre les parois cellulaires et d'améliorer la libération des métabolites bioactifs, comme le montrent diverses études menées sur des plantes riches en antioxydants [42].

V. 2. 3. Extraction pas sohxlet :

V. 1. 3. 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

Les résultats de l'étude phytochimique des phases d'extraction par Soxhlet sont présentés dans le (Tableau V.8.) et illustrés par les Figure V.4. et Figure V.5. :

Tableau V.8. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de *Brassica insularis Moris* obtenus par extraction Soxhlet.

| Extrait | Rendement % | Polyphénols $\mu\text{g EAG/mg}$ | Flavonoïdes $\mu\text{g EC/mg}$ |
|------------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Phase hexane | 6,2 | 131,95 \pm 0,60 | 69,26 \pm 0,09 |
| Phase chloroforme | 0,91 | 188,75 \pm 0,85 | 70,72 \pm 0,04 |
| Phase acétate d'éthyle | 8,67 | 255,77 \pm 0,79 | 104,13 \pm 0,18 |
| Phase éthanol | 37,16 | 357,94 \pm 0,89 | 29,18 \pm 0,04 |

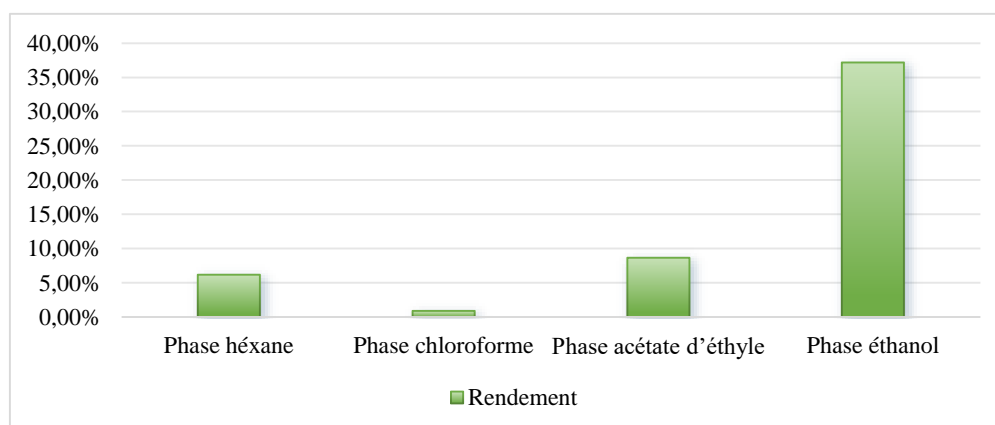


Figure V.4. Taux de rendement des extraits obtenus par extraction Soxhlet de *Brassica insularis Moris*.

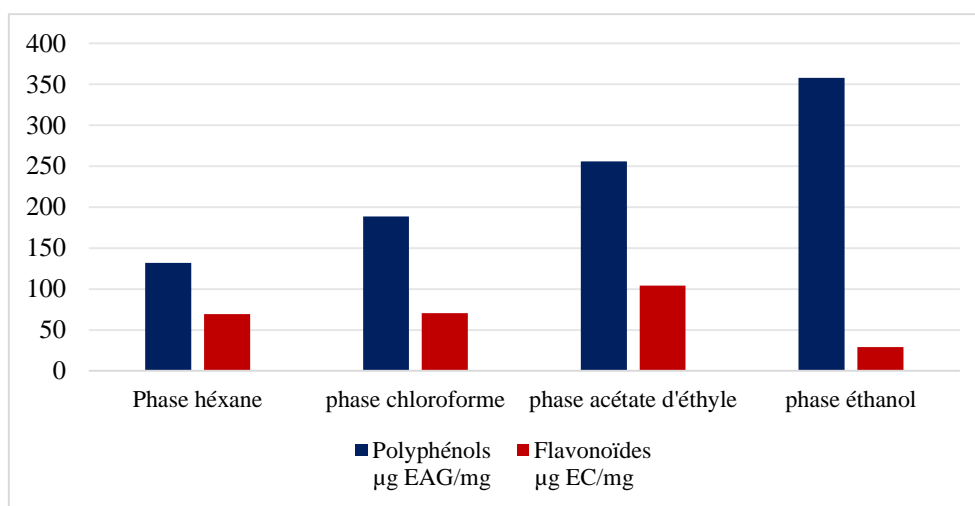


Figure V.5. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par extraction Soxhlet de *Brassica insularis Moris*.

L'analyse de ces résultats a montré l'effet de la méthode d'extraction et la durée de chaque fraction sur la qualité d'extrait. Les rendements d'extraction présentent une variation significative en fonction de la polarité du solvant. L'éthanol a démontré le rendement le plus élevé, atteignant 37,16 %, ce qui confirme son efficacité pour l'extraction d'un large éventail de composés polaires. Le taux de rendement obtenu avec l'acétate d'éthyle s'est situé à un niveau intermédiaire de 8,67 %, alors que les rendements des phases hexane (6,2 %) et chloroforme (0,91 %) étaient nettement inférieurs.

L'analyse quantitative de phases obtenues via soxhlet a mis en évidence des variations significatives en fonction du solvant d'extraction (**Figure V.5**), la composition en polyphénols et en flavonoïdes varie de façon significative. La phase éthanol présente une richesse particulière en composés phénoliques avec une valeur de 357,94 µg EAG/mg, suivie par la phase acétate d'éthyle avec une teneur de 255,77 µg EAG/mg, de plus les phases apolaires se distinguent par des teneurs plus faibles que les phases polaires et moyennement polaires. En revanche, la phase acétate d'éthyle se distingue par une richesse maximale en flavonoïdes avec une valeur de 104,13 µg EC/mg, suivie par les phases apolaires notamment la phase chloroforme avec une valeur de 70,72 µg EC/mg, et la phase hexane avec une teneur de 69,26 µg EC/mg, d'autre part pour la phase éthanol, malgré sa richesse en polyphénol elle présente une faible concentration en flavonoïdes.

Cette distribution variée reflète la sélectivité des solvants : l'éthanol, en raison de sa polarité élevée, favorise l'extraction de polyphénols hydrosolubles tels que les acides phénoliques et les tanins condensés, tandis que l'acétate d'éthyle favorise l'extraction des

Chapitre V : Résultats et discussion

flavonoïdes, qui sont principalement semi-polaires. En outre, les extraits d'hexane et de chloroforme montrent des concentrations moyennes de polyphénols et de flavonoïdes, ce qui confirme leur capacité limitée à dissoudre ces composés bioactifs.

V. 2. 3. 2. Activités antioxydante :

L'efficacité antioxydante des extraits de *Brassica insularis Moris* a été examinée à l'aide des tests DPPH et ABTS, et les données obtenues sont consignés dans le **Tableau V.9**.

Tableau V.9. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de *Brassica insularis Moris* obtenus par extraction Soxhlet

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Phase hexane | 7,52 ±0,11 | 65,68 ±1,66 |
| Phase chloroforme | 7,43 ±0,11 | 68,95 ±4,84 |
| Phase acétate d'éthyle | 6,06 ±0,12 | 45,72 ±2,58 |
| Phase éthanol | 7,25 ±0,12 | 50,78 ±3,13 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3 ±7,4 |

L'examen comparatif révèle que toutes les fractions démontrent une capacité significative à piéger les radicaux libres, même si l'efficacité varie en fonction du solvant d'extraction employé.

Pour le test DPPH, les valeurs de l'IC₅₀ allant de 6,06 à 7,52 µg/ml. La phase acétate d'éthyle a démontré la plus grande activité avec une valeur d'IC₅₀ de 6,06 µg/ml, suivi par la phase chloroforme (7,43 µg/ml), la phase éthanol (7,25 µg/ml) ainsi que la phase hexane (7,52 µg/ml). Il convient de souligner que toutes ces fractions montrent une activité similaire, voire supérieure à celle de l'acide ascorbique utilisé comme référence (IC₅₀ = 7,96 µg/ml).

En revanche, les résultats issus du test ABTS confirment la prééminence de la phase acétate d'éthyle (IC₅₀ = 45,72 µg/mL), suivi par la phase éthanol (50,78 µg/ml). Les phases hexane et chloroforme présentent une activité moindre (IC₅₀ = 65,68 et 68,95 µg/ml respectivement). Uniquement la phase acétate d'éthyle a montré une activité plus élevée que l'acide ascorbique (IC₅₀ = 58,3 µg/ml), ce qui confirme son importance dans l'activité antioxydante globale.

Chapitre V : Résultats et discussion

Ces résultats suggèrent que les métabolites secondaires extraits à l'aide de solvants semi-polaires tels que l'acétate d'éthyle jouent un rôle prépondérant dans l'activité antioxydante de *B. insularis*.

V. 3. Étude phytochimique et biologique des extraits de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* :

V. 3. 1. Extraction par macération :

V. 3. 1. 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

Le tableau ci-dessous (**Tableau V.10.**) regroupe les données relatives aux rendements d'extraction, ainsi qu'aux teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux, obtenus par macération de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

Tableau V.10. Rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* obtenus par macération.

| Extrait | Rendement % | Polyphénols $\mu\text{g EAG/mg}$ | Flavonoïdes $\mu\text{g EC/mg}$ |
|------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Dichlorométhane | 0,12 | 87,55 \pm 0,28 | 15,05 \pm 0,04 |
| Acétate d'éthyle | 1,11 | 160,93 \pm 4,74 | 82,46 \pm 0,20 |
| Éthanolique | 10,83 | 218,86 \pm 0,51 | 32,31 \pm 0,28 |

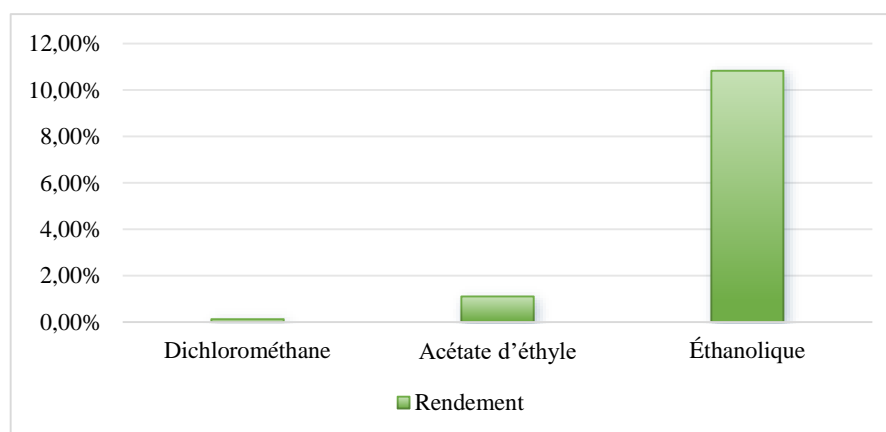


Figure V.6. Taux de rendement des extraits obtenus par extraction macération de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*

Chapitre V : Résultats et discussion

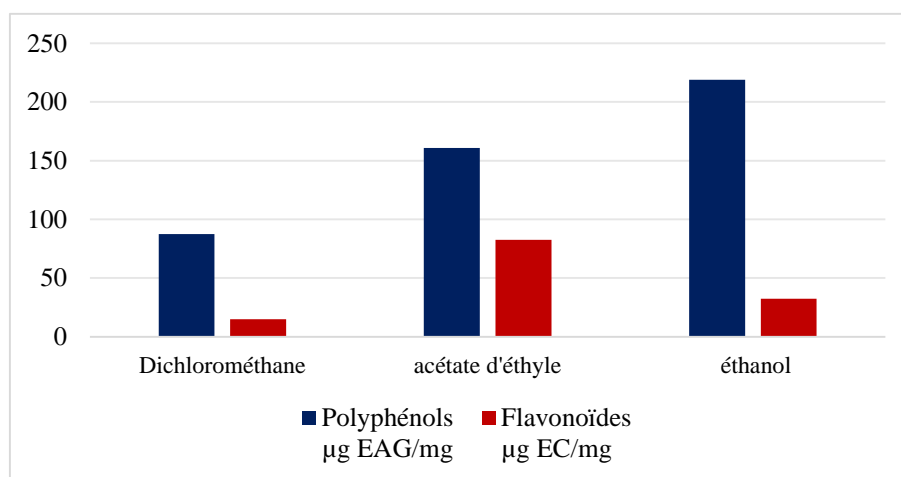


Figure V.7. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits obtenus par extraction macération de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*

Les résultats démontré l'impact significatif de la polarité de solvant sur le rendement d'extraction ainsi que sur la teneur en composé phénolique et en flavonoïdes totaux.

L'extrait à l'éthanol se caractérise par un rendement d'extraction optimal, atteignant 10,83 %, ainsi que par la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (218,86 µg EAG/mg). En revanche, sa concentration en flavonoïdes reste modérée, avec une valeur de 32,31 µg EC/mg. Ces résultats soulignent l'efficacité des solvants polaires, tels que l'éthanol, dans la solubilisation des composés phénoliques, et confirment les observations rapportées dans les études antérieures portant sur les extraits alcooliques des espèces du genre *Brassica* [13].

Par ailleurs, l'extrait d'acétate d'éthyle se distingue par un rendement relativement faible (1,11 %). Il a montré une concentration en polyphénols de 160,93 µg EAG/mg et se distingue également par sa richesse en flavonoïdes, atteignant 82,46 µg EC/mg. Cette confirmé par l'affinité des flavonoïdes pour les solvants de polarité moyenne [51].

En revanche, l'extrait au dichlorométhane a démontré une efficacité très restreinte avec un rendement de 0,12 %, Il affiche aussi des teneurs faibles en polyphénols (87,55 µg EAG/mg) et en flavonoïdes (15,05 µg EC/mg).

Ces résultats mettent en évidence l'insolubilité des métabolites principaux de cette plante dans des solvants faiblement polaires.

Par conséquent, ces résultats indiquent que l'éthanol est le solvant préféré pour extraire les polyphénols, tandis que l'acétate d'éthyle est plus approprié pour extraire sélectivement les flavonoïdes. Pour cela il est crucial de choisir le solvant d'extraction non seulement pour

Chapitre V : Résultats et discussion

optimiser le rendement, mais aussi de cibler les familles de métabolites d'intérêt dans le cadre de la valorisation nutraceutique et pharmaceutique de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*.

V. 3. 1. 2. Analyse chromatographique par LC-MS-MS :

L'étude réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse -LC-MS-MS (présentée en annexe 2) a permis d'identifier de manière qualitative les substances chimiques présentes dans les extraits éthanolique et acétate d'éthyle de *Brassica insularis* Moris, comme l'indique le **Tableau V.11.** :

Tableau V.11. Composition chimique des extraits éthanoliques et acétate d'éthyle de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica* déterminée par LC-MS-MS

| Extrait acétate d'éthyle | | | Extrait éthanolique | | |
|--------------------------|----------|------------|------------------------------------|----------|------------|
| Composés | Tr (min) | % Relative | Composés | Tr (min) | % Relative |
| Caféine | 9,595 | 2,65 | Acide acide 4-méthoxybenzoïque | 1,065 | 0,58 |
| Curcumine | 9,774 | 0,16 | Acide acide 3,5-dihydroxybenzoïque | 4,954 | 0,04 |
| Acide férulique | 13,012 | 1,36 | Acide férulique | 5,954 | 2,05 |
| Acide kojique | 13,649 | 0,36 | Acide chlorogénique | 8,423 | 0,72 |
| Bêta-Carotène | 15,795 | 11,54 | 8-hydroxyquinoline | 8,449 | 0,07 |
| Quercitrine | 17,171 | 0,73 | Vanilline | 8,775 | 0,16 |
| Merycetine | 17,372 | 0,73 | Curcumine | 9,604 | 1,59 |
| Esculine hydrate | 17,637 | 3,79 | Thymol | 9,671 | 0,11 |
| Hespérétine | 17,686 | 2,27 | Caféine | 9,860 | 1,61 |
| Rutine | 17,876 | 0,01 | Acide salicylique | 9,990 | 0,24 |
| Acide folique | 17,995 | 2,06 | Vitexine | 10,669 | 0,50 |
| Catéchine | 18,543 | 0,32 | Acide kojique | 10,986 | 0,17 |
| Acide oléanolique | 19,873 | 2,72 | Naringénine | 11,086 | 0,12 |
| Naringénine | 20,010 | 0,28 | Acide gallique | 11,998 | 0,01 |
| Acide coumarique | 20,136 | 5,78 | Bêta-Carotène | 15,759 | 0,14 |
| Acide cinnamique | 20,291 | 65,04 | Quercitrine | 17,105 | 0,58 |
| Thymol | 20,330 | 0,03 | Merycetine | 17,301 | 0,40 |
| Acide 4-méthoxybenzoïque | 20,760 | 0,09 | Acide oléanolique | 17,370 | 0,10 |
| Chryisine | 21,304 | 0,06 | Esculine hydrate | 17,515 | 1,87 |
| | | | Hespérétine | 17,634 | 0,43 |
| | | | Acide folique | 17,830 | 2,94 |
| | | | Catéchine | 18,378 | 0,12 |
| | | | Rutine | 19,363 | 9,36 |
| | | | Acide coumarique | 19,628 | 1,05 |
| | | | Acide cinnamique | 20,274 | 75,05 |

Chapitre V : Résultats et discussion

Comme on peut l'observer, les résultats ont mis en évidence deux profils chimiques différents en fonction du solvant d'extraction. On remarque une prépondérance significative de l'acide cinnamique, atteignant 65,04 % dans l'extrait à l'acétate d'éthyle et 75,05 % dans l'extrait éthanolique, ce qui confirme le rôle crucial des phénylpropanoïdes dans le métabolisme secondaire de cette plante. Cependant, la nature des composés chimiques extraits est fortement influencée par le solvant employé.

L'extrait éthanolique se caractérise par une très grande variété de composés polaires. La rutine, un glycoside flavonoïde hydrosoluble, avec un taux de 9,36 %, constituant le deuxième composé le plus abondant après l'acide cinnamique. Ainsi que, La dominance des acides phénoliques et des flavonoïdes est en accord avec les recherches antérieures sur *B. fruticulosa subsp. Numidica*, lesquelles ont révélé des niveaux élevés d'acide cinnamique et coumarique dans les extraits éthanoliques [43].

De plus, on observe la présence des autres flavonoïdes comme la vitexine (0,50 %), l'hespérétine (0,43 %) et la quercitrine (0,58 %), dont ces composés sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoire. On trouve également la présence des acides phénoliques hydrophiles tels que l'acide gallique, l'acide chlorogénique et l'acide salicylique en faibles proportions (< 1 %), ils peuvent contribuer de manière synergique à l'activité antioxydante et présentent des effets antimicrobiens et la prévention des maladies cardiaques [44]. L'extrait éthanolique renferme également l'acide folique à une proportion de (2,94 %), qui est une vitamine indispensable pour le métabolisme cellulaire et la prévention de certaines pathologies associées au stress oxydatif et à la carence nutritionnelle [45]. Enfin, la présence d'alcaloïdes tels que la caféine (1,61 %) et de composés aromatiques comme la vanilline laisse entrevoir un large spectre d'activités biologiques.

En revanche, l'extrait acétate d'éthyle se distingue par la présence de composés lipophiles tels que le β -carotène (11,54 %) et l'acide oléanolique (2,72 %), qui font partie des familles des caroténoïdes et des triterpènes, et sont connus pour leurs effets protecteurs contre le stress oxydatif lipidique, leurs propriétés anti-inflammatoires, ainsi que leur rôle potentiel dans la prévention de certaines maladies dégénératives [46,47]. On trouve également divers flavonoïdes aglycones tels que l'hespérétine, la myricétine et la quercitrine, qui, bien que présents en quantités plus faibles (< 3 %), jouent un rôle significatif dans l'activité antioxydante et la régulation des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires [48]. La concentration en esculine (3,79 %), un composé de la famille des coumarines, renforce l'intérêt pharmacologique de cet extrait, notamment en ce qui concerne ses propriétés vasoprotectrices

Chapitre V : Résultats et discussion

et anti-inflammatoires [50]. De manière générale, l'analyse chimique de cet échantillon met en évidence une affinité du solvant acétate d'éthyle envers les métabolites secondaires peu polaires, tels que les pigments liposolubles, les triterpènes et les flavonoïdes non glycosylés.

Ces résultats confirment les études antérieures qui indiquent que les Brassicaceae stockent des quantités significatives d'acides phénoliques et de flavonoïdes, des composés majeurs impliqués dans la réponse aux stress abiotiques et biotiques [49].

V. 3. 1. 3. Activités anti-oxydante :

Les résultats d'activité antioxydante des extraits obtenus par macération de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* sont présentes dans le **Tableau V.12.** :

Tableau V.12. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* obtenus par macération.

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Dichlorométhane | 17,77 ±0,08 | 59,11 ±2,37 |
| Acétate d'éthyle | 12,30 ±0,15 | 62,30 ± 1,52 |
| Éthanolique | 15,63 ±0,05 | 47,30 ±2,61 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3±7,4 |

Les résultats montrent des différences notables selon le solvant d'extraction employé et la méthode d'évaluation antioxydante appliquée (DPPH ou ABTS).

Ces résultats mettent en évidence que l'extrait d'acétate d'éthyle démontre la plus grande efficacité contre le radical DPPH (IC₅₀ = 12,30 µg/ml), ce qui pourrait être dû à sa concentration élevée en flavonoïdes (82,46 µg EC/mg) (voir **Tableau V.12.**). Cette efficacité est en accord avec les données de la littérature, qui soulignent la capacité des flavonoïdes à céder des atomes d'hydrogène et à stabiliser les radicaux libres, contribuant ainsi à leur pouvoir antioxydant [52].

En revanche, pour le test ABTS, les extraits ont montré des niveaux d'efficacité distincts, dont l'extrait éthanolique a démontré une activité modérée (IC₅₀ = 47,30 µg/ml), suivie par l'extrait dichlorométhane (IC₅₀ = 59,11 µg/ml), tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté une valeur plus élevée (IC₅₀ = 62,30 µg/ml), indiquant une activité plus faible.

Chapitre V : Résultats et discussion

Ces résultats indiquent que l'efficacité des extraits est influencée par la nature des antioxydants qu'ils contiennent, en fonction du radical testé. En effet, les polyphénols hydrophiles, prédominants dans l'extrait éthanolique et la forte concentration en polyphénols, semblent jouer un rôle prépondérant dans la capture des cations ABTS⁺, alors que les flavonoïdes plus lipophiles extraits à l'acétate d'éthyle présentent une activité plus marquée envers le radical DPPH.

La comparaison avec l'acide ascorbique standard révèle que, malgré une moindre puissance, les extraits présentent une activité antioxydante significative et potentiellement synergique en raison de la variété des métabolites secondaires qu'ils contiennent.

V. 3. 2. Extraction par ultrasons :

V. 3. 2. 1. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes :

Le **Tableau V.13.** Et **Figure V.8.** Illustrent les informations concernant les rendements d'extraction, ainsi que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux, obtenues par extraction assistée par ultrasons à partir de la partie aérienne de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

Tableau V.13. Évaluation du rendement et de la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* obtenus par extraction ultrasonique.

| Extrait | Rendement % | Polyphénols µg EAG/mg | Flavonoïdes µg EC/mg |
|---------------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| Éthanolique | 8,06 | 208,55 ±0,11 | 114,56 ±16,77 |
| Méthanolique | 6,38 | 295,79 ±0,62 | 41,44 ±0,12 |

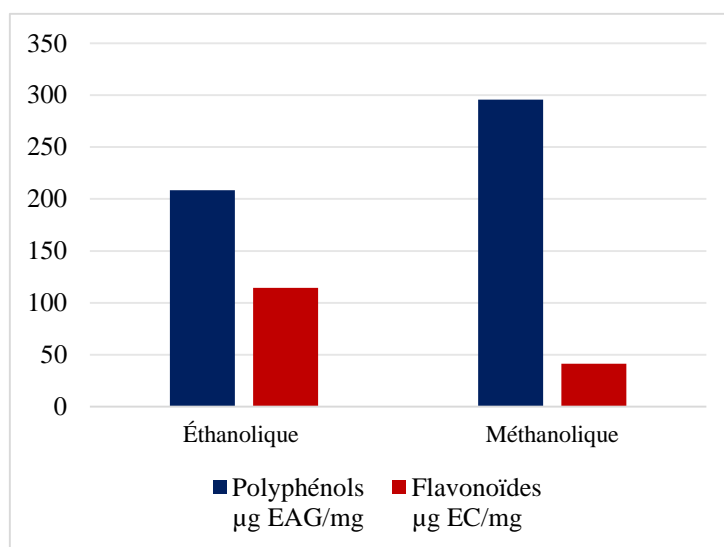


Figure V.8. Taux des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* par extraction ultrasonique

L'analyse quantitative de ces deux extraits, soulignent l'influence significative du choix du solvant et la méthode d'extraction sur le taux de récupération et la composition des métabolites secondaires. En termes de rendement, l'extrait éthanolique présente le rendement le plus élevé (8,06 %) par rapport de l'extrait méthanolique (6,38 %).

En revanche, l'extrait éthanolique s'est révélé le plus riche en polyphénol par rapport à l'extrait éthanolique. Cette disparité s'explique par la capacité du méthanol avec sa forte polarité à extraire de manière efficace les polyphénols, comme cela a été rapporté dans d'autre étude portant sur les Brassicaceae [38, 39].

En ce qui concerne les flavonoïdes, on observe une tendance inverse, dont l'extrait éthanolique a montré une concentration très élevé (114,56 µg EC/mg) par rapport à l'extrait méthanolique (41,44 µg EC/mg). Cela signifie que certains flavonoïdes particuliers de *B. fruticulosa* subsp. *Numidica*, probablement sous forme d'aglycone ou faiblement glycosylée, présentent une meilleure solubilité dans l'éthanol que dans le méthanol. Des études antérieures menées sur quelque plante de genre Brassica ont montré que l'utilisation de l'éthanol a favorisé une extraction plus efficace de certains flavonols et anthocyanes, bien que la teneur en composés phénoliques soit inférieure à celle obtenue avec le méthanol [53].

Chapitre V : Résultats et discussion

V. 3. 2. 2. Analyse chromatographique par LC-MS-MS :

L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (annexe 3), a permis l'identification qualitative des substances chimiques contenues dans les extraits éthanolique et méthanolique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*, comme illustré dans le Tableau V.14.

Tableau V.14. Composition chimique des extraits éthanoliques et méthanolique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* déterminée par LC-MS-MS.

| Extrait éthanolique | | | Extrait méthanolique | | |
|--------------------------|--------|------------|----------------------|--------|------------|
| Composés | Tr | % Relative | Composés | Tr | % Relative |
| Thymol | 9,561 | 0,16% | Acide cinnamique | 2,993 | 0,10% |
| Curcumine | 9,641 | 0,11% | Acide férulique | 3,025 | 0,08% |
| Caféine | 9,899 | 2,41% | Acide gallique | 3,473 | 0,01% |
| Acide férulique | 10,102 | 1,53% | Acide vanillique | 7,177 | 0,03% |
| Bêta-Carotène | 15,752 | 0,07% | Acide syringique | 7,607 | 0,08% |
| Quercitrine | 17,224 | 0,55% | Curcumine | 7,723 | 0,01% |
| Merycetine | 17,286 | 0,42% | Acide kojique | 8,036 | 0,03% |
| 8-hydroxy coumarine | 17,416 | 0,01% | Resvératrol | 9,873 | 0,16% |
| Esculine hydrate | 17,516 | 2,50% | Naringénine | 10,813 | 0,09% |
| Acide folique | 17,966 | 1,65% | Acide folique | 12,464 | 0,03% |
| Catéchine | 18,379 | 0,07% | Riboflavine | 14,737 | 99,25% |
| Rutine | 19,397 | 6,63% | Bêta-Carotène | 15,532 | 0,12% |
| Acide p- coumarique | 19,646 | 24,39% | Acide picrique | 18,542 | 0,01% |
| Naringénine | 19,904 | 0,10% | | | |
| Acide cinnamique | 20,227 | 59,33% | | | |
| Acide 4-méthoxybenzoïque | 20,312 | 0,07% | | | |
| | | | | | |

Les résultats ont révélé des profils chimiques distincts, démontrant de manière évidente l'impact de la polarité du solvant sur l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs. Cette analyse met en évidence les capacités complémentaires de l'éthanol et du méthanol, montrant leurs applications potentielles dans les industries pharmaceutiques, nutraceutiques et cosmétiques [54, 55].

Chapitre V : Résultats et discussion

L'extrait éthanolique a démontré une concentration plus élevée d'acides phénoliques et de flavonoïdes, avec l'acide cinnamique (59,33%) et l'acide coumarique (24,39%) comme composés dominants. Ces composés bioactifs sont bien établis pour leurs puissantes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, ce qui suggère que l'extrait éthanolique est particulièrement adapté aux applications ciblant le stress oxydatif et les infections microbiennes [56,57].

De plus, la présence de la rutine (6,63%), flavonoïde connu pour ses bienfaits anti-inflammatoires et cardiovasculaires, renforce le potentiel thérapeutique de l'extrait éthanolique [58]. Cette diversité positionne l'extrait éthanolique comme un candidat pour les aliments fonctionnels et la formulation pharmaceutique.

L'extrait au méthanol, en revanche, se caractérisait par une prédominance écrasante de riboflavine (99,25%). Cette vitamine hydrosoluble est essentielle pour la réparation cellulaire et le métabolisme [59,60].

D'autres composés, tels que le resvératrol (0,16%), le bêta-carotène (0,12%) et la naringénine (0,09%), étaient présents en plus petites quantités mais contribuent aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait méthanolique [61]. La polarité du méthanol a permis l'extraction efficace de ces métabolites polaires et hydrosolubles, faisant de l'extrait méthanolique un extrait approprié pour les nutraceutiques ciblant les carences en vitamines et la santé métabolique, ainsi que pour les formulations cosmétiques, en particulier les produits anti-âge et éclaircissants pour la peau [62, 63].

Une observation significative a été la grande différence de teneur en acide cinnamique entre l'extrait éthanolique (59,33%) et l'extrait méthanolique (0,10%), malgré le fait que les deux solvants soient à base d'alcool. Cette disparité peut être attribuée à la solubilité différentielle de l'acide cinnamique et aux dynamiques d'extraction compétitives influencées par la polarité du solvant. L'éthanol, avec sa polarité intermédiaire, a efficacement solubilisé les acides phénoliques tels que les acides cinnamique et p-coumarique, tandis que le méthanol, étant plus polaire, a favorisé l'extraction de composés hydrophiles tels que la riboflavine. La forte affinité du méthanol pour les composés hydrosolubles a probablement réduit l'efficacité relative d'extraction des acides phénoliques moins polaires, entraînant un rendement significativement plus faible dans l'extrait méthanolique. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures démontrant que le choix du solvant influence profondément à la fois la composition chimique et l'activité biologique des extraits de plantes [64, 65]. Les résultats démontrent les forces distinctes de l'éthanol et du méthanol dans la récupération de composés

Chapitre V : Résultats et discussion

bioactifs en fonction de leur polarité.

Les profils chimiques distincts de l'extrait éthanolique et du l'extrait méthanolique suggèrent leur adéquation à différentes applications. L'extrait éthanolique riche en composés phénoliques et en flavonoïdes a un potentiel pour des utilisations antioxydantes et antimicrobiennes, en particulier dans les compléments alimentaires et les produits pharmaceutiques ciblant le stress oxydatif et l'inflammation [65].

La teneur élevée en riboflavine de l'extrait méthanolique et ses métabolites polaires le positionnent comme un candidat pour les nutraceutiques visant à combler les carences en vitamines et à promouvoir la santé métabolique [66]. L'inclusion de resvératrol et d'acide kojique dans l'extrait méthanolique élargit encore son utilité pour les cosmétiques, en particulier dans les applications anti-âge et de santé de la peau [67].

L'éthanol et le méthanol présentent des capacités d'extraction complémentaires :

L'éthanol est idéal pour isoler les phénoliques et les flavonoïdes modérément polaires, tandis que le méthanol excelle dans l'extraction des vitamines et des polyphénols hautement polaires [68]. Une approche d'extraction combinée ou séquentielle pourrait maximiser la récupération des composés bioactifs, résultant en un profil phytochimique plus complet avec des applications plus larges. Cette stratégie pourrait améliorer le potentiel fonctionnel et thérapeutique des extraits [69].

V. 3. 2. 3. Activités antioxydante :

Nous présentons dans le tableau ci-dessous **Tableau V.15.**, les valeurs de l'activité antioxydante des extraits obtenus par extraction ultrasonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

Chapitre V : Résultats et discussion

Tableau V.15. Activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits obtenue par extraction ultrasonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Éthanolique | 69,93 ±0,36 | 72,08 ±3,37 |
| Méthanolique | 67,46 ±0,03 | 60,53 ±1,96 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3 ±7,4 |

Nous constatons que les deux extraits présentent une capacité significative à piéger les radicaux libres, ce qui est cohérent avec le potentiel de piégeage des radicaux des acides phénoliques et des flavonoïdes [70]. L'extrait méthanolique a montré une valeur d'IC₅₀ légèrement meilleure (67,46 µg/ml) que celle de l'extrait éthanolique (69,93 µg/ml). Les valeurs d'IC₅₀ plus basses de l'acide ascorbique reflètent sa capacité supérieure de donation d'électrons pour une neutralisation rapide des radicaux. En revanche, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et du l'extrait méthanolique provient probablement d'un mécanisme multifacette impliquant la capture des radicaux, la chélation des ions métalliques et la modulation des enzymes oxydatives plutôt que la réduction directe [71]. Bien que moins puissants que les antioxydants synthétiques, leur composition phénolique complexe peut offrir une protection soutenue contre le stress oxydatif.

En effet, les résultats des tests ABTS montrent que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante plus élevée (IC₅₀ = 60,53 µg/ml) que l'extrait éthanolique (72,08 µg/ml). Toutefois, ces deux extraits demeurent moins efficaces que l'acide ascorbique, utilisé comme référence (IC₅₀ = 58,3 µg/ml). Cette variation peut être en corrélation avec et le contenu total en polyphénols de l'extrait méthanolique, qui est largement reconnu pour son efficacité à capturer des radicaux hydrophiles comme l'ABTS⁺ [72].

V. 3. 2. 4. Activité anti-microbienne :

L'activité antimicrobienne des extraits éthanolique et méthanolique a été évaluée initialement en mesurant la zone d'inhibition de croissance (IZD) sur des milieux gélosés Mueller Hinton (MH) pour les bactéries et sur des milieux gélosés Sabouraud pour les champignons. Les résultats de cette évaluation sont synthétisés dans le **Tableau V.16**.

Les extraits ont révélé des propriétés antimicrobiennes variables, notamment à l'encontre

Chapitre V : Résultats et discussion

des bactéries Gram-négatives. Les tests de CMI et de CMB ont révélé des profils d'inhibition distincts vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*, mettant en évidence une sensibilité accrue à l'extrait d'éthanol.

Au sein de *Klebsiella pneumoniae*, les extraits EE et EM ont présenté des diamètres d'inhibition ainsi que des valeurs de Concentration Inhibitrice Minimale (CIM) distincts, mettant en évidence l'efficacité de l'extrait éthanolique.

En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa*, l'extrait éthanolique a induit une zone d'inhibition plus étendue que la chlorhexidine (CM), et les valeurs de Concentration Inhibitrice Minimale (CIM) ont renforcé l'efficacité supérieure de l'extrait éthanolique.

Tableau V.16. Activité antimicrobienne de l'extrait méthalonique et éthalonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* en comparant avec les traitements.

| Souche | Code | Diamètres des Zones d'Inhibition (DZI) en mm | Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en µg/ml |
|--------------------------------|-------|--|--|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | EE | 13,5 | 7,81 |
| | EM | 19 | 500 |
| | AK10 | R | R |
| | AMC30 | R | R |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | EE | 15 | 7.81 |
| | EM | 13,5 | 62.5 |
| | AK10 | R | R |
| | AMC30 | R | R |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | EE | 17,5 | 62.5 |
| | EM | 13.5 | 500 |
| | AK10 | 19 | 125 |
| | AMC30 | R | R |
| <i>Enterococcus faecium</i> | EE | 12,5 | 31.25 |
| | EM | 13 | 31.25 |
| | AK10 | 20 | 250 |
| | AMC30 | R | R |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |
| | AK10 | R | R |
| | AMC30 | R | R |
| <i>Candida albicans</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |
| | AM-B | R | R |
| <i>Candida kefyr</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |
| | AM-B | R | R |
| <i>Candida krusei</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |

Chapitre V : Résultats et discussion

| | | | |
|---------------------------|------|----|-------|
| | AM-B | 30 | 31.25 |
| <i>Candida lusitanae</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |
| | AM-B | 22 | 125 |
| <i>Candida tropicalis</i> | EE | R | R |
| | EM | R | R |
| | AM-B | R | R |

EE: Extrait éthanolique, EM: Extrait méthanolique, AK10: Amikacine, AMC30: Amoxicilline + Acide clavulanique, AM-B: Amphotéricine B, R : Résistante.

Concernant *Enterococcus faecium*, elle a démontré une inhibition équivalente des deux extraits, ce qui suggère une sensibilité similaire.

En effet, aucune zone d'effet inhibiteur n'a été observée pour *Staphylococcus aureus*, ce résultat est en accord avec les recherches antérieures sur la résistance de cette bactérie aux extraits de Brassica.

Par ailleurs, aucune activité antifongique significative n'a été observée.

V. 3. 2. 5. Inhibition de la formation de biofilm :

Les extraits de *B. numidica* ont été évalués pour leur capacité à inhiber la formation de biofilm dans des souches bactériennes sélectionnées, révélant une efficacité significative mais variable **Figure V.9**.

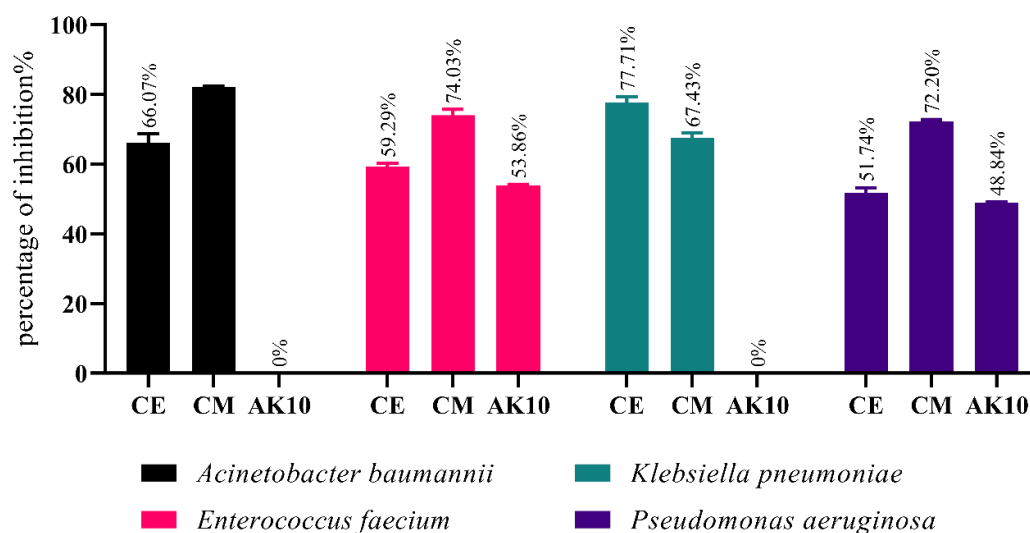


Figure V.9. Inhibition de la formation de biofilm

Pour *Acinetobacter baumannii*, l'inhibition de la formation de biofilm était de 68 % pour CE et de 45 % pour CM. Dans *Klebsiella pneumoniae*, l'inhibition a atteint 72 % pour CE et 60 % pour CM, indiquant un potentiel antibiofilm élevé, en particulier pour CE. *Pseudomonas*

Chapitre V : Résultats et discussion

aeruginosa a démontré une inhibition du biofilm de 55 % pour CE et de 48 % pour CM. Pour *Acinetobacter baumannii*, l'inhibition de la formation de biofilm était de 68 % pour CE et de 45 % pour CM. Dans *Klebsiella pneumoniae*, l'inhibition a atteint 72 % pour CE et 60 % pour CM, indiquant un potentiel antibiofilm élevé, en particulier pour CE. *Pseudomonas aeruginosa* a démontré une inhibition du biofilm de 55 % pour CE et de 48 % pour CM. Dans *Enterococcus faecium*, CE et CM ont inhibé la formation de biofilm de 64 % et 51 %, respectivement. Les composés phénoliques ont été rapportés comme prévenant l'adhésion microbienne et la maturation du biofilm, soutenant les résultats de cette étude [73, 74].

Une étude récente de Bouamama et al. (2022) a corroboré les activités antimicrobiennes et antibiofilm significatives des extraits de *Brassica*, en particulier contre les bactéries Gram-négatives résistantes.

V. 3. 2. 6. Activité anti-inflammatoire :

Le diclofénac sodique, utilisé comme contrôle positif dans cette étude (Tableau V.17), présente un taux d'inhibition maximal de 96,42 % à une concentration de 2500 µg/mL, réaffirmant ainsi son efficacité anti-inflammatoire établie. En revanche, les extraits éthanolique et méthanolique dérivés de *B. numidica* montrent des taux d'inhibition de 73,92 % et 78,10 %, respectivement.

Tableau V.17. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) par la molécule et le diclofénac sodique standard (acide 2-éthanoïque).

| Concentration en µg/ml | Pourcentage d'inhibition % | | |
|------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| | Diclofenac | Extrait éthanolique | Extrait méthanolique |
| 2500 | 96,42 ± 1,52 | 73,92 ± 1,98 | 78,10 ± 1,22 |
| 2000 | 91,84 ± 2,91 | 56,26 ± 1,83 | 60,58 ± 0,84 |
| 1500 | 76,39 ± 1,72 | 47,15 ± 0,47 | 55,30 ± 1,30 |
| 1000 | 54,22 ± 0,65 | 40,84 ± 1,70 | 46,90 ± 1,80 |
| 500 | 31,31 ± 1,15 | 33,04 ± 1,65 | 38,95 ± 1,36 |
| 250 | 28,70 ± 0,24 | 26,64 ± 1,16 | 31,34 ± 0,51 |
| 125 | 16,67 ± 1,88 | 24,14 ± 1,34 | 26,01 ± 1,97 |

À des concentrations faibles de 500 µg/mL, on observe une inhibition de la dénaturation de 33,04 % pour l'extrait éthanolique et de 38,95 % pour l'extrait méthanolique. Néanmoins, on constate une activité significative des extraits à des concentrations de plus en plus élevées. Ces

Chapitre V : Résultats et discussion

résultats indiquent que les extraits de *B. numidica* présentent des propriétés anti-inflammatoires dont l'efficacité varie en fonction de la dose administrée.

V. 3. 3. Extraction par sohxlet :

V. 3. 3. 1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

L'extraction de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica* par Soxhlet en utilisant des solvants de polarité croissante a mis en évidence des variations significatives en ce qui concerne le rendement et la concentration en composés phénoliques et en flavonoïdes (**Tableau V.18** et **figure V.10.**) :

Tableau V.18. Rendement d'extraction et teneur en composés phénoliques et flavonoïdes des extraits Soxhlet de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*.

| Extrait | Rendement % | Polyphénols $\mu\text{g EAG/mg}$ | Flavonoïdes $\mu\text{g EC/mg}$ |
|------------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Phase hexane | 3,68 | 157,87 \pm 0,61 | 42,64 \pm 0,04 |
| Phase chloroforme | 0,93 | 167,62 \pm 0,47 | 43,79 \pm 1,35 |
| Phase acétate d'éthyle | 0,11 | 232,06 \pm 0,39 | 52,90 \pm 0,25 |
| Phase éthanol | 22,07 | 282,14 \pm 0,58 | 21,28 \pm 0,73 |

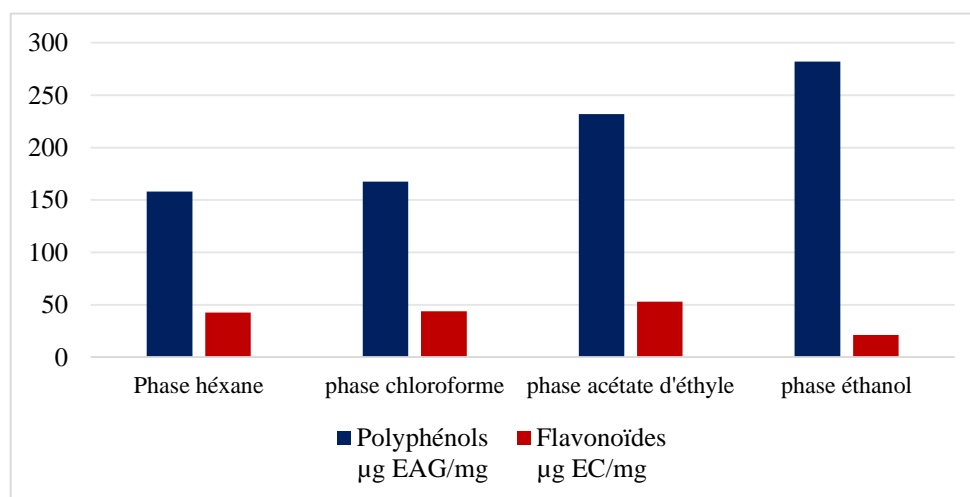


Figure V.10. Contenu en polyphénols et flavonoïdes des fractions extraites de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*

Le taux de rendement le plus élevé soit 22,07 %, a été observé avec la phase éthanolique, alors que la phase acétate d'éthyle a présenté le taux de rendement le plus bas, à savoir 0,11 %. Les rendements des phases hexane et chloroforme sont modérés, s'élevant à 3,68 % et 0,93 %

Chapitre V : Résultats et discussion

respectivement. Ces variations peuvent être dues à la polarité des solvants.

En ce qui concerne la concentration de polyphénols totaux, les résultats révèlent un classement par ordre décroissant : L'éthanol présente le taux le plus élevé avec une valeur de 282,14 $\mu\text{g EAG/mg}$, suivie par l'acétate d'éthyle avec 232,06 $\mu\text{g EAG/mg}$, le chloroforme avec 167,62 $\mu\text{g EAG/mg}$, et enfin l'hexane avec 157,87 $\mu\text{g EAG/mg}$. Ces données confirment l'aspect généralement polaire des polyphénols, les rendant plus solubles dans les solvants polaires et semi-polaires. Ainsi, il a été observé que l'extrait éthanolique contient la plus grande quantité de composés phénoliques, comme le montrent les recherches précédentes, qui indiquent que les fractions éthanoliques des Brassicaceae sont généralement riches en polyphénols [75]. Étant étroitement liées aux propriétés antioxydantes et protectrices des Brassicaceae, ces molécules pourraient conférer à l'extrait éthanolique un intérêt biologique significatif.

En revanche, la répartition des flavonoïdes est différente, la phase acétate d'éthyle présente la valeur la plus élevée (52,90 $\mu\text{g EC/mg}$), suivi par les phases chloroforme (43,79 $\mu\text{g EC/mg}$) et hexane (42,64 $\mu\text{g EC/mg}$), alors que la phase éthanolique affiche la teneur la plus basse (21,28 $\mu\text{g EC/mg}$). Cette distribution peut être justifiée par la variété structurale des flavonoïdes, qui se présentent soit sous forme d'aglycones, moins polaires et ainsi plus facilement extraites par des solvants faiblement polaires, soit sous forme glycosylée, plus polaires et solubles dans l'éthanol, donc il est constaté que les phases moins polaire et apolaire sont riches en flavonoïdes aglycones.

Ces résultats soulignent la complémentarité entre les phases obtenues. La phase éthanol apparaît comme le plus prometteur pour les applications exigeant une activité antioxydante et protectrice élevée, en raison de son rendement élevé et de sa concentration élevée en polyphénols. La phase acétate d'éthyle, bien que son rendement soit faible, présente un intérêt particulier pour l'isolement des flavonoïdes, des composés reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. En conclusion, les phases apolaires, bien qu'ils aient une teneur plus faible en polyphénols, peuvent renfermer d'autres molécules lipophiles bioactives qui sont d'un intérêt pharmacologique.

Globalement, ces résultats attestent que la polarité du solvant a un impact majeur sur la composition chimique des extraits de *Brassica fruticulosa subsp. Numidica*. Ils proposent également que l'utilisation d'une approche séquentielle ou combinée des solvants serait la plus appropriée pour optimiser l'extraction des divers métabolites secondaires et ainsi exploiter

Chapitre V : Résultats et discussion

pleinement le potentiel bioactif de cette espèce endémique.

V. 3. 3. 2. Activités antioxydante :

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* à l'aide des tests DPPH et ABTS sont regroupés dans **Tableau V.19**.

Tableau V.19. Activité antioxydante des extraits Soxhlet de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica* évaluée par les tests DPPH et ABTS.

| Extrait | IC ₅₀ DPPH (µg/ml) | IC ₅₀ ABTS (µg/ml) |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Phase hexane | 115,23 ±4,64 | 94,45 ±1,58 |
| Phase chloroforme | 15,88 ±0,01 | 50,77 ±1,89 |
| Phase acétate d'éthyle | 12,45 ±0,27 | 42,88 ±1,37 |
| Phase éthanol | 17,31 ±0,02 | 59,45 ±2,41 |
| Acide ascorbique* | 7,96 ±0,01 | 58,3 ±7,4 |

On observe des différences significatives selon le solvant employé pour l'extraction. Les valeurs d'IC₅₀ indiquent que la phase acétate d'éthyle présente une activité antioxydante plus élevée, avec un IC₅₀ de 12,45 µg/ml pour le DPPH et de 42,88 µg/ml pour l'ABTS. Cette fraction présente une efficacité similaire à celle de l'acide ascorbique utilisé comme témoin positif, ce qui confirme sa teneur élevée en composés bioactifs ayant un fort potentiel réducteur.

La chloroforme se démarque aussi par son pouvoir antioxydant remarquable (avec un IC₅₀ de 15,88 µg/ml pour le DPPH et de 50,77 µg/ml pour l'ABTS), laquelle demeure légèrement inférieure à celle de la phase acétate d'éthyle mais surpassant les phases éthanol et hexane. De plus, la phase éthanol bien que riche en polyphénols totaux, présente une activité modérée avec des valeurs d'IC₅₀ de 17,31 µg/ml pour le DPPH et de 59,45 µg/ml pour l'ABTS. Cela peut être expliqué par la nature qualitative des polyphénols présents.

En revanche, la phase hexane montre une activité antioxydante plus modeste (avec une IC₅₀ de 115,23 µg/ml pour le DPPH et de 94,45 µg/ml pour l'ABTS). C'était prévisible, car ce liquide non polaire extrait essentiellement des composés lipophiles qui, bien qu'ayant des propriétés biologiques, jouent un rôle moindre dans l'activité antioxydante mesurée par ces tests radicalaires.

Chapitre V : Résultats et discussion

Il est curieux de constater que les résultats des deux tests montrent des tendances généralement parallèles, malgré quelques différences. L'analyse par le test DPPH révèle une activité plus prononcée des phases acétate d'éthyle et chloroforme.

Contrairement au test DPPH, le test ABTS, plus sensible aux composés hydrophiles, montre des valeurs légèrement plus uniformes entre les différentes fractions, tout en confirmant la supériorité de l'acétate d'éthyle.

Ces observations sont en accord avec les études précédentes menées sur les Brassicaceae, qui ont montré que les extraits semi-polaires sont particulièrement efficaces dans le piégeage des radicaux libres.

Références:

- 1- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.
- 2- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
- 3- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251–280.
- 4- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (pp. 1–24). Blackwell Publishing.
- 5- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464.
- 6- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- 7- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435–457.
- 8- Hostettmann, K., & Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge University Press.
- 9- Daun, J. K., Barthet, V. J., Chibbar, R. N., Duguid, S., & Genest, B. (2003). Structure, composition, and variety development of canola. In *Canola: Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 1–66). AOCS Press.
- 10- Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, 2013, 963248.
- 11- Ghaffar, N., & Perveen, A. (2024). Solvent polarity effects on extraction yield, phenolic content, and antioxidant properties of Malvaceae family seeds: a comparative study. *New Zealand Journal of Botany*, 1–11.
- 12- Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., & Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.
- 13- Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2012). A Comparative Study on the Polyphenolic Content, Antibacterial Activity and Antioxidant Capacity of Different Solvent Extracts of Brassica Oleracea Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 223–231.
- 14- Satheesh, N., & Workneh Fanta, S. (2020). Kale: Review on nutritional composition, bio-

Chapitre V : Résultats et discussion

active compounds, anti-nutritional factors, health beneficial properties and value-added products. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1).

15- Olfat, N., Ashoori, M., & Saedisomeolia, A. (2022). Riboflavin is an antioxidant: a review update. *British Journal of Nutrition*, 128(10), 1887–1895.

16- Plantone D, Pardini M, Rinaldi G. Riboflavin in Neurological Diseases: A Narrative Review. *Clin Drug Investig*. 2021 Jun;41(6):513-527.

17- Thirumalaisamy, R., Bhuvaneshwari, M., Haritha, S., Jeevarathna, S., Janani, K. S. S., & Suresh, K. (2022). Curcumin, naringenin and resveratrol from natural plant products hold promising solutions for modern-world diseases – A recent review. *South African Journal of Botany*, 151, 567–580.

18- Peralta-Campos, A., Pereira, G. E., Molino, L. G., et al. (2022). Selective extraction of antioxidant phenolic compounds using ethyl acetate fraction: case study on *Pereskia aculeata* leaves. *Journal of Food Chemistry & Technology*, 8(4), 88–98.

19- Guzmán-López, E. G., Reina, M., Hernández-Ayala, L. F., & Galano, A. (2023). Rational design of multifunctional ferulic acid derivatives aimed for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Antioxidants*, 12(6), 1256.

20- Djeujo, F., Ragazzi, E., & Froidi, G. (2023). Luteolin and Vernodalol as Bioactive Compounds of Leaf and Root *Vernonia amygdalina* Extracts: Effects on α -Glucosidase, Glycation, ROS, Cell Viability, and In Silico ADMET Parameters. *Pharmaceutics*, 15(5), 1541.

21- Den Hartogh, D. J., Gabriel, A., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic Properties of Curcumin II: Evidence from In Vivo Studies. *Nutrients*, 12(1), 58.

22- Jayawickreme, D. K., Ekwosi, C., Anand, A., Andres-Mach, M., Właz, P., & Socala, K. (2024). Luteolin for neurodegenerative diseases: a review. *Pharmacological Reports*.

23- Slowing, K., Gomez, F., Delgado, M., Fernández de la Rosa, R., Hernández-Martín, N., Pozo, M. A., & García-García, L. (2022). PET Imaging and Neurohistochemistry Reveal that Curcumin Attenuates Brain Hypometabolism and Hippocampal Damage Induced by Status Epilepticus in Rats. *Planta Medica*, 89(04), 364–376.

24- Ferrante, A. A., Martins, I. R., Alves, L., & FERREIRA, M. (2019). Analytical methodology for determination of the plasma antioxidant capacity through the radical 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). *Aust J Basic Appl Sci*, 13, 19-22.

25- Villeda-González, J. D., Gómez-Olivares, J. L., & Baiza-Gutman, L. A. (2024). New paradigms in the study of the cholinergic system and metabolic diseases: Acetyl-and-butyrylcholinesterase. *Journal of Cellular Physiology*.

26- Patočka, J., Kuca, K., & Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--

Chapitre V : Résultats et discussion

important enzymes of human body. *Acta Medica*, 47(4), 215–228.

27- Goulart, P. do N., Caruso, L., Nadur, N. F., Franco, D. P., Kümmerle, A. E., & Lacerda, R. B. (2021). Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment. *13*(1), 90–126.

28- Giacobini, E., Cuello, A. C., & Fisher, A. (2022). Reimagining cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Brain*, 145(7), 2250–2275.

29- Wilkinson, D. G. (2001). Galantamine: a new treatment for Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 1(2), 153–159.

30- Sharma, R., Mehan, S., Khan, Z., Gupta, G. D., & Narula, A. S. (2024). Therapeutic Potential of Oleanolic acid in Modulation of PI3K/Akt/mTOR/STAT-3/GSK-3 β Signaling Pathways and Neuroprotection against Methylmercury-Induced Neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 105876.

31- Jain, M., Dhariwal, R., Bhardava, K., Das, S., Shaikh, M., Tendulkar, R. N., Wani, R., Delta, A. K., & Kaushik, P. (2024). Insilico and invitro profiling of curcumin and its derivatives as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

32- Maliwal, D., Pissurlenkar, R. R., & Telvekar, V. (2022). Identification of novel potential anti-diabetic candidates targeting human pancreatic α -amylase and human α -glycosidase: An exhaustive structure-based screening. *Canadian Journal of Chemistry*, 100(5), 338-352.

33- Janeček, Š. (2016). α -amylases from Archaea: Sequences, structures and evolution. In *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges* (pp. 505-524). Cham: Springer International Publishing.

34- Proença, C., Freitas, M., Silva, A. M. S., & Fernandes, E. (2024). 2-Styrylchromones as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase enzymes for the management of type 2 diabetes mellitus. *Medicinal Chemistry Research*.

35- Lu, C., Luo, Y., Su, X., Li, S., & Ho, C.-T. (2024). Hypoglycemic effects and associated mechanisms of resveratrol and related stilbenes in diet. *Food & Function*.

36- Santoso, M., L, O., N, A., Wati, F. A., Azminah, A., R, A., Fadlan, A., Mustikasari, K., N, H., & Judeh, Z. M. A. (2021). Synthesis, α -Glucosidase Inhibition, α -Amylase Inhibition and Molecular Docking Studies of 3,3-Di(Indolyl)Indolin-2-Ones.

37- Mahasuari, N. P. S., Paramita, N. L. P. V., & Putra, A. A. G. R. Y. (2020). EFFECT OF METHANOL CONCENTRATION AS A SOLVENT ON TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT OF BELUNTAS LEAF EXTRACT (*Pulchea indica* L.). *Journal of Poultry Science*, 2(2), 77–84.

38- Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2012). A Comparative Study on the

Chapitre V : Résultats et discussion

Polyphenolic Content, Antibacterial Activity and Antioxidant Capacity of Different Solvent Extracts of Brassica Oleracea Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 223–231.

39- OULD YEROU, K., EL KADI, F. Z., Kanoun, K., Khelladi, H., Benzahia, H., & Bekhti, S. (2022). Preliminary phytochemical investigation and antioxidant potential of various extracts of dietary turnip (*brassica rapa l.*). *Food and Environment Safety Journal*, 21(1).

40- Idrees, N., Tabassum, B., Sarah, R., & Hussain, Mohd. K. (2019). *Natural Compound from Genus Brassica and Their Therapeutic Activities* (pp. 477–491). Springer, Singapore.

41- Gould, D. B. (2022). *Nutritional and Health Benefits of Brassica Vegetables and Exploitation of Innovative Markets Concepts for their Dietary Diversity* (pp. 53–73). Book Publisher International (a part of SCIENCEDOMAIN International).

42- Staicu, V., Tomescu, J. A., Neagu, M., Popescu, A. F., Popescu, M., Manea, C., & Călinescu, I. (2023). Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Elecampagne (*Inula helenium*, *Radix Inulae*). 4(8), 1184–1192.

43- Chaïma, Z., Nadia, T., Chahrazed, B., Noureddine, D., Manel, D. L., Roumaïssa Halima, A., ... & Eddine, D. S. (2025). Comprehensive LC-MS Profiling and Evaluation of Antimicrobial, Antibiofilm, Antioxidant, and Anti-inflammatory Properties of Alcoholic Extracts of *Brassica fruticulosa* subsp. *numidica* (Coss.) Maire. *Chemistry & Biodiversity*, e202500524.

44- Hadidi, M., Liñán-Atero, R., Tarahi, M., Christodoulou, M. C., & Aghababaei, F. (2024). The Potential Health Benefits of Gallic Acid: Therapeutic and Food Applications. *Antioxidants*, 13(8), 1001.

45- Kurowska, K., Kobylnska, M., & Antosik, K. (2023). Folic acid-importance for human health and its role in COVID-19 therapy. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 74(2).

46- Kabir, M. T., Rahman, M. H., Shah, M., Jamiruddin, M. R., Basak, D., Al-Harrasi, A., ... & Abdel-Daim, M. M. (2022). Therapeutic promise of carotenoids as antioxidants and anti-inflammatory agents in neurodegenerative disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112610.

47- Sapkota, A., & Choi, J. W. (2021). Oleanolic acid provides neuroprotection against ischemic stroke through the inhibition of microglial activation and NLRP3 inflammasome activation. *Biomolecules & Therapeutics*, 30(1), 55.

48- Yang, A. Y., Choi, H. J., Kim, K., & Leem, J. (2023). Antioxidant, Antiapoptotic, and Anti-Inflammatory Effects of Hesperetin in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury. *Molecules*, 28(6), 2759.

Chapitre V : Résultats et discussion

- 49- Zafar, I., Hussain, A. I., Fatima, T., Alnasser, S. M. A., & Ahmad, A. (2022). Inter-Varietal Variation in Phenolic Profile, Sugar Contents, Antioxidant, Anti-Proliferative and Antibacterial Activities of Selected Brassica Species. *Applied Sciences*, 12(12), 5811.
- 50- Zhang, L., Xie, Q., & Li, X. (2021). Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*.
- 51- Ri, H., Pak, U., Yang, J., Son, K., Kim, Y., Son, K., Ri, C., Kang, M., & Kim, T. (2019). Effect of Different Polarity Solvents on Total Phenols and Flavonoids Content, and in-Vitro Antioxidant Properties of Flowers Extract from Aurea Helianthus. *viXra*.
- 52- LI, J. (2012). Structure-Activity Relationship of Four Flavonoids on Scavenging Activities to DPPH Free Radical. *Journal of Instrumental Analysis*.
- 53- PALIDA, A., HAILIQIAN, T., & GU, N.-D. (n.d.). Extraction Technology of Total Flavonoids in Uighur Medicine Brassica rapa L. by Orthogonal Test.
- 54- Goshtasbi, H., Okolodkov, Y. B., Movafeghi, A., Awale, S., Safary, A., Barar, J., & Omid, Y. (2023). Harnessing microalgae as sustainable cellular factories for biopharmaceutical production. *Algal research*, 74, 103237.
- 55- Jan, B., Parveen, R., Zahiruddin, S., Khan, M. U., Mohapatra, S., & Ahmad, S. (2021). Nutritional constituents of mulberry and their potential applications in food and pharmaceuticals: A review. *Saudi journal of biological sciences*, 28(7), 3909-3921.
- 56- Barajas-Ramírez, J. A., Cabrera-Ramírez, A. H., & Aguilar-Raymundo, V. G. (2023). Antioxidant activity, total phenolic, tannin, and flavonoid content of five plants used in traditional medicine in Penjamo, Guanajuato. *Chemistry & Biodiversity*, 20(1), e202200834.
- 57- Erdoğan Eliuz, E. A. (2022). Antibacterial activity and antibacterial mechanism of ethanol extracts of *Lentinula edodes* (Shiitake) and *Agaricus bisporus* (button mushroom). *International Journal of Environmental Health Research*, 32(8), 1828-1841.
- 58- Devanesan, A. A., Zipora, T., Smilin, B. A. G., Deviram, G., & Thilagar, S. (2018). Phytochemical and pharmacological status of indigenous medicinal plant *Petalium murex* L.— a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1456-1463.
- 59- Ghallab, D. S., & Ghareeb, D. A. (2024). UPLC-MS/MS-based metabolomics and chemometrics unveil metabolic patterns and their regulatory pathways over the course of pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) germination. *Scientia Horticulturae*, 337, 113563.
- 60- Andrès, E., Lorenzo-Villalba, N., Terrade, J. E., & Méndez-Bailon, M. (2024). Fat-soluble vitamins A, D, E, and K: review of the literature and points of interest for the clinician. *Journal of Clinical Medicine*, 13(13), 3641.
- 61- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2022). Antioxidative and anti-inflammatory activity of

Chapitre V : Résultats et discussion

ascorbic acid. *Antioxidants*, 11(10), 1993.

62- Draelos, Z. D., Diaz, I., Cohen, A., Mao, J., & Boyd, T. (2020). A novel skin brightening topical technology. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(12), 3280-3285.

63- Majeed, M., Majeed, S., Jain, R., Mundkur, L., Rajalakshmi, H. R., Lad, P. S., & Neupane, P. (2020). An open-label single-arm, monocentric study assessing the efficacy and safety of natural pterostilbene (*Pterocarpus marsupium*) for skin brightening and antiaging effects. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 105-116.

64- Shishov, A., El-Deen, A. K., Godunov, P., & Bulatov, A. (2024). Atypical deep eutectic solvents: New opportunities for chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, 117752.

65- Singh, A., Singh, J., Parween, G., Khator, R., & Monga, V. (2025). A comprehensive review of apigenin a dietary flavonoid: biological sources, nutraceutical prospects, chemistry and pharmacological insights and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(23), 4529-4565.

66- Rispo, F., De Negri Atanasio, G., Demori, I., Costa, G., Marchese, E., Perera-del-Rosario, S., ... & Grasselli, E. (2024). An extensive review on phenolic compounds and their potential estrogenic properties on skin physiology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1305835.

67- Mannai, F., Elhleli, H., Mosbah, M. B., Khiari, R., Nacer, S. N., Belgacem, M. N., & Moussaoui, Y. (2024). Comparative study of conventional and combined ultrasound-assisted methods on the quality of mucilage extracted from *Opuntia ficus-indica* cladodes. *Industrial Crops and Products*, 214, 118566.

68- Elaloui, M., Hamdi, S. H., Ghazghazi, H., Nasr, R. B., Bouslih, E., Ammari, Y., ... & Laamouri, A. (2021). Characterization of epicatechin contents in the *Ziziphus spina-christi* L. root extracts using LC-MS analyses and their insecticidal potential. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(4), 685-690.

69- Gallegos-Saucedo, R., Barrios-García, T., Valdez-Morales, E. E., Cabañas-García, E., Barajas-Espinosa, A., Gómez-Aguirre, Y. A., & Guerrero-Alba, R. (2024). Cytotoxic Activity of *Lepidium virginicum* L. Methanolic Extract on Human Colorectal Cancer Cells, Caco-2, through p53-Mediated Apoptosis. *Molecules*, 29(16), 3920.

70- Abdelouhab, K., Guemmaz, T., Karamać, M., Kati, D. E., Amarowicz, R., & Arrar, L. (2023). Phenolic composition and correlation with antioxidant properties of various organic fractions from *Hertia cheirifolia* extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 235, 115673.

Chapitre V : Résultats et discussion

- 71- Favela-González, K. M., Hernández-Almanza, A. Y., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13414.
- 72- Vinci, G., D'Ascenzo, F., Maddaloni, L., Prencipe, S. A., & Tiradritti, M. (2022). The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays. *Beverages*, 8(2), 18.
- 73- Santos, C. A., Lima, E. M. F., Franco, B. D. G. D. M., & Pinto, U. M. (2021). Exploring phenolic compounds as quorum sensing inhibitors in foodborne bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12, 735931.
- 74- Kimani, B. G., Kerekes, E. B., Szebenyi, C., Krisch, J., Vágvölgyi, C., Papp, T., & Takó, M. (2021). In vitro activity of selected phenolic compounds against planktonic and biofilm cells of food-contaminating yeasts. *Foods*, 10(7), 1652.
- 75- Ahmed, M. F., Rao, A. S., Ahemad, S. R., & Ibrahim, M. O. H. A. M. M. E. D. (2012). Phytochemical studies and antioxidant activities of *Brassica oleracea* L. Var. *Capitata*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3), 374-378.

Conclusion et perspectives

Conclusion

La présente étude s'est inscrite dans une dynamique de valorisation de la biodiversité végétale algérienne, et plus particulièrement de deux espèces endémique de l'est Algérien : *Brassica insularis* Moris et *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*. Ce travail visait à explorer leur potentiel phytochimique et biologique, en recourant à des méthodes modernes d'extraction et d'analyse, ainsi qu'à une large gamme tests biologiques ciblant des problématiques de santé publiques majeures.

Les résultats obtenus ont montré que les trois techniques d'extraction utilisées (macération, extraction assistée par ultrasons et Soxhlet) influencent significativement le rendement et la richesse chimique des extraits, confirmant l'importance du choix méthodologique dans la valorisation des métabolites secondaires. L'analyse phytochimique a révélé la présence de diverses familles de composés bioactifs, en particulier les polyphénols, flavonoides, dont les teneurs varient en fonction d'espèces et du procédé d'extraction.

Sur le plan biologique, les extraits testés ont manifesté des activités antioxydantes notables, reflètent leur richesse en composés phénoliques. Par ailleurs, plusieurs extraits ont montré un effet antidiabétique, se traduisant par l'inhibition des enzymes α -amylase et α -glucosidase, ainsi qu'un potentiel anti-Alzheimer à travers l'inhibition de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. De plus, certains extraits obtenus par extraction ultrasonique ont présenté une activité antimicrobienne intéressante, en particulier contre certaines souche pathogènes, et une action anti-inflammatoire significative, confirmant ainsi les usages empiriques rapportés dans la médecine traditionnelle.

Ces résultats mettent en évidence l'importance des deux espèces étudiées en tant que sources potentielles de molécules bioactives, et justifient pleinement leurs exploitations dans le cadre de recherche appliquées. Ils soulignent également le rôle stratégique des espèces endémique dans la mise en place de programme de valorisation durable des ressources naturelles algériennes.

Cependant, ce travail n'est qu'une première étape des investigations complémentaires s'avèrent nécessaires afin d'isoler et de caractériser les molécules responsables des effets observés, d'évaluer leurs mécanisme d'action, et de valider leur efficacité à travers des modèles *in vivo* et *in silico*. De telles perspectives permettront d'aboutir à une meilleure intégration de ces sources dans les domaines pharmaceutique, nutraceutique et cosmétique.

Conclusion et perspectives

En somme, cette thèse contribue à enrichir les connaissances sur les *Brassicaceae* endémiques de l'est algérien, tout en ouvrant la voie à des nouvelles applications scientifiques et industrielles. Elle s'inscrit ainsi dans une démarche de valorisation des potentialités à la fois au développement de la recherche académique et à la promotion d'une utilisation raisonnée et innovante de la biodiversité végétale.

Annexe

Annexe

Annexe 1 : Chromatogrammes LC-MS-MS (extraction par macération de *Brassica insularis Moris*)

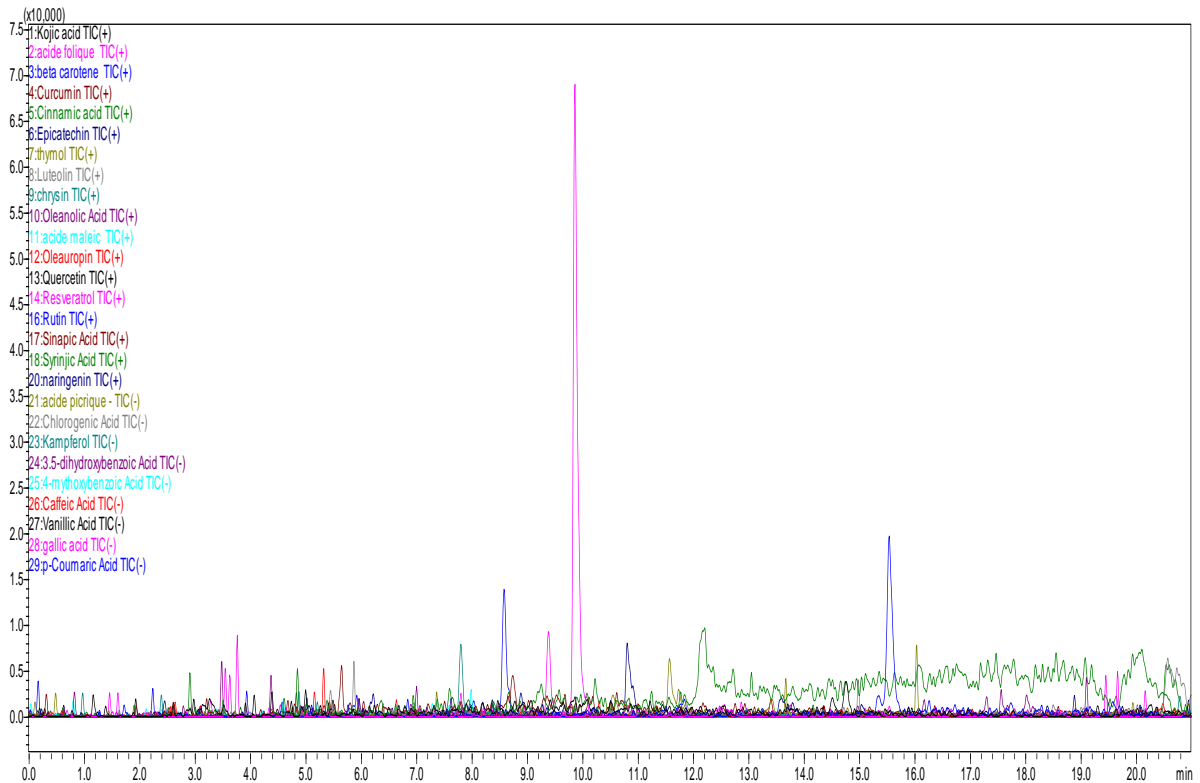


Figure A : Chromatogramme LC-MS-MS d'extrait éthanolique de *Brassica insularis Moris*.

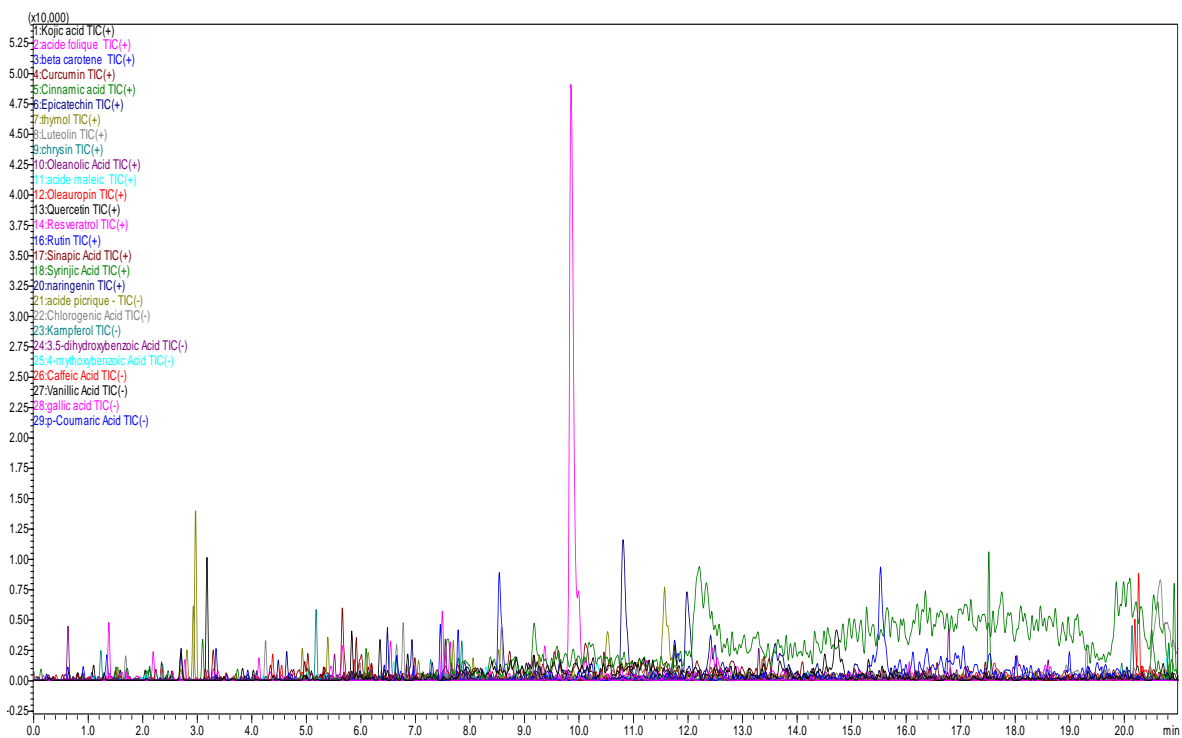


Figure B : Chromatogramme LC-MS-MS d'extrait acétate d'éthyle de *Brassica insularis Moris*.

Annexe 2 : Chromatogrammes LC-MS-MS (extraction par macération de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.)

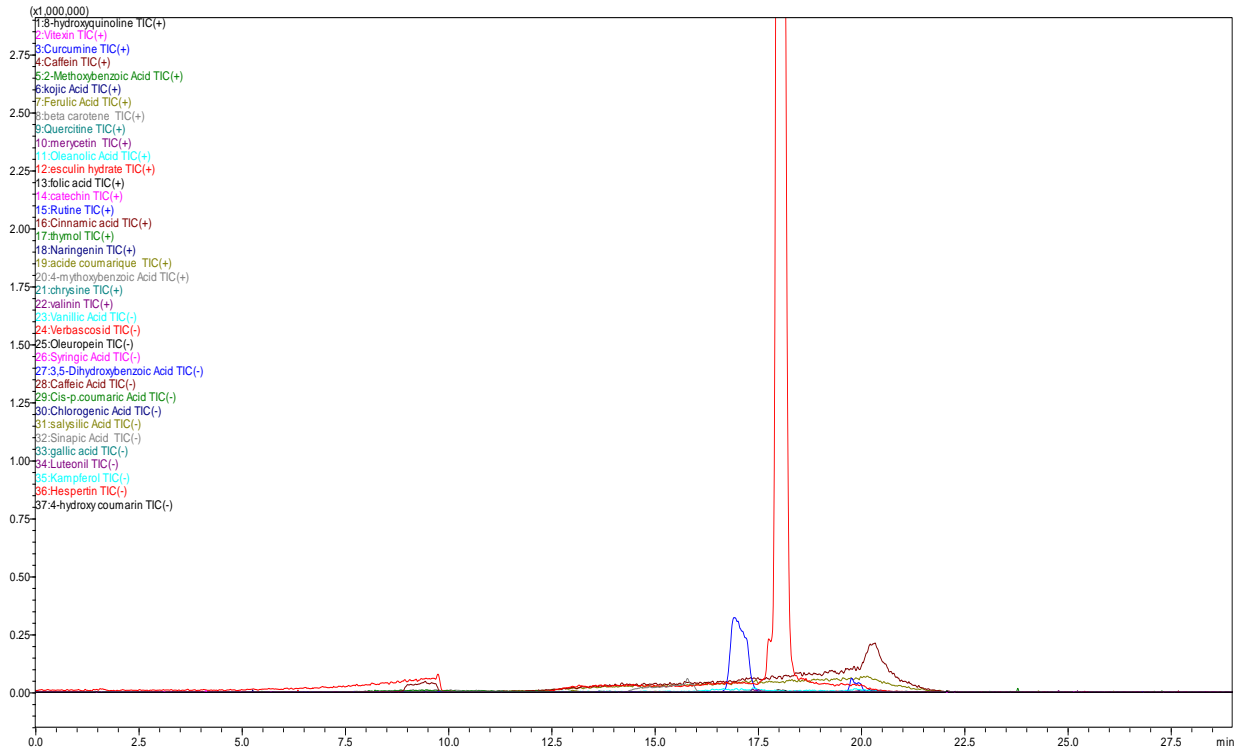


Figure C: Chromatogramme LC-MS-MS d'extrait acétate d'éthyle *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

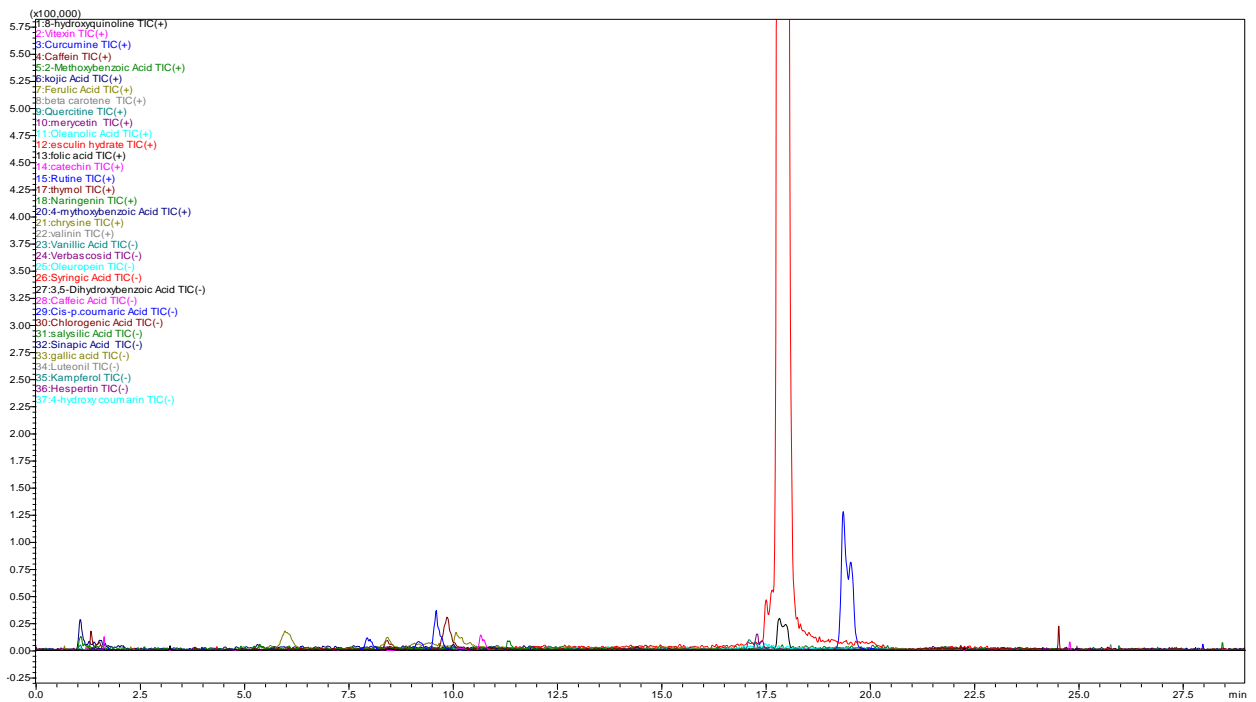


Figure D : Chromatogramme LC-MS-MS d'extrait éthanolique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.

Annexe 3 : Chromatogrammes LC-MS (extraction ultrasonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.)

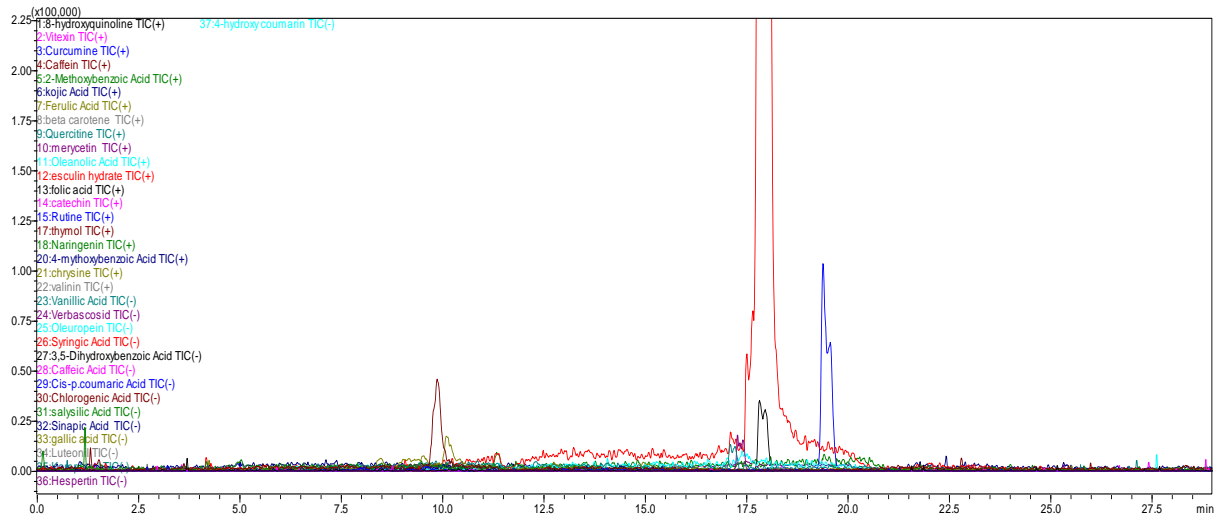


Figure E: Chromatogramme LC-MS d'extrait éthanolique par extraction ultrasonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *numidica*.

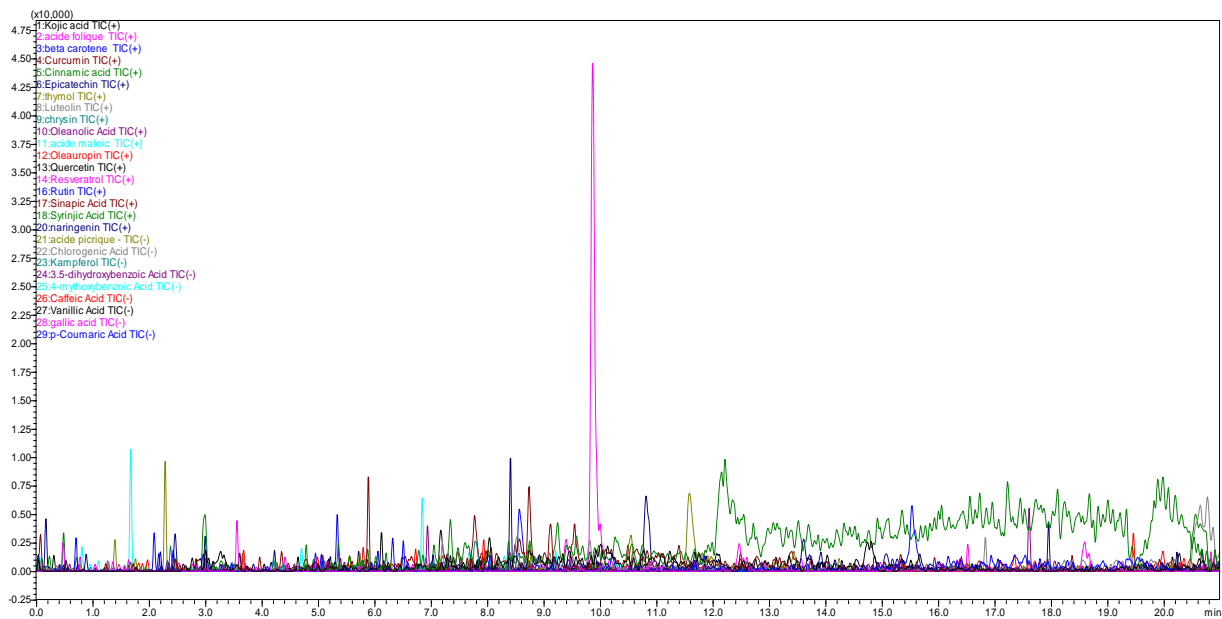


Figure F : Chromatogramme LC-MS d'extrait méthanolique par extraction ultrasonique de *Brassica fruticulosa* subsp. *Numidica*.