



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



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et biologie

Cellulaire et moléculaire

قسم: البيوكيمياء والبيولوجيا الخلوية والجزئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

---

## Exploration des propriétés biologiques d'une plante de l'Est algérien

---

Présenté par : BOULAHLIB Mohamed Khairi

Le : 25/06/2025

MERNIZ SALIH

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme BENSMIRA Soumia (MAA- UFM Constantine 1).  
Encadrant : Mr KITOUNI Rachid (MCA- UFM Constantine 1).  
Co-Encadrant : Mr BEZZI Tarek (MRA- CRBT Constantine).  
Examinateuse : Mme ZEHANI Lamia (MCB- UFM Constantine 1).

Année universitaire  
2024 - 2025

# Remerciement

Tout d'abord, et avant toute autre considération, nous exprimons notre gratitude envers Dieu, le Très-Haut, le Tout-Puissant, l'Omniscient, pour nous avoir accordé la force et la patience nécessaires à la réalisation de ce mémoire. Nous exprimons également notre gratitude à l'université pour le cadre et les ressources offerts tout au long de ce projet.

Nous exprimons notre reconnaissance à nos encadrants, Monsieur **Rachid Kitouni**, Maître de Conférences de classe A au sein de l'UFMC, et à Monsieur **Tarek Bezzi**, Maître de recherche de classe A au sein du CRBT Constantine. Pour avoir supervisé ce travail avec une sincérité et professionnalisme exemplaires, ainsi que leur disponibilité, leurs conseils avisés, leurs efforts constants et surtout, leur bienveillance.

Nous exprimons notre reconnaissance à Madame **BENSMIRA Soumia** (MAA- UFM Constantine).et à Madame **ZEHANI Lamia** (MCB- UFM Constantine) pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'être membres du jury et d'évaluer ce mémoire.

Nous désirons également exprimer notre gratitude à Monsieur **Tarek Bezzi**, du Centre de recherche en biotechnologie (CRBt), pour son accueil et son encadrement tout au long de notre période de stage. Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à **NESRINE, Rayane** ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe de recherche du laboratoire de biochimie au CRBt.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à Madame **KABOUCHE Zahia**, directrice du laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques, pour l'ouverture de son laboratoire et pour le travail effectué.

Nous désirons exprimer notre sincère gratitude à Monsieur **BOULDJADJ Redouane** MAA- UFM de Constantine. Grâce à lui, il a généreusement consacré de son temps à nous assister dans la réalisation des activités anti-inflammatoires au sein de son établissement, en collaboration avec Monsieur **BAHRI Laid**, responsable de l'animalerie de l'UMFC.

Et finalement, un grand merci à nos collègues de stage pratique qui nous ont aidé à réaliser ce travail.

## Dédicace

Je dédie ce travail à ma famille, source intarissable de motivation : à ma mère **SORAYA**, dont la tendresse et les sacrifices m'ont porté jusqu'ici ; à mon père **Mohamed Cherif**, modèle de persévérance et de sagesse ; à ma sœur **Racha** complice de toujours, A mon cher grand père et toute ma famille **Boulaahlib**

Mon cher ami et binôme **SALIH**, compagnon de route inestimable, avec qui j'ai partagé les défis et les victoires de cette aventure académique.

À mes chers amis qui ont été des piliers tout au long de ce parcours : **Chahinez, Sidali, Sabrina, Ayemen, Abdella, Roeya, Imad, Rym, Merwen, Redha, Nesrine et Rayane.**

Votre soutien, vos encouragements et votre présence ont été essentiels.

À tous mes **collègues d'étude**, avec qui j'ai partagé des moments d'apprentissage et de camaraderie.

À mes **encadrants, Mr. KITOUNI Rachid et Mr. BEZZI Tarek**, pour leur guidance éclairée, leur patience et leur expertise qui ont rendu ce travail possible.

Ce mémoire est le fruit de tous ces soutiens et de ma détermination personnelle.

**BOULAHLIB Mohamed Khairi**

## Dédicace

Louange à Allah, Le Très Haut, pour Sa grâce infinie, Sa miséricorde et la force qu'Il m'a donnée pour mener à bien ce travail. Sans Sa lumière, aucun chemin n'aurait été possible.

Je dédie ce mémoire à mes parents bien-aimés, **Soulef Medjda et Mouhamed Amine**, piliers de ma vie, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices silencieux et leur soutien sans faille tout au long de mes études. Rien de tout cela n'aurait été possible sans eux.

À mes deux sœurs chères à mon cœur, **Doria et Djihane**, à mon frère **Ramy**, ainsi qu'à ma cousine **Sahar**, pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence toujours bienveillante.

À mes deux tantes chères, **Amel et Flora**, pour leur tendresse, leurs prières, et leur soutien affectueux. Votre bienveillance a été pour moi une source de réconfort et de motivation tout au long de ce parcours.

À mon précieux ami et collègue **Khairi**, avec qui j'ai partagé des rires, des défis et d'innombrables souvenirs mémorables tout au long de ces cinq belles années.

À mes encadrants et à mon directeur de recherche, Mr. **Kitouni Rachid** et Mr. **Bezzi Tarek**, pour leur encadrement bienveillant, leur expertise, leur patience et leurs précieux conseils qui ont permis la réalisation de ce travail.

À mes trois amies, **Nesrine, Sabrina et Nada**, pour leur soutien précieux tout au long de l'élaboration de ce mémoire de fin d'études.

À mes chers amis, **Abdala, Redha, Fares, Merouene, Imad, Louai et Nasser** pour leur amitié sincère et leur accompagnement tout au long de ce parcours. Enfin, à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, recevez ici l'expression de ma gratitude la plus sincère.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Origine des antioxydants.....	5
<b>Tableau 2</b> : Solubilité des antioxydants.....	6
<b>Tableau 3</b> : Gamme d'acide gallique.....	18
<b>Tableau 4</b> : Gamme d'étalement de la quercétine. ....	19
<b>Tableau 5</b> : Déférantes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale. .....	20
<b>Tableau 6</b> : Rendement de l'extrait brut.....	37
<b>Tableau 7</b> : Contenu total en polyphénols des extraits. ....	38
<b>Tableau 8</b> : Contenu total en flavonoïdes des extraits.....	39
<b>Tableau 9</b> : Inhibition du DPPH par les extraits de la plante de la famille Linaceae .....	44
<b>Tableau 10</b> : Inhibition de l'ABTS•+ par les extraits de la plante de la famille Linaceae.....	47
<b>Tableau 11</b> : Absorbances du pouvoir réducteur par les extraits de la plante de la famille Linaceae. ..	52
<b>Tableau 12</b> : Absorbances du Fe <sup>2+</sup> Phenanthroline par les extraits de la plante de la famille Linaceae. .....	56
<b>Tableau 13</b> : Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extrait sur la souche Escherichia coli. ....	60
<b>Tableau 14</b> : Résultat de l'activité antibactérienne de l'extrait sur la souche Staphylococcus aureus. ..	61
<b>Tableau 15</b> : Pourcentages d'inhibition de l'activité antifongique calculés. ....	62

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	4
<b>Figure 2</b> : Réaction de la superoxyde dismutase montrant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. ....	7
<b>Figure 3</b> : Structure chimique de l'acide ascorbique .....	8
<b>Figure 4</b> : Structure chimique de la vitamine E. ....	8
<b>Figure 5</b> : Structure chimique de $\beta$ -Carotène.....	9
<b>Figure 6</b> : Structure chimique de Xanthophylle.....	9
<b>Figure 7</b> : Réduction du DPPH par un antioxydant(59). ....	22
<b>Figure 8</b> : Formation et piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> par un antioxydant.(64) .....	23
<b>Figure 9</b> : Mécanisme réactionnel du test FRAP.(64) .....	25
<b>Figure 10</b> : Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénanthroline(71). ....	26
<b>Figure 11</b> : Dépôt des disques dans les boîtes de Pétri. ....	29
<b>Figure 12</b> : Préparation du milieu de culture PDA. ....	30
<b>Figure 13</b> : Histogramme des teneurs en polyphénols totaux des extraits.....	38
<b>Figure 14</b> : Histogramme des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits. ....	40
<b>Figure 15</b> : Histogramme des valeurs d'IC <sub>50</sub> du test DPPH. ....	43
<b>Figure 16</b> : Résultats du test DPPH sur microplaques.....	45
<b>Figure 17</b> : Histogramme des valeurs d'IC <sub>50</sub> du test ABTS.....	48
<b>Figure 18</b> : Résultats du test ABTS sur microplaques.....	49
<b>Figure 19</b> : Histogramme des valeurs d'A <sub>0.5</sub> du test FRAP. ....	53
<b>Figure 20</b> : Résultats du test FRAP sur microplaques.....	54
<b>Figure 21</b> : Histogramme des valeurs d'A <sub>0.5</sub> du test de la phénanthroline. ....	57
<b>Figure 22</b> : Résultats du test Phenanthroline sur microplaques. ....	58
<b>Figure 23</b> : Histogramme des Pourcentages d'inhibition calculés de l'activité antifongique. ....	63
<b>Figure 24</b> : Résultat de l'activité antifongique des extraits : Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, Dichlorométhane, n-Butanolique et la phase aqueuse. ....	64
<b>Figure 25</b> : Histogramme montrant les pourcentages d'hémolyse en fonction de la concentration.....	65
<b>Figure 26</b> : Histogramme montrant les pourcentages de protection des hématies vis-à stress osmotique et thermique en fonction des concentrations. ....	68

## Liste des abréviations

---

### -A-

---

**A<sub>0.5</sub>** : Absorbance de concentration 0.5M

**ABTS** : Acide 2,2' -azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

---

### -B-

---

**BHA** : Hydroxyanisole butylé

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

---

### -C-

---

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : Dichlorométhane

---

### -D-

---

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**D.O** : la densité optique

**DPPH** : le 2,2-di(4-tert-octylphényl) -1-picrylhydrazyl

---

### -E-

---

**E.coli** : *Escherichia coli*

**ERO** : Espèces réactives d'oxygène

**Ext A** : Acétate d'éthyle

**Ext B** : *n*-Butanolique

**Ext D** : Dichlorométhane

**Ext E** : Ether de pétrole

**Ext PA** : Phase aqueuse

---

### -F-

---

**FCR** : le réactif Folin-Ciocalteu

**FeCl<sub>3</sub>**: Chlorure ferrique

**Fol**: *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*

**FRAP** : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

---

**-G-**

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GR** : Globules rouges

**GSH** : Glutathion

---

**-H-**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HAT** : Le transfert d'atome d'hydrogène

---

**-I-**

**IC<sub>50</sub>** : La concentration inhibitrice 50 %

---

**-K-**

**K<sub>3</sub> Fe (CN)<sub>6</sub>** : Ferricyanures de potassium

---

**-L-**

**LOO<sup>•</sup>** : Radical peroxyde lipidique

**LOOH** : Hydroperoxyde lipidique

---

**-M-**

**MeOH** : Méthanol

---

**-N-**

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>**: Carbonate de sodium

**NO**: Monoxyde d'azote

---

**-O-**

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet

**O<sub>2</sub>** : Dioxygène

**OH<sup>+</sup>**: Radical hydroxyle

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Anion superoxyd

**ONOO** : Peroxynitrite

---

**-P-**

---

**PA** : Extrait aqueux

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PDA** : Potato Dextrose Agar

---

**-R-**

---

**RL** : Radicaux libres

**RNS** : Espèces réactives de l'azote

**RO<sup>•</sup>** : Radical alcoxyle

**ROO<sup>•</sup>** : Radical peroxyde

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**RSS** : Espèces réactives du soufre

---

**-S-**

---

**S.A** : *Staphylococcus aureus*

**SET** : Transferts électrons uniques

**SOD** : Superoxyde dismutase

---

**-T-**

---

**TCA** : Acide trichloracétique

# SOMMAIRE

Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Liste des abréviations .....	
SOMMAIRE .....	
Introduction.....	1
Chapitre 01 : Etude bibliographique .....	3
1.    Stress oxydatif, radicaux libres et antioxydants .....	3
1.1.    Stress oxydatif.....	3
1.1.1.    Définition .....	3
1.1.2.    Origine .....	3
1.2.    Radicaux libres .....	3
1.3.    Antioxydants.....	4
1.3.1.    Définition .....	4
1.3.2.    Types des antioxydants .....	4
1.4.    Stress oxydatif et vieillissement .....	9
2.    Présentation botanique de la plante .....	10
2.1.    Classification botanique de la famille Linaceae.....	10
2.2.    Propriétés thérapeutiques de la plante .....	10
2.2.1.    Famille Linaceae .....	10
2.2.2.    Genre Linum.....	11
2.3.    Études antérieures sur la plante.....	11
2.3.1.    Activités antioxydantes .....	11
2.3.2.    Activité antifongique .....	12
2.3.3.    Activité antibactérienne .....	12
2.3.4.    Activité anti-inflammatoire in vitro.....	13
Chapitre 02 : Matériels et Méthodes .....	15
1.    Matériels.....	15
1.1.    Matériel végétal.....	15

1.2.	Matériel animal.....	15
2.	Méthodes .....	15
2.1.	Préparation des extraits .....	15
2.1.1.	Préparation et Extraction de la plante .....	15
2.2.	Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.....	17
2.2.1.	Polyphénols totaux.....	17
2.2.2.	Flavonoïdes totaux .....	18
2.3.	Activités biologiques .....	20
2.3.1.	Préparation des échantillons .....	20
2.3.2.	Activités antioxydantes .....	21
2.3.3.	Activité antibactérienne .....	27
2.3.4.	Activité antifongique .....	29
2.3.5.	Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	32
2.4.	Analyses statistiques .....	35
	Chapitre 03 : Résultats et discussion.....	40
1.	Rendement d'extraction.....	37
2.	Résultats et discussions des activités biologiques .....	37
2.1.	Dosages des polyphénols et Flavonoïdes.....	37
2.1.1.	Polyphénols totaux.....	37
2.1.2.	Flavonoïdes totaux .....	39
2.2.	Activités anti oxydantes <i>in vitro</i> .....	42
2.2.1.	Activité de piégeage de radical libre DPPH.....	42
2.2.2.	Activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>•+</sup> .....	46
2.2.3.	Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP).....	50
2.2.4.	Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> phenanthroline.....	55
2.3.	Activité antibactérienne .....	59
2.4.	Activité antifongique .....	62
2.5.	Activité Anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	64
2.5.1.	Test de l'innocuité des extraits vis-à-vis des globules rouges .....	64
2.5.2.	Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges contre stress osmotique associé à un stress thermique .....	67
2.6.	Récapitulatif des résultats de tous les tests.....	69

2.6.1.	Rendement d'extrait brut et dosage des polyphénols et flavonoïdes.....	69
2.6.2.	Activité antioxydante (DPPH, ABTS, FRAP, et phénanthroline).....	69
2.6.3.	Activité antimicrobienne : .....	69
2.6.4.	Activité antifongique : .....	70
2.6.5.	Activité anti-inflammatoire (antihémolytique) :.....	70
	Références bibliographiques .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
	RESUMES .....	71

## ***INTRODUCTION***

## Introduction

Plantes médicinales ont toujours joué un rôle crucial dans les traitements thérapeutiques humains. Selon les données de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), une proportion allant de 65 % à 80 % de la population des nations en voie de développement recourt principalement à la phytothérapie pour satisfaire ses besoins de santé primaires, en raison notamment de contraintes économiques et d'une accessibilité limitée aux services de santé modernes. Malgré les progrès significatifs réalisés en chimie organique, environ un quart des médicaments employés dans les nations industrialisées sont dérivés, de façon directe ou indirecte, de composés végétaux.(1)

La médecine traditionnelle repose sur l'analyse des symptômes. L'utilisation d'un mélange de plantes est préconisée pour réduire un symptôme spécifique ou soulager une douleur, mais non pour traiter une pathologie.(2)

La médecine moderne a apporté des détails sur les mécanismes des maladies, en mettant en avant les conséquences préjudiciables du stress oxydatif sur les cellules. Afin de se protéger, l'organisme utilise des antioxydants, qu'ils soient d'origine naturelle ou provenant de sources externes.(3)

Les plantes médicinales représentent une source précieuse de produits naturels possédant des activités antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques et anti-inflammatoires. Cela est dû à leur abondance en métabolites secondaires.(4)

Les composés phénoliques, parmi les métabolites secondaires végétaux les plus courants, sont présents dans de multiples espèces végétales consommées par l'être humain et les animaux. Récemment, leur fonction en tant qu'antioxydants a été identifiée.

Au sein de ces plantes, diverses espèces de la famille des Linaceae sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques.

L'objectif principal de ce mémoire de master est d'évaluer le potentiel biologique de l'espèce végétale : la famille Linaceae.

Cette étude est structurée en trois parties, à savoir :

- Recherches bibliographiques.

## **Introduction**

- Localisation du matériel végétal, les méthodes d'extraction et les différentes activités associées telles que les activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires.
- Résultats et les discussions de l'analyse phytochimique de la plante de cette famille Linaceae

# **Chapitre 01 : Etude bibliographique**

## **1. Stress oxydatif, radicaux libres et antioxydants**

Le stress oxydatif est désormais un facteur clé dans le développement de nombreuses maladies chroniques, liées notamment au vieillissement cellulaire.

### **1.1. Stress oxydatif**

#### **1.1.1. Définition**

Le stress oxydatif se caractérise par un déséquilibre entre les espèces oxydantes et les antioxydants présents dans l'organisme, dû à une insuffisance en antioxydants ou une surproduction de radicaux réactifs de l'oxygène (ROS) , azote (RNS) et soufre (RSS)(5,6), pouvant potentiellement causer des dommages cellulaires. en saturant les voies de détoxicification enzymatique et en induisant un stress oxydatif.(7)

#### **1.1.2. Origine**

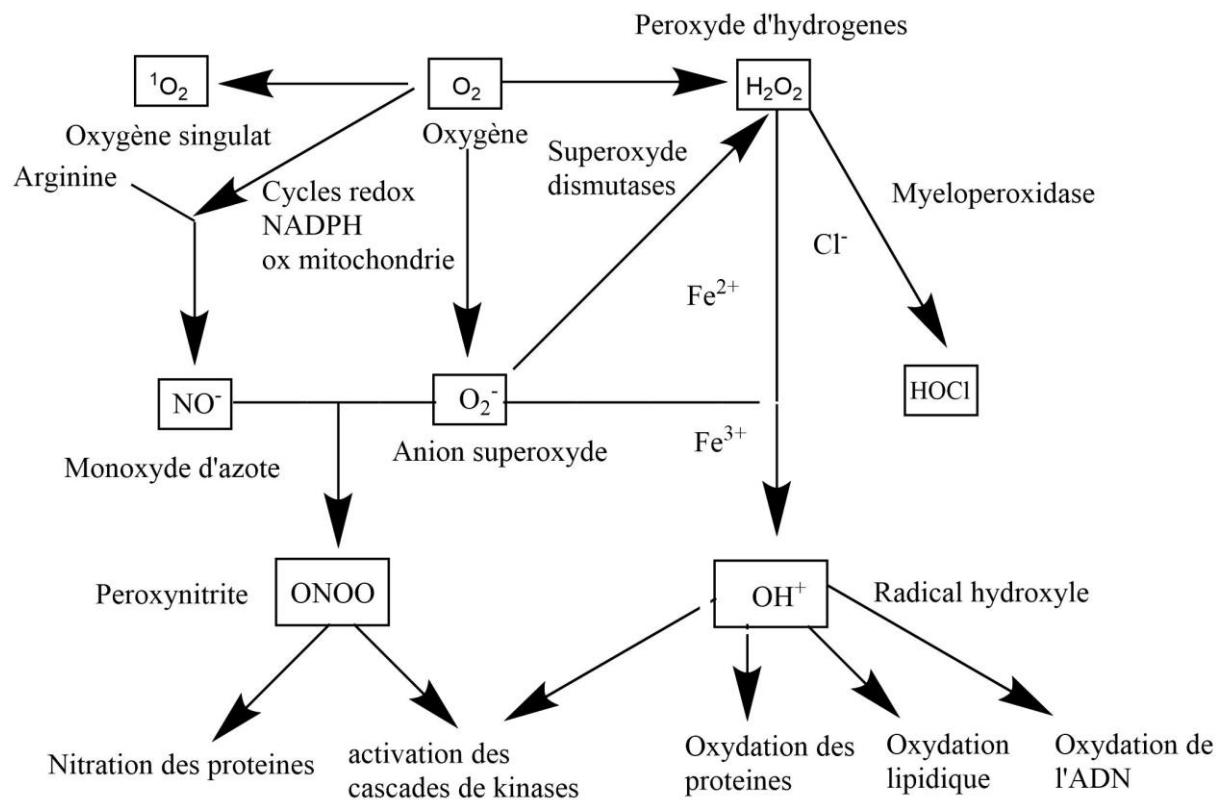
Lors de la respiration mitochondriale, l'oxygène, comme tous les oxydants, a une toxicité et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, la fuite d'électrons au niveau de la chaîne mitochondriale conduit à la formation de radicaux super oxydes en liant ces électrons à des molécules d'oxygène.(8)

### **1.2. Radicaux libres**

Une espèce chimique contenant un électron non apparié(9) caractérisée par sa nature transitoire par l'acceptation d'un autre électron ce qui peut perturber l'équilibre des autres molécules présentes dans leur environnement. ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.(10)

La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O<sub>2</sub>) a des Dérives instable et toxique qui réagissent et de dégradent l'ADN, les lipides, les protéines. Augmente par situation : Stress, tabac, alcoolisme, surpoids, exercices physiques mal géré. (11).

L'essentiel des RL provient de l'activité mitochondrial mais également d'autres origines cellulaire telles que les peroxyxsomes, les lipo-oxygénases, la NADH oxygénase (12)



**Figure 1 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

### 1.3. Antioxydants

#### 1.3.1. Définition

Des composés qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) présents au sein des cellules. Leur action vise à protéger les cellules(13).

#### 1.3.2. Types des antioxydants

Tableau 1 : Origine des antioxydants.

Origine des antioxydants	Types / Sous-catégories	Exemples	Références
Naturels	Enzymatiques	<b>Enzymes primaires :</b> Super oxyde dismutase, catalase, glutathione peroxidase <b>Enzymes secondaires :</b> Glutathione reductase, glutathione 6-phosphate dehydrogenase	
		<b>Protéiques :</b> Albumin, ceruloplasmin, lactoferrin, transferrin <b>Non protéiques :</b> Bilirubin, ubiquinol, uric acid <b>Cofacteurs :</b> Coenzyme Q10	
	Vitamines	Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E	
	Minéraux	Selenium, zinc, cooper, iron	
	Caroténoïdes	β-carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin	
	Polyphénols	<b>Flavonoïdes :</b> - Flavonols : Quercétine, Kaempférol - Flavanols : Catéchine - Flavones : Chrysin- Flavanones : Hespéridine - Isoflavanoïdes : Génistéine - Anthocyanidines : Cyanidine, Pélargonidine <b>Acides phénoliques :</b> - Acides hydroxy-cinnamiques : Ferulic, p-coumaric- Acides	(14)

		hydroxy-benzoïques : Acide gallique, Acide ellagique	
<b>Synthétiques</b>	—	BHA (Butylated hydroxytoluene), BHT (Butylated hydroxyanisole), Trolox, TBHQ (Tertiary-butyl hydroquinone)	

**Tableau 2 :** Solubilité des antioxydants.

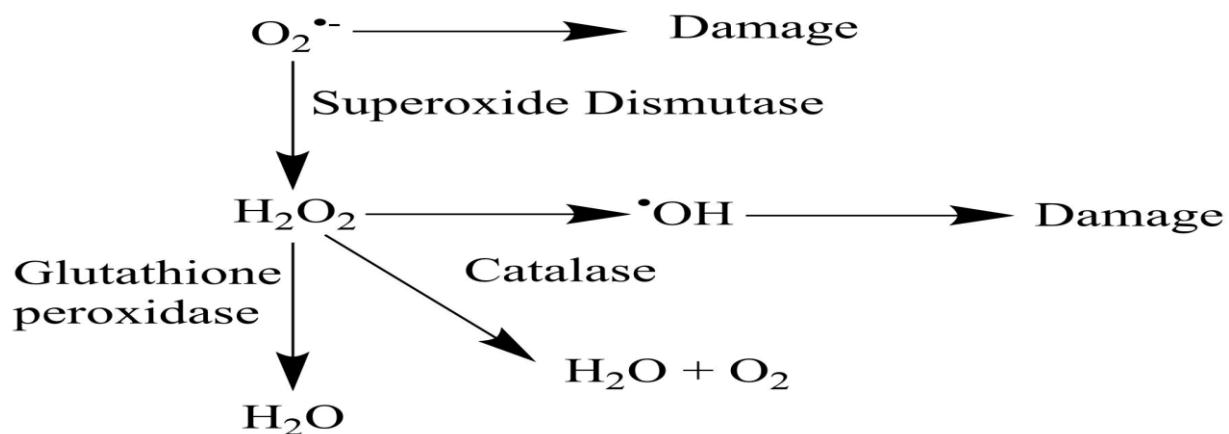
Solubilité des antioxydants	Exemples	Références
<b>Hydrosolubles (Water soluble)</b>	Albumine Ascorbate Transferrine Flavonoïdes Cysteine L'acide urique	(14)
<b>Liposolubles (Lipid soluble)</b>	$\alpha$ -Tocophérol Caroténoïdes Quinones	

### 1.3.2.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques

#### 1.3.2.2. Superoxyde dismutase

Les superoxyde dismutases (SODs) sont des métalloprotéines qui jouent un rôle crucial dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène en facilitant la conversion de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en molécules moins réactives telles que  $O_2$  et  $H_2O_2$ .

Le peroxyde produit par les superoxyde dismutases conduit à la formation du radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ). Les superoxyde dismutases (SOD) sont classées selon leur localisation intracellulaire, le manganèse étant crucial pour maintenir leur activité.(15)



**Figure 2 :** Réaction de la superoxyde dismutase montrant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

#### 1.3.2.3. Catalase

Protéine qui se trouve dans le peroxysome (16) particulièrement active où elle agit en tant qu'antioxydant grâce à deux activités enzymatiques distinctes : la conversion des molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène, et la promotion de la formation de radicaux hydroxyles, ou de manière peroxydique à des concentrations faibles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.(17)

#### 1.3.2.4. Les antioxydants endogènes non enzymatiques

##### 1.3.2.5. Glutathion peroxydase (GPx)

Une sélénio-protéine constituée de quatre sous-unités pour de neutraliser les radicaux libres responsables de l'oxydation de l'ADN et des lipides(18), en réduisant les hydro-peroxydes par l'oxydation d'un substrat réducteur(19,20).

Le glutathion (GSH) est un antioxydant crucial synthétisé par les cellules grâce à l'action des enzymes peroxydase, réductase et S-transférases. Le glutathion (GSH) est réduit par l'enzyme glutathion peroxydase (GPx) afin de décomposer le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes.

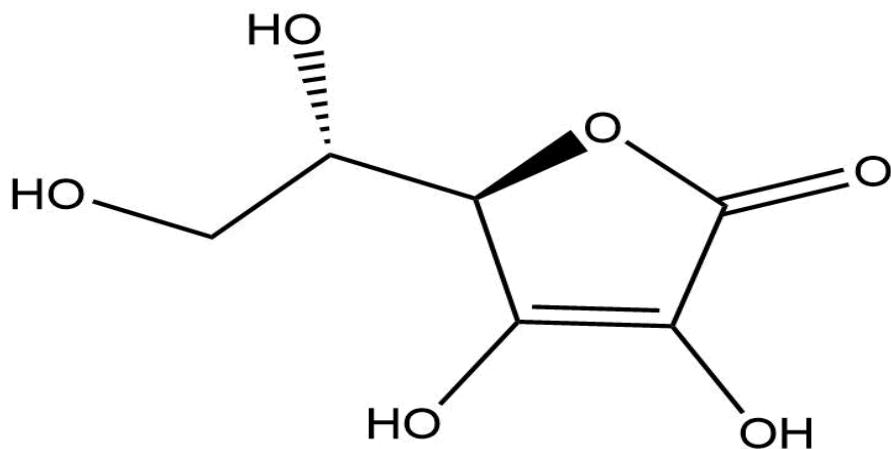


**Équation 1 :** Réaction d'oxydation du glutathion réduit (GSH) par le peroxyde d'hydrogène, catalysée par le glutathion peroxydase (GPx).

## 1.3.2.6. Antioxydants exogènes

## 1.3.2.7. Vitamine C (acide ascorbique)

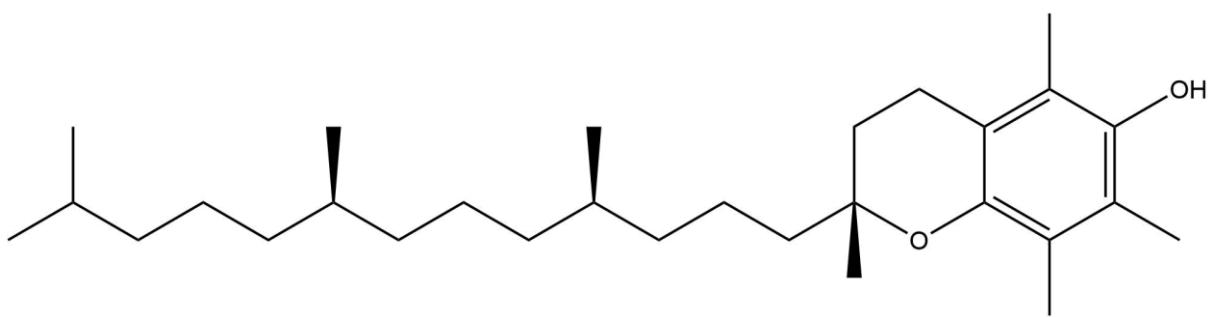
Il s'agit d'une molécule hydrosoluble que l'on retrouve dans la plupart des fruits et légumes et qui n'est pas synthétisée par l'homme. Reconnu pour son action protectrice contre l'oxydation des membranes (21).



**Figure 3 :** Structure chimique de l'acide ascorbique.

## 1.3.2.8. Vitamine E (les tocophérols)

Antioxydant alimentaires efficaces dont le rôle physiologique chez les humains, en tant que protecteurs des membranes et des lipoprotéines, ainsi qu'en tant qu'agents contre le stress oxydatif, est crucial. Empêchent la formation d'hydro-peroxydes en éliminant les radicaux (LOO<sup>•</sup>)(22). LOO<sup>•</sup> + T-OH = T-O<sup>•</sup> + LOOH

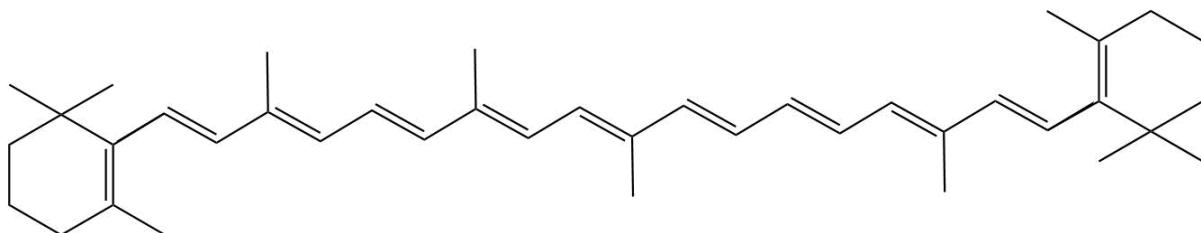


**Figure 4 :** Structure chimique de la vitamine E.

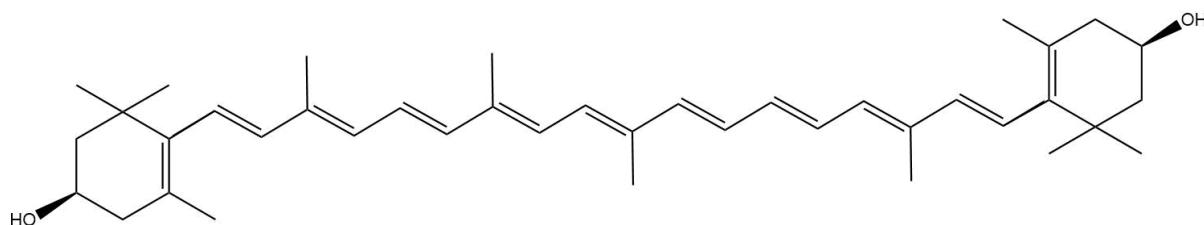
## 1.3.2.9. Caroténoïdes

Pigment issu de végétaux et de microorganismes, classé en deux catégories principales : les caroténoïdes et les xanthophylles. Sa capacité antioxydante découle de ses longues chaînes polyéniques, lui permettant d'interagir avec les radicaux en (ROO<sup>•</sup>), (HO<sup>•</sup>), (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) et (R<sup>•</sup>) par

simple addition électrophile et transfert 1 d'électrons. Aussi la neutralisation de l'oxygène singulet 1 O<sub>2</sub>. (23), (20)



**Figure 5 :** Structure chimique de β-Carotène.



**Figure 6 :** Structure chimique de Xanthophylle.

### 1.3.2.10. Zinc

Le zinc, un oligo-élément présent dans la structure de la superoxyde dismutase, démontre des propriétés antioxydantes qui contribuent à prévenir l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique et les altérations oxydatives. De plus, il possède des capacités antioxydantes qui rivalisent avec celles du fer et du cuivre (24).

### 1.3.2.11. Les composés phénoliques (Ph)

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires présents dans les plantes, caractérisés par une structure moléculaire commune de 2-phénylbenzopyrane. Leurs capacités antioxydantes sont dues à leurs caractéristiques structurelles, telles que la quantité et la position des groupes hydroxyles. Les polyphénols ont la capacité d'induire des dommages oxydatifs à travers divers mécanismes, tels que le transfert d'électrons/protons et la dégradation des métaux de transition.

## 1.4. Stress oxydatif et vieillissement

De nombreuses maladies humaines impliquent un stress oxydatif, qu'il soit localisé ou généralisé, dans leur développement est associées au processus de vieillissement, le stress oxydatif est identifié comme l'élément déclencheur principal de diverses maladies, telles que

les cancers, les pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), les maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale amyotrophique et maladie d'Alzheimer)(25) et Diverses voies de mort cellulaire apoptotique et nécrotique dans les structures auditives qui entraînent une perte auditive. (26)

## **2. Présentation botanique de la plante**

### **2.1. Classification botanique de la famille Linaceae**

La famille Linaceae appartient à l'ordre des Malpighiales et se caractérise par des plantes herbacées, arbustives ou parfois arborescentes, souvent dotées de feuilles simples et alternes, et de fleurs généralement actinomorphes et pentamères.

La classification botanique complète est la suivante :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Magnoliophyta (plantes à fleurs)
- **Classe** : Magnoliopsida (dicotylédones)
- **Ordre** : Malpighiales
- **Famille** : Linaceae

Cette famille comprend environ 250 espèces réparties principalement dans le genre *Linum*, connu notamment pour l'espèce *Linum usitatissimum* (27)

### **2.2. Propriétés thérapeutiques de la plante**

#### **2.2.1. Famille Linaceae**

Linaceae est reconnue pour ses nombreuses espèces médicinales, principalement grâce à la richesse en composés bioactifs tels que les lignanes, flavonoïdes, mucilages et acides phénoliques. Ces composés confèrent à ces plantes des propriétés thérapeutiques variées :

- Effets anti-inflammatoires et antioxydants, liés à la présence de flavonoïdes et lignanes.
- Propriétés laxatives grâce aux mucilages présents dans les graines, facilitant le transit intestinal.

- Activité antimicrobienne, avec des effets antibactériens et antifongiques démontrés dans certaines études ethnobotaniques.
- Utilisation traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, inflammatoires, et parfois des infections.

Ces propriétés justifient l'usage traditionnel des plantes de la famille Linaceae dans diverses pharmacopées régionales.

### 2.2.2. Genre *Linum*

Le genre *Linum*, notamment l'espèce *Linum usitatissimum* (lin cultivé), est particulièrement étudié pour ses applications thérapeutiques :

- Riche en acides gras oméga-3, il joue un rôle cardioprotecteur en réduisant le cholestérol sanguin.
- Ses composés antioxydants contribuent à la réduction du stress oxydatif, un facteur clé dans le vieillissement et les maladies chroniques.
- Effets anti-inflammatoires et laxatifs doux, liés aux mucilages contenus dans les graines.
- Usage traditionnel pour soulager les troubles digestifs, inflammatoires et certaines infections bactériennes.

D'autres espèces du genre *Linum* ont également montré des activités antimicrobiennes et antioxydantes, renforçant leur intérêt en phytothérapie.(28,29)

## 2.3. Études antérieures sur la plante

### 2.3.1. Activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits a été effectuée à l'aide de différentes méthodes, notamment le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage des radicaux ABTS, le pouvoir réducteur ferrique des antioxydants (FRAP) et la formation du complexe Fe<sup>+2</sup> phénanthroline.(30)

## 2.3.2. Activité antifongique

## 2.3.2.1. Champignon

## 2.3.2.2. Définition

Organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryote). Se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone (ce sont des hétérotrophes).

Leur paroi cellulaire contient typiquement de la chitine et du glucane. Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée.

L'évaluation de l'activité antifongique des traitements revêt une importance cruciale dans la détermination de leur efficacité.

## 2.3.2.3. Champignon phytopathogène

2.3.2.4. *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*

*Fusarium oxysporum*, un champignon phytopathogène du genre *Fusarium*, joue un rôle essentiel dans le développement de la maladie de la fusariose vasculaire, qui affecte la plante de tomate en provoquant un flétrissement des feuilles.(31,32)

## 2.3.3. Activité antibactérienne

Les plantes ne possèdent pas un système immunitaire spécifique capable de reconnaître une infection particulière ; cependant, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de micro-organismes.

Les bactéries sont des micro-organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans divers milieux environnementaux. La majorité des cellules possèdent une paroi cellulaire composée de glucides. Les bactéries de plus grande taille ont une dimension supérieure à 2 µm, tandis que celles de plus petite taille mesurent 0,2 µm. Les ultra microbactéries, y compris celles présentes dans les milieux aquatiques doux, sont également observées. (33)

La sélection des bactéries s'est concentrée sur deux souches courantes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes, à savoir les bactéries Gram positif et Gram négatif. L'efficacité des produits évalués et leur mode de pénétration dans la bactérie varient. Les souches bactériennes utilisées sont :

- Bactérie Gram négative (*Escherichia coli*).
- Bactérie Gram positive (*Staphylococcus aureus*).

## 2.3.3.1. Bactérie Gram négative

## 2.3.3.2. Escherichia coli

Actuellement, *Escherichia coli* est l'unique espèce approuvée appartenant au genre *Escherichia*. Cette bactérie est depuis longtemps reconnue pour être fréquemment présente dans le tube digestif tout en étant pathogène pour l'appareil urinaire En tant que témoin de la contamination fécale, dans l'eau et les aliments.(34–36)

## 2.3.3.3. Bactérie Gram positive

## 2.3.3.4. Staphylococcus aureus

Les Staphylocoques sont des microorganismes ubiquitaires largement répandus dans l'écosystème naturel de l'être humain, mais ils sont plus fréquemment présents et en plus grande densité sur les surfaces cutanées et muqueuses des mammifères. Les toxi-infections alimentaires à *S. Aureus* sont les infections nosocomiales les plus fréquentes en raison de leur ubiquité et de leur virulence pathogène.(34,37)

Les *Staphylocoques* possèdent une capacité pathogène opportuniste très étendue, qui se manifeste fréquemment dans un environnement hospitalier. (34)

## 2.3.4. Activité anti-inflammatoire in vitro

## 2.3.4.1. Inflammation

Réponse à une infection ou à une blessure, qui sont des perturbations extrêmes. En conséquence, elles provoquent des réponses inflammatoires d'une ampleur facilement observable(38), il y a cinq signes classiques de l'inflammation : rougeur, gonflement, chaleur, douleur et perte subséquente de la fonction organique(39), La réaction inflammatoire est initiée par la libération de médiateurs chimiques provenant des tissus et des cellules endommagés.

Selon la nature de la « cause irritante », nous distinguons les types d'inflammation suivants :

- Microbienne causée par (bactéries, virus, champignons)
- Auto-immune par des autoanticorps (diabète de type 1, sclérose en plaques)
- Allergique (allergènes comme l'asthme)
- Métabolique (surconsommation d'aliments et accumulation excessive de métabolites (par exemple, acide urique ou esters de cholestérol)
- L'inflammation physique (est causée par des traumatismes, des brûlures et des radiations)

#### 2.3.4.2. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des molécules capables d'inhiber la réponse inflammatoire de l'organisme. Qui implique la libération de médiateurs tels que les prostaglandines, les leucotriènes et les cytokines pro-inflammatoires par l'activation de voies enzymatiques(40). Les anti-inflammatoires agissent en ciblant ces médiateurs ou les enzymes responsables de leur production, afin de rétablir l'homéostasie tissulaire et limiter les dommages cellulaires(41).

#### 2.3.4.3. Activité anti hémolytique

L'effet anti-hémolytique des extraits de plantes de la famille des Linaceae, ainsi que leur capacité à protéger la membrane des globules rouges contre l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ont été étudiés. Les tests d'évaluation employés reposent sur la détermination de l'hémoglobine libérée, de couleur rouge, à la suite de la lyse des globules rouges, effectuée par méthode spectrophotométrique.(42)

## **Chapitre 02 : Matériels et Méthodes**

## **1. Matériels**

### **1.1. Matériel végétal**

La récolte des parties aériennes d'une plante de la famille des Linaceae est réalisée dans la wilaya de Skikda el kentour, à une altitude de 521 mètres au-dessus du niveau de la mer.

### **1.2. Matériel animal**

Des rats mâles de la souche *Wistar Albino* a été utilisés dans le but d'explorer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de ces échantillons sanguins. Des individus élevés au sein du centre animalier du département de Biologie Animale de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 dans le cadre d'une étude visant à analyser l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de leur sang.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Préparation des extraits**

#### **2.1.1. Préparation et Extraction de la plante**

##### **2.1.1.1. Extraction solide-liquide (macération)**

Le matériel végétal (la partie aérienne) a été placé dans un mélange de solvants (éthanol/eau, 70:30) à température ambiante pendant 72 heures. Cette étape a été répétée trois fois en renouvelant le solvant à chaque fois. Le but est d'extraire le maximum de principes actifs. Les débris ont été filtrés. Par la suite, le filtrat a été collecté et transféré dans un ballon à fond rond, puis introduit dans un évaporateur rotatif réglé à 45°C.

- ❖ Retirer la solution hydroalcoolique sous pression.
- ❖ Concentrer la solution. L'extrait éthanolique obtenu, également appelé extrait brut, a été laissé en repos pendant 24 heures avant d'être utilisé pour la préparation de différents extraits organiques.

### 2.1.1.2. Extraction liquide-liquide

Cette méthode repose sur la différence de solubilité des molécules en fonction de leur polarité entre deux phases liquides non miscibles, ce qui facilite l'extraction sélective des métabolites secondaires tels que les terpènes, les alcaloïdes ou les polyphénols.

Ce segment a débuté par la préparation de la phase aqueuse, puis a été suivi par des extractions utilisant des solvants de polarités différentes : l'Ether de pétrole (PE), dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), l'acétate d'éthyle (EtOAc), et le *n*-butanol (*n*-BuOH).

- ❖ **Extrait d'éther de pétrole** par l'ajout de 250 ml de solvant d'éther de pétrole à la phase aqueuse, puis en transférant le mélange dans une ampoule de décantation soigneusement fermée. Cette dernière a été soumise à une agitation énergique (sept à dix fois) et à une dégazéification régulière pour libérer l'excès de pression. Par la suite, le bouchon a été retiré et le mélange a été laissé en repos afin de permettre sa décantation et sa séparation. Cette procédure a été répétée trois fois, en ajoutant à chaque fois 250 ml de solvant. À la suite de la décantation, la phase organique a été récupérée, combinée et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 44°C. En revanche, la phase aqueuse est soumise à une nouvelle extraction avec un solvant plus polaire.
- ❖ **Extrait dichlorométhane** Après l'ajout de 250 ml de solvant ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) à la phase aqueuse obtenue à la suite de la décantation précédente, l'ampoule est agitée bien avant d'être laissée à décantation. Les deux phases ont été séparées et récupérées individuellement une fois bien définies. Cette procédure a été répétée trois fois, en ajoutant à chaque fois 250 unités de solvant. En fin de compte, la phase organique est placée dans le rotavapeur à 45°C pour être séchée, tandis que la phase aqueuse est soumise à une autre extraction avec un solvant plus polaire, l'acétate d'éthyle.
- ❖ **Extrait d'acétate d'éthyle** Après l'ajout de 250 ml de solvant l'acétate d'éthyle (EtOAc) à la phase aqueuse obtenue à la suite de la décantation précédente, l'ampoule est agitée bien avant d'être laissée à décantation. Les deux phases ont été séparées et récupérées individuellement une fois bien définies. Cette procédure a été répétée trois fois, en ajoutant à chaque fois 250 ml de solvant. En fin de compte, la phase organique est placée dans le rotavapeur à 43°C pour être

séchée, tandis que la phase aqueuse est soumise à une autre extraction avec un solvant plus polaire, le *n*-butanol.

- ❖ **Extrait *n*-butanolique** De façon similaire à la même procédure antérieure, un volume de 250 ml de solvant *n*-butanol (*n*-BuOH) a été introduit dans la phase aqueuse extraite, suivi d'une agitation et de trois répétitions du processus. À chaque itération, 250 ml de solvant ont été ajoutés. À la fin du processus, Une phase distincte a été obtenue et concentrer : la phase n-butanolique à l'aide d'un rotavapeur à une température de 65 °C.
- ❖ **Extrait de la phase aqueuse** a été récupéré et concentré dans le rotavapeur a une température 40°C.

Une fois l'extraction achevée, les extraits obtenus à partir de différentes extractions sont collectés et placés dans des récipients appropriés pour être séchés dans un environnement bien aéré.

## 2.2. Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes

### 2.2.1. Polyphénols totaux

#### 2.2.1.1. Principe

Le principe de cette méthode repose sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif Folin-Ciocalteu. Ce composé est formé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Elle induit la génération de la couleur bleue à une longueur d'onde entre 725 et 750 nm. La quantification des Polyphénols totaux est réalisée en comparant la densité optique (D.O) mesurée à celle de l'étalon de référence (acide gallique) de concentration connue (43) .

#### 2.2.1.2. Protocole

Afin de réaliser le dosage, il convient de dissoudre 1 mg d'extrait dans 1 ml de méthanol. Par la suite, 20 µl de cette solution sont déposés dans une microplaqué à 96 puits, auxquels sont additionnés 100 µl de FCR à 10% et 75 µl de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ). Le mélange est laissé à incuber à température ambiante dans l'obscurité pendant une durée de 2 heures, après quoi l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 765 nm. Un blanc est préparé de manière similaire, en substituant l'extrait par du méthanol.

### 2.2.1.3. Préparation de la gamme d'étalon d'acide gallique

Une courbe d'étalonnage standard a été établie de manière parallèle dans des conditions expérimentales identiques, en utilisant une solution mère préparée à partir d'acide gallique. Pour obtenir cette solution mère, il convient de dissoudre 1 mg d'acide gallique dans 5 mL de méthanol (MeOH), ce qui aboutit à une concentration de 200 µg/mL. Par la suite, une succession de dilutions a été effectuée à partir de cette solution mère.

**Tableau 3 :** Gamme d'acide gallique.

Concentrations de la solution étalon (L'acide gallique)	Dilutions de la solution S1
25µg /mL	25µl de S1+ 175µL de MeOH
50µg /mL	50µl de S1+ 150µL de MeOH
75µg /mL	75µl de S1+ 125µL de MeOH
100µg /mL	100µl de S1+100µL de MeOH
125µg /mL	125µl de S1+ 75µL de MeOH
150µg /mL	150µl de S1+ 50µL de MeOH
175µg /mL	175µl de S1+ 25µL de MeOH
200µg /mL	200µL de S1

Suite à l'ajout de 20 µL de chaque dilution dans une microplaqué, il convient d'incorporer 100 µL de FCR dilué à un taux de 1 :10, après de l'introduction de 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à une concentration de 7.5%. Il convient de laisser l'incubation se dérouler pendant une durée de 2 heures avant de procéder à la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 765 nm.

### 2.2.2. Flavonoïdes totaux

#### 2.2.2.1. Principe

Les concentrations des flavonoïdes ont été évaluées à l'aide d'une méthode basée sur l'utilisation du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). Cette réaction conduit à l'apparition d'une coloration jaunâtre, avec un pic d'absorption à 415 nm(44,45).

## 2.2.2.2. Protocole

Une quantité de 1 milligramme d'extrait est diluée dans 1 ml de méthanol. Dans une microplaqué à 96 puits, on ajoute 50 µL de l'extrait à 100 µL de méthanol. Par la suite, on ajoute 20 µL de nitrite de sodium et 20 µL de chlorure d'aluminium. Le mélange est laissé à incuber dans l'obscurité pendant une durée de 40 minutes à température ambiante. Par la suite, on procède à la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 415 nm. Un blanc est obtenu en substituant les réactifs par du méthanol (50 µL d'extrait + 150 µL de méthanol).

## 2.2.2.3. Préparation de la gamme d'étalement de la quercétine

Une solution mère de quercétine (S1) a été préparée en dissolvant 1 mg dans 5 mL de méthanol, ce qui a permis d'obtenir une concentration de 200 µg/mL. Les dilutions ont été réalisées dans des tubes Eppendorf comme décrit dans le tableau 5.

**Tableau 4 :** Gamme d'étalement de la quercétine.

Concentrations de la solution étalon (Quercétine)	Dilutions de la solution mère
25µg/mL	25µl de S2+ 175µL de MeOH
50µg/mL	50µl de S2+ 150µL de MeOH
75µg/mL	75µl de S2+ 125µL de MeOH
100µg/mL	100µl de S2+ 100µL de MeOH
125µg/mL	125µl de S2+ 75µL de MeOH
150µg/mL	150µl de S2+ 50µL de MeOH
175µg/mL	175µl de S2+ 25µL de MeOH
200µg/mL	200µl de S2

50 µL de chaque dilution sont transférés dans une microplaqué, suivis de l'addition de 130 µL de méthanol, 10 µL d'acétate de potassium ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et 10 µL de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Après une incubation de 40 minutes, la lecture est effectuée à 415 nm. Enfin, une courbe d'étalement de la quercétine est établie.

### 2.3. Activités biologiques

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de biochimie (laboratoire 05) situé au sein du centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBT).

#### 2.3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons des différents extraits (éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, *n*-butanol, phase aqueuse) ont été préparés à diverses concentrations, en commençant par les peser sur une balance analytique.

Après avoir pesé, on fait fondre 4 mg de chaque extrait dans 1 ml de solvant (MeOH) dans des tubes Eppendorf individuels, puis on les place dans un bain à ultrasons jusqu'à ce que les solutions soient homogénéisées.

Chaque solution d'extrait est diluée en six étapes selon l'équation 01 en ajoutant 0,5 ml de méthanol dans six tubes Eppendorf de 1 ml.

**Equation (1/2<sup>n</sup>)**, n : nombre de dilutions.

Remarque

- Avant la dilution
  - Le tube 01 contient un volume de 1 ml ( $V=1$  ml) contenant l'échantillon à une concentration de ( $C=1$ ).
  - Dans les six tubes restants, la valeur du volume est de 0.5 ml de méthanol.
- À la suite de la dilution
  - Les tubes 01 à 06 contiennent chacun  $V0.5$  ml des échantillons dilués à différentes concentrations.
  - Dans le dernier essai, le volume V est de 1 ml et la concentration C est de 1/26, soit 1/64 selon le tableau 6.

**Tableau 5:** Déférentes concentrations des dilutions des extraits par rapport à la concentration initiale.

Les tubes	01	02	03	04	05	06	07
Les concentrations	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64

### 2.3.2. Activités antioxydantes

Les antioxydants ont fait l'objet de nombreuses études dans les domaines de la biologie, de la médecine, de l'alimentation et des sciences de la nutrition. Des recherches approfondies ont été menées pour développer des méthodes de dosage adaptées aux aliments et aux systèmes biologiques (46).

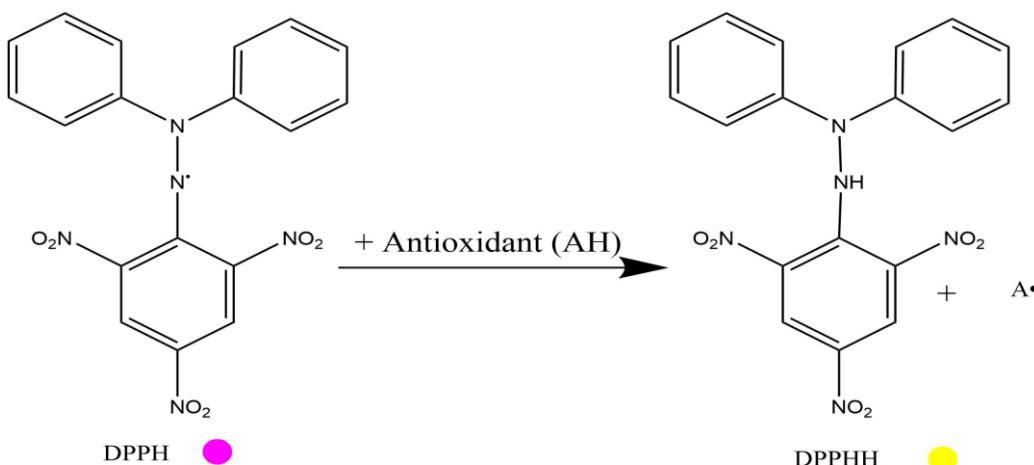
Plusieurs techniques analytiques ont été mises au point afin d'évaluer les caractéristiques antioxydantes des produits à base de plantes contenant des composés phytochimiques (47) (48) (49).

L'activité antioxydante est influencée par la structure chimique des composés ; plus spécifiquement, elle est déterminée par leur aptitude à réaliser des transferts d'atome d'hydrogène (HAT) ou des transferts d'électrons uniques (SET), ainsi que par leur capacité à délocaliser l'électron non-apparié au sein de la structure aromatique(50). L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) et le 2,2-di(4-tert-octylphényl) -1-picrylhydrazyl (DPPH) (51) (52) (53) sont des réactifs utilisés pour mesurer la capacité antioxydante des échantillons par des méthodes de décoloration. En revanche, le dosage total des phénols fait appel à la méthode du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) (54) (55). Diverses méthodes analytiques sont utilisées pour évaluer tous les aspects de leur activité antioxydante *in vitro*.

#### 2.3.2.1. L'activité de piégeage de radical libre DPPH

#### 2.3.2.2. Principe DPPH

Le DDPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) est un radical instable contenant un électron célibataire sur l'atome d'azote (56). En réalité, le DPPH est connu pour sa capacité à générer des radicaux libres stables. Lorsqu'une substance capable de céder un atome d'hydrogène réagit avec le DPPH, ce dernier subit une réduction, ce qui entraîne la perte de sa couleur violette (57). La diminution de l'intensité lumineuse est directement liée à la quantité de protons absorbés, ce qui se traduit par l'observation d'une teinte jaunâtre (58). Ce changement de coloration peut être mesuré précisément par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.



**Figure 7 :** Réduction du DPPH par un antioxydant(59).

#### 2.3.2.3. Protocole DPPH

La mesure de l'activité anti-radicalaire libre est effectuée par spectrophotométrie en utilisant le DPPH comme réactif (60). D'après Blois la solution de DPPH est préparée en dissolvant Une quantité de 6 mg de DPPH en 100 ml de méthanol (MeOH) et conservée à une température de -20°C, à l'abri de la lumière. L'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques de 96 puits, avec un volume de 200 µl dans chaque puits.

Dans les puits des microplaques, 160 µl de solution de DPPH fraîchement préparée on l'ajoute 40 µl d'extrait à différentes concentrations. Pour les derniers puits, un blanc est préparé en remplaçant l'extrait par du MeOH.

Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture a été effectuée à une longueur d'onde de 517 nm. Les composés standards utilisés dans des conditions réactionnelles similaires sont le BHA, le BHT et l' $\alpha$ -Tocophérol.

- Pourcentage d'inhibition :

La capacité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée en termes de pourcentage d'inhibition (%). Les résultats sont présentés sous forme d' $IC_{50}$ .

$IC_{50}$  correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH dans la solution réactionnelle.

Une valeur d' $IC_{50}$  plus basse indique une activité plus élevée et plus efficace.

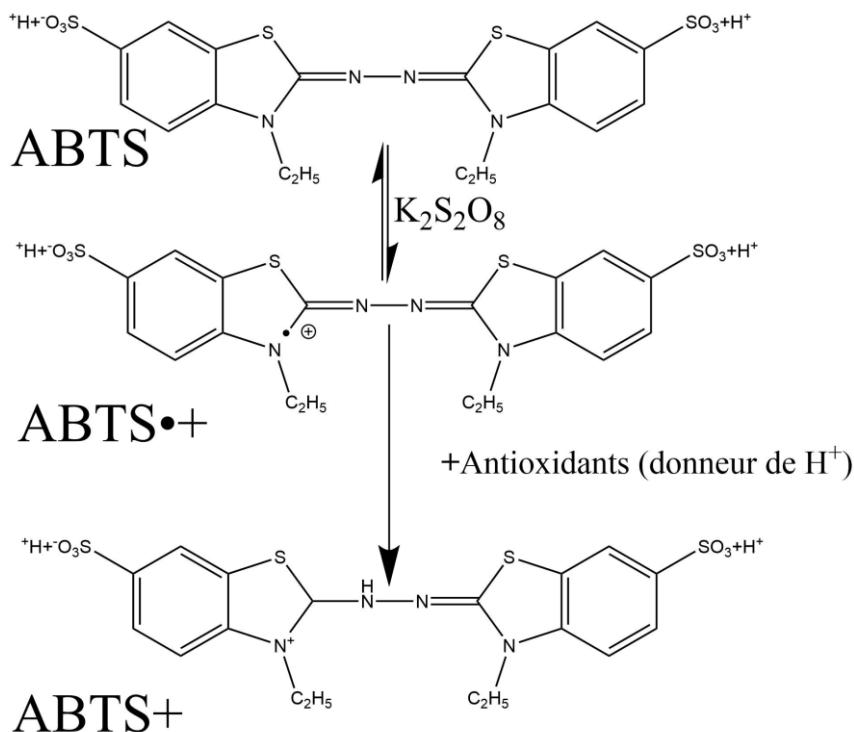
$$\text{PI}(\%)DPPH = \left( \frac{\text{A (contrôle)} - \text{A (extrait)}}{\text{A (contrôle)}} \right) * 100$$

- A (contrôle) : est l'absorbance de la réaction sans extrait (du blanc).
- A (extrait) : est l'absorbance de la réaction après avoir ajouté l'extrait.

#### 2.3.2.4. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup>

#### 2.3.2.5. Principe ABTS

La méthode spectrophotométrique du test ABTS est fréquemment employée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. En présence de persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), il subit une oxydation pour former l'ion radicalaire ABTS<sup>•+</sup> (61). La réaction se déroule en deux étapes distinctes : lors de la première étape, le radical ABTS<sup>•+</sup> est formé. La seconde réaction se produit en présence d'un donneur d'antioxydant H<sup>•</sup>, où le radical d'azote concerné capture un H<sup>•</sup>, ce qui conduit à la formation de l'ABTSH<sup>+</sup> incolore par la capture d'un proton par l'antioxydant(62,63). Cette variation est évaluée en utilisant la spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm.



**Figure 8 :** Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant.(64)

### 2.3.2.6. Protocole ABTS

L'activité de l'ABTS est évaluée selon la méthode décrite par (Re et al, 1999) (65) avec quelques ajustements mineurs.

La solution ABTS (7 mM) est préparée en utilisant du persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM) pour favoriser la formation de l'ABTS<sup>+</sup>. Le mélange est ensuite laissé à l'abri de la lumière, à température ambiante, pendant 12 à 16 heures. Par la suite, il est dilué. Le mélange a été réalisé avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'une absorbance de 0.7 ± 0.02 à 734 nm soit obtenue.

Dans les puits des microplaques, 160 µl de solution d'ABTS fraîche préparée, on l'ajoute 40 µl d'extrait à différentes concentrations. Pour les derniers puits, un blanc est préparé en remplaçant l'extrait par du MeOH.

La phase finale consiste en une incubation de 10 minutes dans l'obscurité à température ambiante, suivie de la lecture au spectrophotomètre de microplaques à une longueur d'onde de 734nm.

Les antioxydants utilisés dans des conditions réactionnelles similaires sont le BHA et le BHT.

- Pourcentage d'inhibition :

La capacité de piégeage du cation radical ABTS<sup>+</sup> a été évaluée en termes de pourcentage d'inhibition (%). Les résultats sont présentés sous forme d'IC<sub>50</sub>.

L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50 % cation radical ABTS<sup>+</sup> dans la solution réactionnelle.

Une valeur d'IC<sub>50</sub> plus basse indique une activité plus élevée et plus efficace.

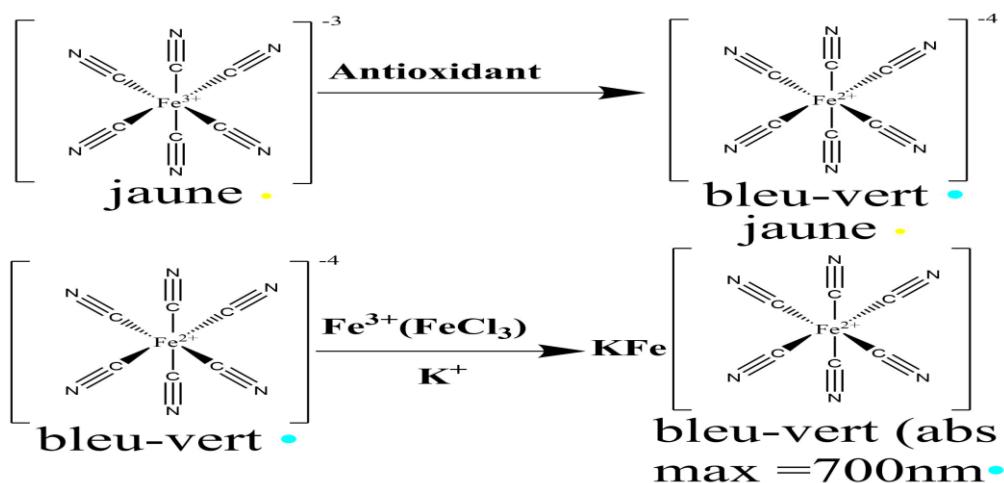
$$\text{PI}(\%) \text{ABTS} = \left( \frac{A (\text{contrôle}) - A (\text{extrait})}{A (\text{contrôle})} \right) * 100$$

- A (contrôle) : est l'absorbance de la réaction sans extrait (du blanc).
- A (extrait) : est l'absorbance de la réaction après avoir ajouté l'extrait.

## 2.3.2.7. Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

## 2.3.2.8. Principe FRAP

FRAP est une méthode colorimétrique utilisée pour évaluer le transfert d'électrons (66). Elle a été mise au point afin de quantifier la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , à un pH de (6.6), afin de maintenir la solubilité du fer (67). De teinte jaune se transformant en bleu-vert, ce pigment présente une absorption maximale à une longueur d'onde de 700 nm.



**Figure 9 :** Mécanisme réactionnel du test FRAP.(64)

## 2.3.2.9. Protocole

La capacité réductrice des extraits est évaluée selon le protocole décrit par Oyaizu (1986) (68) avec quelques ajustements mineurs.

La préparation des solutions pour la réaction commence par la préparation d'un tampon phosphate à pH (6.6), suivi de la solution de ferricyanure de potassium (1%)  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

On prépare les solutions de la réaction, on commence avec la préparation de tampon phosphate buffer à (pH=6.6).

Après la solution de ferricyanure de potassium (1%) (1 g de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  dans 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), suivie par tri-chloro-acide acétique (TCA) (10%) (1 g de TCA dans 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) et on finit par la solution ferrique chloride  $\text{FeCl}_3$  (0.1%) (0.1 g dans 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Dans les microplaques à 96 puits, on ajoute une quantité dans chaque puits : On ajoute 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations à 40  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (pH=6.6), tout en mélangeant avec 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%, puis on procède à l'incubation du mélange.

L'échantillon a été placé dans une étuve à une température de 50°C pendant une durée de 20 minutes.

Après l'incubation, trois solutions sont ajoutées : 50 µl de TCA (10%), 10 µl de FeCl<sub>3</sub> (0.1%) et 40 µl d'eau distillée. Il convient de noter la présence du blanc dans le dernier puits, qui suit la même procédure à l'exception de l'extrait, qui est remplacé par le MeOH. La longueur d'onde de la lecture est de 700 nm (68).

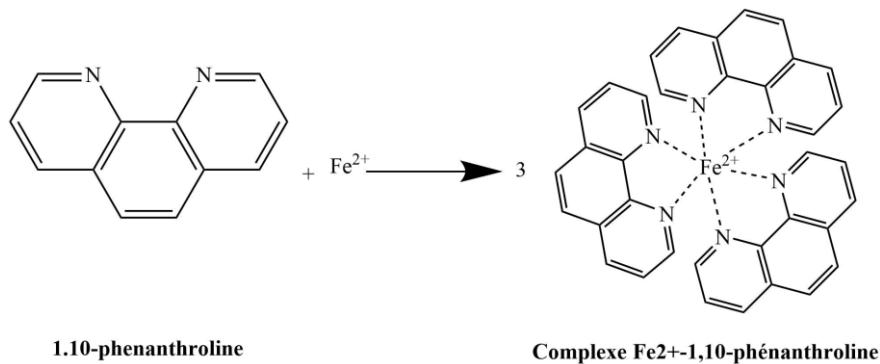
Les résultats ont été exprimés en A<sub>0.5</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), correspondant à une concentration associée à une absorbance de (0.5).

Les références utilisées dans des conditions réactionnelles similaires sont l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol.

### 2.3.2.10. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -phenanthroline

### 2.3.2.11. Principe phenanthroline

Ce protocole expérimental repose sur la réaction entre l'ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et la 1,10-phénanthroline, dans un milieu acide (pH 3-4) (69). L'ion ferreux forme un complexe rouge-orange spécifique avec la triphénanthroline qui présente une absorption maximale à 510 nm (70).



**Figure 10 :** Formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénanthroline(71).

### 2.3.2.12. Protocole

La détermination de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénanthroline des extraits est effectuée selon le protocole décrit par Szydlowska-Czerniak en 2008 (72).

Les solutions réactionnelles sont préparées en commençant par le phénanthroline (0.5 %) (0.05 g de 1,10-phénanthroline dans 10 ml de méthanol), suivi du chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (0.2%) (0,02 g de FeCl<sub>3</sub> dans 10 ml de H<sub>2</sub>O).

Dans les puits, 10 µl des extraits à différentes concentrations sont ajoutés, suivis par l'addition de 50 µl de FeCl<sub>3</sub> (0.2%), puis de 30 µl de phénanthroline (0.5%). Enfin, 110 µl de MeOH sont ajoutés, en prenant soin d'inclure un blanc (suivant la même procédure, mais en remplaçant l'extrait par du méthanol). Après une incubation de 20 minutes à 30°C dans une étuve, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 510 nm.

Les résultats ont été exprimés en A<sub>0.5</sub> (µg/ml), correspondant à une concentration associée à une absorbance de 0.50.

Les composés standards utilisés dans des conditions réactionnelles similaires sont le BHA, le BHT.

### 2.3.3. Activité antibactérienne

Lorsqu'il est question d'activité antibactérienne, on peut distinguer deux types d'effets : Une activité bactéricide se définit par sa capacité à éliminer les bactéries dans des conditions spécifiques.

Une inhibition de la croissance, également appelée bactériostatique, correspond à l'arrêt temporaire de la multiplication d'une population bactérienne (73). On entend par agents antibactériens les composés chimiques ayant la capacité d'inhiber la croissance ou de détruire les bactéries de façon ciblée, tout en préservant l'intégrité des tissus environnants. La plupart des agents antibactériens actuellement en usage sont des composés naturels qui ont été soumis à des modifications chimiques.

#### 2.3.3.1. Protocole

Une série de concentrations des extraits d'éther de pétrole, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane, de *n*-butanol et de phase aqueuse a été préparée de la manière suivante : Les concentrations utilisées pour la dilution étaient de 12, 25, 50 et 100 mg/ml, avec le DMSO comme solvant de dilution, un solvant réputé inerte. (74,75)

### 2.3.3.2. Souches testées

Les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (bactéries à gram négatif et positif) ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'éther de pétrole, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane, de *n*-butanol et de phase aqueuse.

### 2.3.3.3. Milieu de culture

Le milieu de culture gélosé (Muller Hinton) en fusion a été versé dans les boîtes de Pétri de manière à atteindre une épaisseur de 3 mm pour les boîtes ayant un diamètre de 90 mm.

Le milieu gélosé a été laissé refroidir et solidifier en plaçant les boîtes avec les couvercles sur une surface fraîche et horizontale ou sous une hotte à flux laminaire (76).

### 2.3.3.4. Repiquage des espèces bactériennes

Une colonie isolée et représentative de la souche a été prélevée dans des conditions stériles à l'aide d'une pipette pasteur stérile ou d'un ensemencEUR. Ensuite, la suspension a été ensemencée en stries sur une nouvelle boîte de milieu de culture, puis incubée à 37°C pendant 24 heures. S'il est confirmé que les nouvelles cultures obtenues sont conformes à celle initialement reçue, elles peuvent être employées dans la préparation de l'inoculum.

### 2.3.3.5. Préparation de l'inoculum

Des suspensions ont été préparées pour les trois espèces en question en utilisant des cultures bactériennes incubées pendant 24 heures.

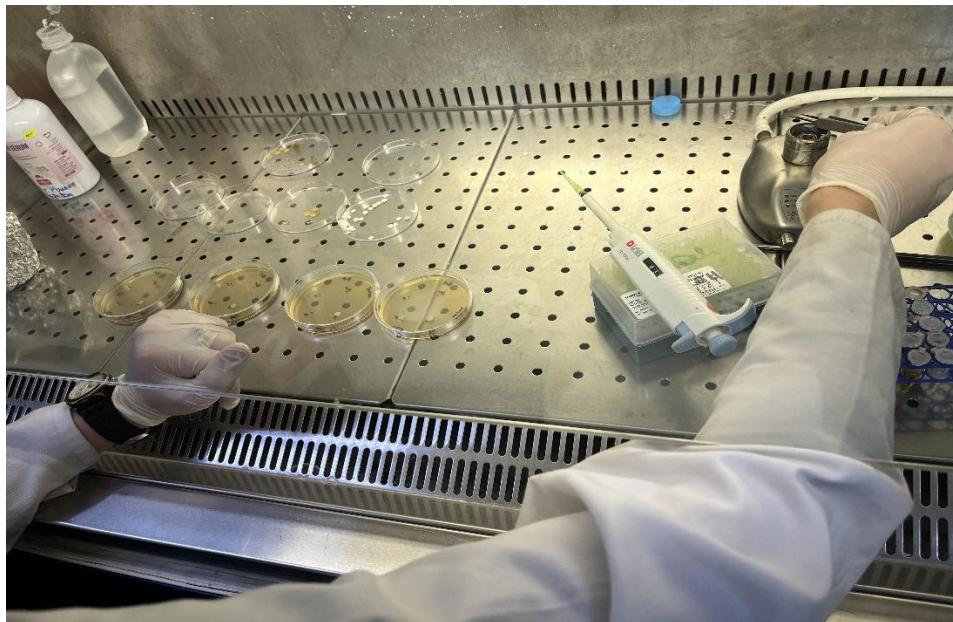
En utilisant une pipette Pasteur, il convient de prélever avec précision 2 à 3 colonies pures distinctes, puis de les transférer dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau physiologique stérile. Cette opération vise à obtenir un inoculum avec une densité optique (DO) comprise entre (0.08 et 0.1), qui sera mesurée à une longueur d'onde de 620 nm.

En cas d'inoculum insuffisant, il convient de l'ajuster en augmentant la quantité de culture ; en revanche, si l'inoculum est trop élevé, il est recommandé de le diluer en ajoutant de l'eau physiologique stérile. On transvase de manière aseptique du milieu gélosé (M.H) dans des boîtes de Petri en présence d'un bec bunsen, puis on laisse refroidir sur un banc de laboratoire.

Chaque souche a été placée dans deux boîtes. Par la suite, la culture bactérienne a été étendue sur la surface du milieu Mueller Hinton.

### 2.3.3.6. Dépôt des disques

En utilisant une micropipette, des disques de papier wattman N°4 stériles ont été imprégnés de 10 µl de chaque extrait (éther de pétrole, acétate d'éthyle, dichlorométhane, *n*-butanol et phase aqueuse), tandis que d'autres ont été imprégnés de DMSO et ont été utilisés comme témoins. Suite à la saturation complète des disques, des échantillons de chaque disque ont été déposés à la surface du milieu gélosé (contenant de l'éther de pétrole, de l'acétate d'éthyle, du dichlorométhane, du *n*-butanol, ainsi que de l'eau et des témoins). Par la suite, l'ensemble a été incubé à 37°C pendant 24 heures.



**Figure 11 :** Dépôt des disques dans les boîtes de Pétri.

L'activité antibactérienne de nos extraits a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle, puis en comparant ces mesures à celles obtenues avec du DMSO en tant que contrôle négatif et un antibiotique en tant que contrôle positif.

### 2.3.4. Activité antifongique

L'activité antifongique se définit comme la capacité d'un composé, qu'il soit d'origine naturelle ou synthétique, à inhiber la croissance, la germination des spores ou à éliminer les biofilms produits par les champignons pathogènes. Elle est évaluée à l'aide de méthodes microbiologiques *in vitro*, ce qui en fait un paramètre crucial dans le développement de nouveaux agents antifongiques efficaces contre les infections fongiques chez l'homme et les plantes.(77–79)

### 2.3.4.1. Préparation de milieux de culture PDA

Le milieu de culture à base de gélose glucosée, enrichie à l'extrait de pomme de terre est couramment utilisé pour quantifier les colonies de levures et de moisissures dans les échantillons alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. (80)

Quantités en grammes des ingrédients nécessaires pour 1300 ml d'eau distillée : On utilise 260 grammes de pommes de terre, 26 grammes de glucose et 26 grammes d'agar dans l'expérience.

- ❖ On procède à la mise en suspension de 260 g de pommes de terre dans 800 ml d'eau distillée, en chauffant le mélange à 370 °C jusqu'à ce qu'il atteigne son point d'ébullition.
- ❖ Il convient de récupérer et de filtrer le jus extrait des pommes de terre, puis de le compléter avec de l'eau distillée.
- ❖ Il convient de porter le milieu à ébullition tout en le maintenant sous agitation constante pendant une durée minimale d'une minute, en ajoutant soigneusement le glucose et l'agar.
- ❖ Procéder à la distribution dans des tubes ou des flacons.
- ❖ Autoclave à 121°C pendant 2h.



**Figure 12 :** Préparation du milieu de culture PDA.

La gélose stérile est chauffée dans un bain-marie pendant environ une heure jusqu'à ce qu'elle devienne liquide. Ensuite, elle est versée dans des boîtes de Petri avec une épaisseur de 4 à 5 mm dans une zone stérile à l'aide d'un bec bunsen, puis laissée à sécher à température ambiante près du bec bunsen pour éviter toute contamination par les bactéries présentes dans l'air.

### 2.3.4.2. Protocole

La technique de contact direct a été utilisée pour évaluer la sensibilité du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (Fol) à l'égard des extraits d'éther de pétrole, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane, de *n*-butanol et de phase aqueuse.

La technique consiste à préparer. Après la solidification du milieu de culture, un disque mycélien de 6 mm de diamètre est aseptiquement placé à la surface du milieu gélosé, au centre d'une boîte de Pétri de 8 cm de diamètre. Ensuite, 25 µl d'extrait à différentes concentrations sont déposés sur les fragments.

La quantité de milieu utilisée est de 20 ml par boîte de Petri. En plus des témoins négatifs constitués uniquement de PDA (Potato Dextrose Agar) avec du mycélium sans dépôt d'extrait, et des témoins positifs constitués de PDA avec du mycélium et 25 µl de solvant utilisé, chaque concentration a été répétée trois fois dans des boîtes de Pétri.

#### 2.3.4.3. Lecture des résultats

L'analyse des résultats ou l'évaluation de la croissance mycélienne a été réalisée à partir de 48 heures d'incubation à 28°C en mesurant le diamètre de la zone de croissance des thalles. En parallèle, on a mesuré le diamètre des colonies fongiques en l'absence des extraits (témoin).

- Détermination du P.I.c

D'après Boughendjioua (81), l'effet antifongique est évalué en mesurant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne à l'aide de la formule suivante :

$$P.I.c (\%) = (dt - dT/dt) \times 100$$

P.I.c : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%)

dt : la croissance diamétrale du témoin (cm).

dT : la croissance diamétrale du champignon en présence d'une concentration C d'extrait (cm).

L'activité antifongique de l'extrait alcalin étudié a été évaluée en fonction du pourcentage d'inhibition de la croissance diamétrale des colonies fongiques (%)

- ❖ 30 à 40 % : faible activité.
- ❖ 50 à 60 % : activité modérée.
- ❖ 60 à 70 % : bonne activité.
- ❖ >70 % : excellente activité.

### 2.3.5. Activité anti-inflammatoire in vitro

#### 2.3.5.1. La méthode de stabilisation des membranes (Activité anti hémolytique)

Cette étude a pour but d'évaluer la capacité des extraits d'une plante de la famille Linaceae à prévenir l'hémolyse des globules rouges (GR) de rats *Wistar Albino*, provoquée par un stress osmotique et thermique. En raison de sa similitude avec la membrane lysosomale, les extraits végétaux peuvent être envisagés pour stabiliser la membrane plasmique grâce à leurs propriétés antioxydantes.

Lorsque les érythrocytes, soumis à ces concentrations de sels hypotoniques et à la chaleur, ont libéré leur contenu cytoplasmique l'hémoglobine, en raison d'une rupture de la membrane.

On estime que l'intensité de l'hémolyse est déterminée en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée.

#### 2.3.5.2. Préparation de la suspension des érythrocytes (GR) :

La méthode d'Abe a été utilisée avec une légère modification(82).

- Du sang fraîchement prélevé à l'aide d'une seringue graduée sur des rats mâles de souche *Wistar albino* a été placé dans des tubes hépariné.
- Centrifugé ensuite à 1300g pendant 10 minutes (4°C) afin de séparer les globules rouges des autres composants sanguins.
- Après l'élimination du surnageant, le culot a été récupéré et lavé trois fois avec une solution saline physiologique (NaCl) à 0.9 % à température ambiante, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation à 1300 g pendant 5 minutes.
- Le culot post-centrifugation est ré-suspendu dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) à pH (7.4), en utilisant un volume de culot pour neuf volumes de PBS, ce qui permet d'atteindre 10% (v/v).

#### 2.3.5.3. Test de l'innocuité des extraits vis-à-vis des globules rouges

Il est indispensable d'effectuer un test d'innocuité sur les érythrocytes afin de déterminer les concentrations à utiliser pour étudier les propriétés de stabilisation membranaire des extraits d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol et aqueux issus du Linaceae.

## 2.3.5.3.1.1. Protocole

- Une série de concentrations d'extraits d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol et de phase aqueuse allant de 0 à 8 mg/ml a été élaborée dans un tampon phosphate salin (pH 7.4 ; 0.9% NaCl). Tous les échantillons ont été placés à l'intérieur de tubes à essai.
- 1,6ml de diverses concentrations des trois extraits à évaluer ont été mélangés avec 0.4 ml de la suspension de globules rouges à 10 %.
- Le mélange a été mis en incubation à une température de 37°C pendant une durée de 30 minutes.
- La centrifugation a été réalisée à une force de 1300g pendant une durée de 10 minutes.
- En suivant le même protocole, le contrôle a été préparé en ajoutant 0.4 ml de suspension à 10 % à un volume de 1.6 ml d'eau distillée ou d'eau physiologique, en remplacement de l'extrait où l'hémolyse est de 100 %, dans le but de le comparer aux extraits.
- La même chose pour le blanc a été préparé pour chaque concentration des extraits et des standards de référence afin d'éliminer l'absorbance de l'extrait et du PBS des résultats. Cette procédure a consisté à ajouter 1.6 ml des échantillons à tester à un volume de 0.4 ml de tampon phosphate salin (PBS).
- Le diclofénac a été utilisé comme molécule de référence dans cette expérience et a été préparé dans des conditions identiques.

La mesure de l'absorbance du surnageant post-centrifugation a été effectuée à une longueur d'onde de 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse, calculé de la manière suivante :

- Pourcentage d'hémolyse :

$$(\%) \text{ d'hémolyse} = \left( \frac{A (\text{échantillon}) - A (\text{blanc})}{A (\text{contrôle}) - A (\text{blanc})} \right) * 100$$

- A (échantillon) : Absorbance de l'échantillon ou standard (test).
- A (contrôle) : Absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse).
- A (blanc) : Absorbance de l'extrait.

### 2.3.5.4. La méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges contre stress osmotique associé à un stress thermique :

La méthode de Ganesh (83) a été appliquée pour évaluer l'impact de divers extraits de la plante Linaceae sur la stabilisation des érythrocytes suite à l'induction d'une hémolyse par une solution hypotonique combinée à des températures élevées.

#### 2.3.5.4.1. Protocole

- Un volume de 0.5 ml d'extraits d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol et aqueux (dissous dans une solution de NaCl à 0.9 %) a été placé dans des tubes à essai, dans lesquels a été ajouté un volume de 1,5 ml de tampon phosphate (non salin) (0.15 M, pH 7.4), suivi de l'ajout de 2 ml de solution hypertonique (NaCl à 0.36 %).
- Le mélange a été mis en incubation à une température de 37 °C pendant une durée de 20 minutes.
- Après l'incubation, 0.5 ml de la suspension d'érythrocytes à 10 % a été ajouté à chaque tube scellé, puis incubé à une température légèrement élevée de 56 °C pendant 30 minutes.
- Les tubes ont été immersés dans de l'eau du robinet pendant une durée de 20 minutes afin de les refroidir et ainsi d'arrêter la réaction.
- Ensuite, la solution a été centrifugée à une force de 1300g pendant une durée de 10 minutes. La mesure de l'absorbance du liquide en surface est effectuée à une longueur d'onde de 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Le contrôle implique le mélange de 2 ml de la solution hypotonique, 2 ml du tampon PBS, 0.5 ml de la suspension de globules rouges et 0.5 ml de solution saline.
- Afin d'éliminer l'absorbance provenant de l'extrait et du PBS des résultats obtenus, un blanc est préparé pour chaque concentration d'extrait ou de standard.
- L'acide gallique est employé en tant que molécule anti-inflammatoire dans le cadre d'un traitement, à des concentrations équivalentes à celles de l'extrait (0-800 µg/ml). Le pourcentage d'hémolyse est calculé de la manière suivante :

- Pourcentage d'hémolyse :

$$(\%) \text{ d'hémolyse} = \left( \frac{A (\text{échantillon}) - A (\text{blanc})}{A (\text{contrôle}) - A (\text{blanc})} \right) * 100$$

- A (échantillon) : Absorbance de l'échantillon ou standard (test).
- A (contrôle) : Absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse).
- A (blanc) : Absorbance de l'extrait.

## 2.4. Analyses statistiques

- ❖ Les histogrammes et les tableaux sont tracés à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2024.  
Les résultats des tests anti-inflammatoires sont généralement exprimés sous la forme de la moyenne accompagnée de l'écart-type.
- ❖ Les valeurs d'IC<sub>50</sub>, représentant la concentration inhibitrice à 50 %, sont déterminées à l'aide de la méthode de régression linéaire appliquée à la courbe [% d'inhibition = f (concentrations)].
- ❖ Les valeurs d'A<sub>0.5</sub> (correspondant à une absorbance de 0.50) sont déterminées en utilisant la méthode de régression linéaire basée sur la courbe [Absorbance = f (concentration)].

## **Chapitre 03 : Résultats et discussion**

Ce chapitre propose une analyse approfondie des résultats obtenus à partir des extraits de plantes provenant d'une espèce du genre Linaceae, dans le but d'évaluer leur potentiel biologique et pharmacologique. Divers paramètres ont été évalués pour définir les caractéristiques des extraits, notamment les taux d'extraction, ainsi que leur concentration en polyphénols et flavonoïdes, deux classes de composés reconnues pour leurs impacts positifs sur la santé qui sont les polyphénols et les flavonoïdes. La capacité antioxydante des extraits a été examinée en utilisant trois techniques différentes : le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), le test à l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Ces méthodes ont permis d'évaluer de manière approfondie la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres.

En parallèle l'efficacité antimicrobienne a été évaluée au moyen de tests microbiologiques pour mesurer l'inhibition de la croissance de deux pathogènes : *Escherichia coli* (une bactérie Gram-négative) et *Staphylococcus aureus* (une bactérie Gram-positive), ainsi qu'un test antifongique sur *Fusarium oxysporum*, un champignon impliqué dans diverses infections.

En plus de ces tests, l'effet anti-inflammatoire et anti-hémolytique des extraits a été examiné, en particulier en ce qui concerne leur capacité à prévenir la destruction des globules rouges, un paramètre crucial pour évaluer la sûreté et l'efficacité des extraits dans un cadre thérapeutique.

En dernier lieu, une évaluation de la cytotoxicité a été effectuée pour déterminer si ces extraits induisent des effets nocifs sur les cellules humaines.

Les résultats de ces analyses offrent une meilleure compréhension des propriétés bioactives de l'espèce végétale examinée, ainsi qu'une discussion sur leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques ou prophylactiques pour différentes pathologies. L'analyse qui va suivre examinera ces résultats à travers le prisme des recherches antérieures, mettant en avant les aspects positifs et les éventuelles contraintes des extraits, tout en explorant leurs applications potentielles dans les domaines de la santé et de la médecine traditionnelle.

### Rendement d'extraction

La première phase implique la mesure du rendement de l'extrait brut de la partie aérienne d'une espèce de la famille des *Linacées*, extrait par macération dans une solution hydroalcoolique.

Les résultats des calculs de rendement d'extrait brut sont exposés dans le tableau 6 ci-dessous :

**Tableau 6 : Rendement de l'extrait brut**

<b>Extrait brut</b>	
<b>Me (Masse de l'extrait brut sec (g))</b>	<b>126.5</b>
<b>M (Masse du matériel végétal sec (g))</b>	<b>449.19</b>
<b>R (Rendement d'extraction (%))</b>	<b>28.16</b>

Les résultats indiquent que l'extrait brut affiche des rendements respectifs de 28.16 % pour la partie aérienne de la plante de la famille Linaceae. Il convient de noter que la diversité des résultats obtenus d'un échantillon à l'autre est influencée par la technique employée (notamment le choix des solvants) et par les conditions d'extraction (à température ambiante ou à chaud).

Les résultats indiquent que l'extrait brut, obtenu après macération hydroalcoolique, affiche un rendement de 28.16 % pour la partie aérienne de la plante de la famille des Linaceae. Cet extract brut a ensuite été fractionné par extraction liquide-liquide pour obtenir cinq extraits, avec une polarité croissante des classes de produits, allant de la phase éthérée jusqu'à la phase *n*-butanolique. La cinquième phase est aqueuse, appauvrie en métabolites secondaires, et abrite les composés les plus polaires.

## 3. Résultats et discussions des activités biologiques

### 3.1. Dosages des polyphénols et Flavonoïdes

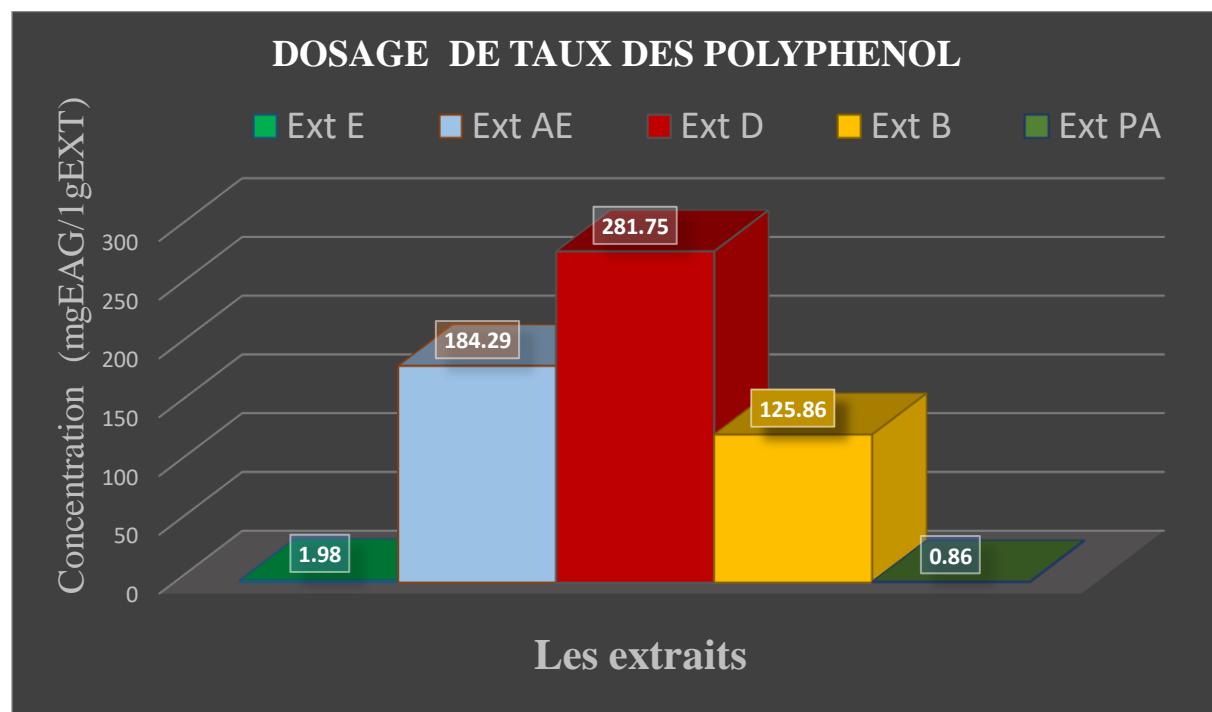
#### 3.1.1. Polyphénols totaux

Pour quantifier la concentration totale de polyphénols présents dans les extraits, une analyse a été effectuée en utilisant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, une technique couramment utilisée pour déterminer les polyphénols totaux. Cette méthode repose sur une réaction chimique qui permet d'évaluer la quantité de polyphénols en fonction de leur capacité de réduction. Les résultats obtenus à partir de cette analyse sont présentés dans le tableau 7 et

la figure 13. Ils sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait, ce qui permet de comparer la concentration en polyphénols des différents extraits testés de manière standardisée.

**Tableau 7 : Contenu total en polyphénols des extraits.**

Extraits	Contenues totales de composés phénoliques (en mg EAG/1g EXT)
Ether de pétrole	1.98 ± 5.30
Acétate d'éthyle	184.29 ± 10.41
Dichlorométhane	281.75 ± 18.56
<i>n</i> -Butanolique	125.86 ± 4.12
Phase aqueuse	0.86 ± 2.28



**Figure 13 : Histogramme des teneurs en polyphénols totaux des extraits.**

Les résultats obtenus lors de l'analyse de la concentration en polyphénols des différents extraits révèlent des variations notables entre les échantillons testés. L'extrait de dichlorométhane se distingue par la plus forte teneur en polyphénols, avec une concentration de  $281.75 \pm 18.56$  mg EAG/1g EXT, indiquant une grande richesse en ces composés. Il est suivi par l'extrait d'acétate

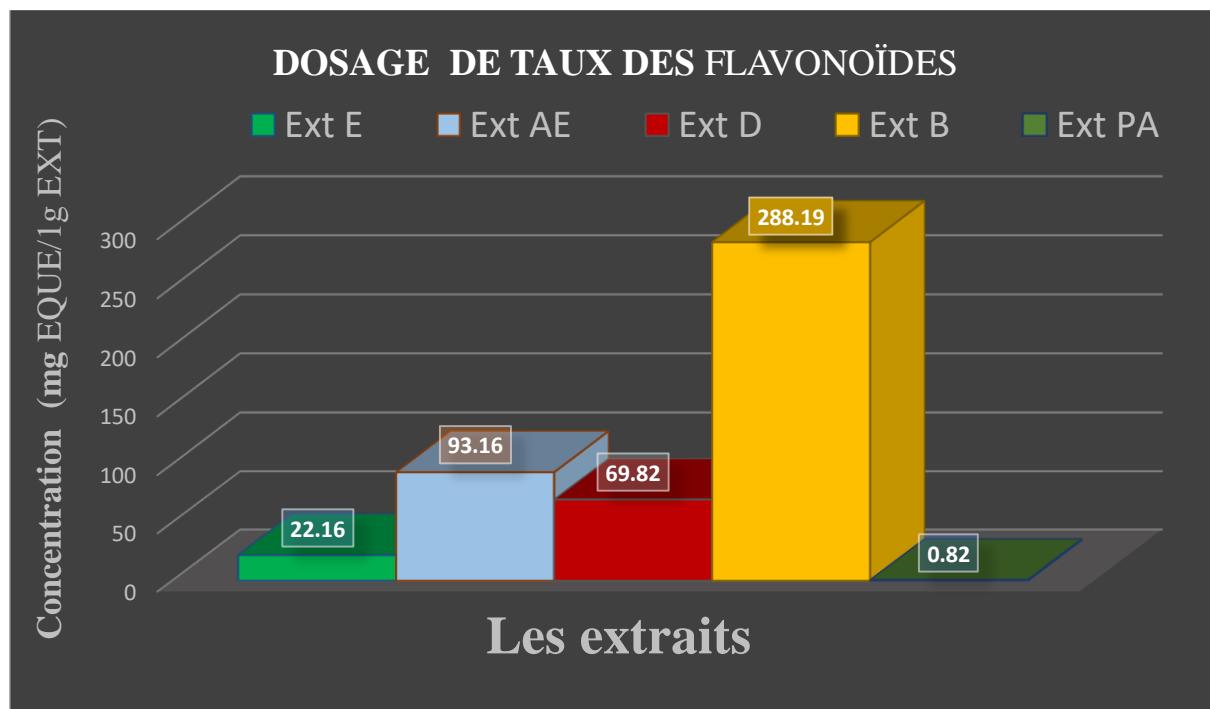
d'éthyle, dont la concentration atteint  $184.29 \pm 10.41$  mg EAG/1g EXT, et par l'extrait de *n*-butanol, qui présente une teneur de  $125.86 \pm 4.12$  mg EAG/1g EXT. Ces trois extraits montrent des valeurs relativement élevées en polyphénols, ce qui pourrait suggérer une activité antioxydante potentiellement significative. En revanche, les extraits d'éther de pétrole et la phase aqueuse affichent des concentrations nettement plus faibles, respectivement de  $1.98 \pm 5.30$  mg EAG/1g EXT et  $0.86 \pm 2.28$  mg EAG/1g EXT. Ces résultats suggèrent que les solvants utilisés pour l'extraction, ainsi que leurs propriétés de polarité, influencent fortement la capacité des extraits à contenir des polyphénols, les extraits plus polaires étant généralement plus riches en ces composés bioactifs.

### 3.1.2. Flavonoïdes totaux

Les niveaux de flavonoïdes ont été évalués à l'aide d'une méthode basée sur l'emploi de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). La quercétine a été utilisée comme référence, montrant un pic d'absorption à 415 nm. Les résultats sont exposés à la fois dans le tableau 8 et dans la figure 14.

**Tableau 8 :** Contenu total en flavonoïdes des extraits.

Extraits	Contenues totales de flavonoïdes (en mg EQUE/1g EXT)
Ether de pétrole	$22.16 \pm 4.37$
Acétate d'éthyle	$93.16 \pm 6.59$
Dichlorométhane	$69.82 \pm 2.46$
<i>n</i> -Butanolique	$288.19 \pm 6.88$
Phase aqueuse	$0.82 \pm 3.67$



**Figure 14 :** Histogramme des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait *n*-butanolique présente la plus forte concentration en flavonoïdes, avec une teneur de  $288.19 \pm 6.88$  mg EQUE/1g EXT. Il est suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle, dont la concentration est de  $93.16 \pm 6.59$  mg EQUE/1g EXT, indiquant également une quantité notable de flavonoïdes. En troisième position, l'extrait de dichlorométhane montre une concentration de  $69.82 \pm 2.46$  mg EQUE/1g EXT, bien que cette teneur soit plus faible comparée aux deux premiers extraits. Les extraits d'éther de pétrole et la phase aqueuse présentent des concentrations significativement plus faibles en flavonoïdes, respectivement de  $22.16 \pm 4.37$  mg EQUE/1g EXT et  $0.82 \pm 3.67$  mg EQUE/1g EXT. Ces différences de concentration peuvent être attribuées à la polarité des solvants utilisés lors de l'extraction, les solvants plus polaires étant généralement plus efficaces pour extraire les flavonoïdes.

Les extraits botaniques, en particulier ceux issus de plantes comme celles de la famille des Linaceae, sont largement reconnus pour leur richesse en antioxydants, ce qui a motivé les tests réalisés dans cette étude pour évaluer leur potentiel antioxydant. Afin de mieux comprendre l'efficacité de ces extraits, quatre méthodes distinctes ont été employées pour mesurer leur activité antioxydante. Les extraits testés incluent l'éther de pétrole (Ext E), l'acétate d'éthyle

(Ext AE), le dichlorométhane (Ext D), l'extrait *n*-butanolique (Ext B) et l'extrait aqueux (PA). extraits et de déterminer leur potentiel dans des applications thérapeutiques ou industrielles.

Pour comparaison, des contrôles positifs tels que le BHA, le BHT, l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol ont été utilisés, ces composés étant bien établis pour leurs propriétés antioxydantes. L'ensemble de ces tests permet d'évaluer de manière rigoureuse l'activité antioxydante de ces extraits et de déterminer leur potentiel dans des applications thérapeutiques ou industrielles.

### **3.2. Activités anti oxydantes *in vitro***

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée pour les extraits d'éther de pétrole, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane, de *n*-butanol, ainsi que pour la phase aqueuse. Les contrôles positifs utilisés dans cette étude comprennent le BHA, le BHT, l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol.

#### **3.2.1. Activité de piégeage de radical libre DPPH**

Le radical libre DPPH quand il subit une réduction, ce qui entraîne la perte de sa couleur violette au jaune. Ce changement de coloration peut être mesuré précisément par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats (tableau 9, figure 15 et 16) ont été comparés aux standards BHA et BHT.

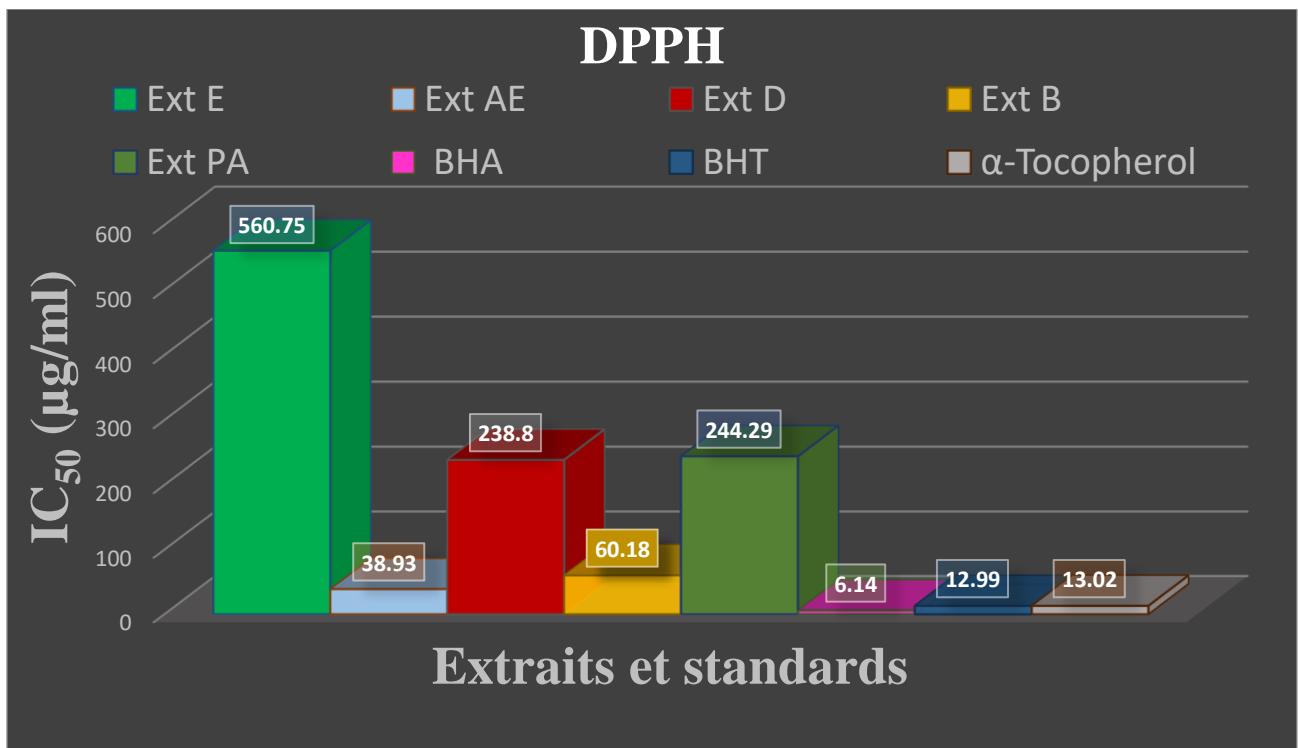
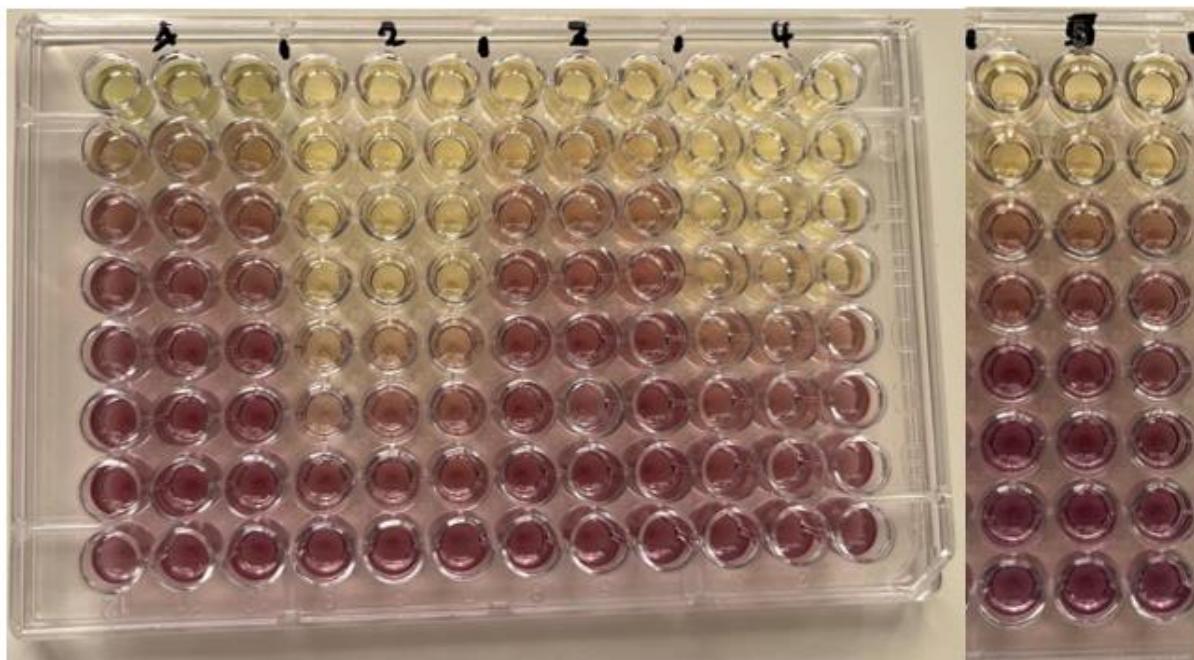


Figure 15 : Histogramme des valeurs d'IC<sub>50</sub> du test DPPH.

**Tableau 9 :** Inhibition du DPPH par les extraits de la plante de la famille Linaceae

Extraits	Pourcentage Inhibition (%) de DPPH							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> µg
Ext E	1.84±0.00	3.04±0.34	7.88±0.00	14.31±1.04	22.85±1.37	41.74±1.97	65.81±2.00	560.75±16.95
Ext AE	18.39±1.15	35.05±1.51	62.49±1.32	85.03±0.94	87.31±0.25	86.72±0.25	85.41±0.41	38.93±0.35
Ext D	4.72±2.93	8.26±2.64	14.03±1.64	24.05±1.47	42.89±0.84	66.73±1.25	80.78±0.09	238.80±15.89
Ext B	14.14±1.67	26.39±0.47	44.74±0.94	75.39±2.50	86.44±0.85	86.99±0.34	86.23±0.19	60.18±1.41
Ext PA	1.19±0.60	3.57±0.79	6.01±2.31	20.77±1.91	42.03±1.01	80.66±0.30	84.26±0.27	244.29±2.06
BHA	76.55± 0.48	79.89±0.26	81.73±0.10	84.18±0.1	87.13±0.17	89.36±0.19	90.14±0.00	6.14±0.41
BHT	49.09±0.76	72.63±2.06	88.73±0.89	94.00±0.31	94.97±0.08	95.38±0.41	95.02±0.23	12.99±0.41
α -Tocopherol	37.21±1.82	81.53±1.51	89.23±0.12	89.38±0.19	89.45±0.22	89.99±0.23	89.52±0.33	13.02±5.17



**Figure 16 :** Résultats du test DPPH sur microplaques.

Les résultats obtenus à partir du test DPPH indiquent que l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE) possède l'activité anti-radicalaire la plus élevée parmi les extraits testés, avec une valeur de  $IC_{50}$  de  $38.93 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ . Cette activité est suivie par l'extrait *n*-butanolique (Ext B), qui présente un  $IC_{50}$  de  $60.18 \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$ , suggérant qu'il est également relativement puissant dans sa capacité à piéger les radicaux libres. L'extrait de dichlorométhane (Ext D) affiche une activité moindre, avec un  $IC_{50}$  de  $238.80 \pm 15.89 \mu\text{g/ml}$ , tandis que l'extrait aqueux (Ext PA) et l'extrait d'éther de pétrole (Ext E) présentent des  $IC_{50}$  plus élevés, respectivement de  $244.29 \pm 2.06 \mu\text{g/ml}$  et  $560.75 \pm 16.95 \mu\text{g/ml}$ , ce qui indique une efficacité beaucoup plus faible en termes d'activité antioxydante.

Lorsque l'on compare ces résultats avec les standards utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante, on constate que l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE) est près de trois fois moins actif que le BHT ( $IC_{50} = 12.99 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ ) et presque six fois moins actif que le BHA ( $IC_{50} = 6.14 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$ ), des composés bien connus pour leurs propriétés antioxydantes. Bien que l'Ext AE montre une activité antioxydante significativement inférieure à celle des standards, sa performance reste notable par rapport aux autres extraits testés.

Il est intéressant de noter que la concentration en polyphénols et en flavonoïdes semble corrélée à l'activité antioxydante observée. L'extrait *n*-butanolique, qui a montré une concentration relativement élevée en flavonoïdes ( $288.19 \pm 6.88 \text{ mg EQUE/1g EXT}$ ), présente une activité antioxydante plus marquée que l'extrait d'acétate d'éthyle, malgré une concentration en flavonoïdes plus faible ( $93.16 \pm 6.59 \text{ mg EQUE/1g EXT}$ ). Cela suggère que, bien que les

flavonoïdes jouent un rôle crucial dans l'activité antioxydante, d'autres facteurs, tels que la composition chimique globale de l'extrait, peuvent également influencer l'efficacité de la réduction des radicaux libres.

De plus, les extraits d'éther de pétrole ( $1.98 \pm 5.30$  mg EAG/1g EXT) et de la phase aqueuse ( $0.86 \pm 2.28$  mg EAG/1g EXT) ont montré les plus faibles concentrations en polyphénols, ce qui pourrait expliquer leur faible activité antioxydante dans le test DPPH. La faible quantité de polyphénols dans ces extraits pourrait limiter leur capacité à interagir avec les radicaux libres et à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

En conclusion, bien que l'extrait d'accétate d'éthyle (Ext AE) montre une activité antioxydante notable, il reste moins efficace que les standards comme le BHA et le BHT. Cependant, les extraits présentant des concentrations plus élevées en polyphénols et flavonoïdes, comme l'extrait *n*-butanolique (Ext B), montrent également une activité antioxydante intéressante. Ces résultats soulignent l'importance de la composition chimique des extraits dans la détermination de leur activité antioxydante, ainsi que la nécessité d'une évaluation complète de leur potentiel à neutraliser les radicaux libres.

### 3.2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup>

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée en utilisant la méthode ABTS<sup>•+</sup>, qui repose sur la réduction de l'ion radicalaire ABTS<sup>•+</sup> en ABTS<sup>+</sup>, un composé incolore, en présence d'un donneur de protons (H<sup>+</sup>), tel qu'un antioxydant. Ce processus de réduction, qui reflète l'aptitude d'un extrait à neutraliser les radicaux libres, a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm, permettant ainsi une évaluation précise de l'activité antioxydante. Cette méthode permet de quantifier l'absorbance de la lumière par la solution, ce qui est directement lié à la capacité de l'extrait à éliminer les radicaux ABTS<sup>•+</sup>.

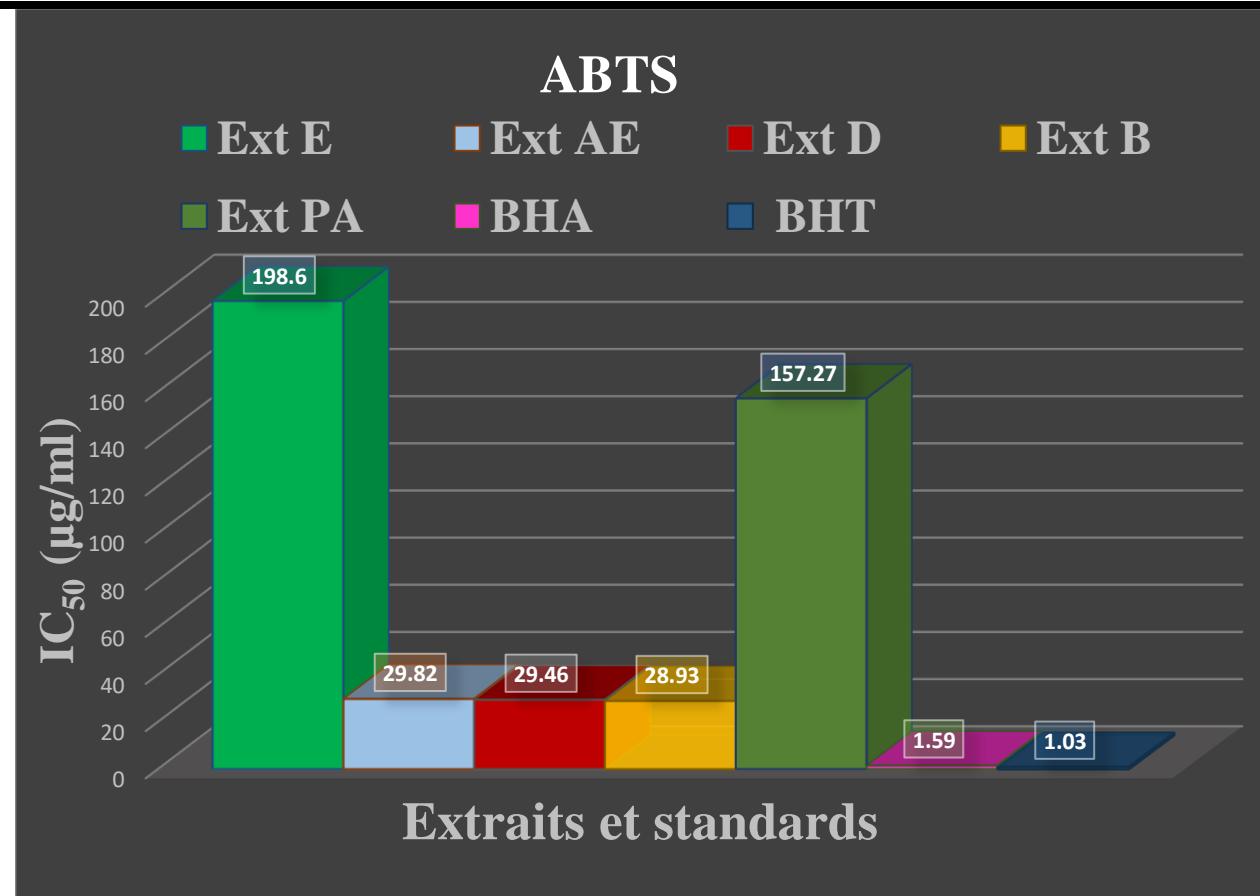
Les résultats obtenus, qui sont présentés dans le tableau 10 ainsi que dans les figures 17 et 18, ont été comparés à ceux des standards BHT (butylhydroxyToluène) et BHA (butylhydroxyAnisole), deux antioxydants largement utilisés et bien connus pour leurs capacités à interagir avec les radicaux libres. La comparaison avec ces standards permet d'évaluer l'efficacité relative de chaque extrait dans la neutralisation des radicaux libres, offrant ainsi un aperçu de leur potentiel antioxydant.

## CHAPITRE 03

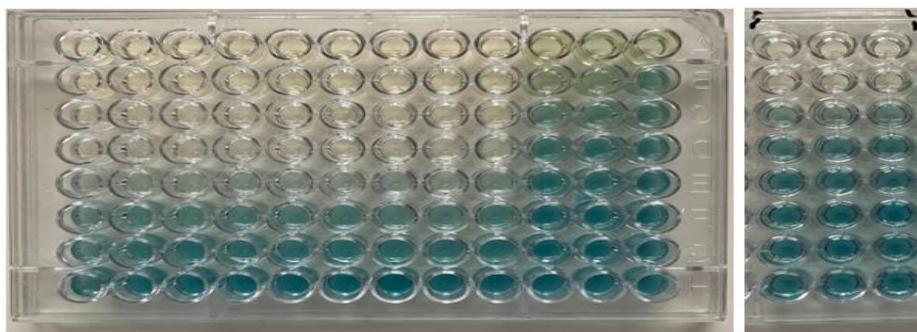
## Résultats et discussion

**Tableau 10 :** Inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> par les extraits de la plante de la famille Linaceae.

Extraits	Pourcentage Inhibition (%) de ABTS							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC <sub>50</sub> µg
Ext E	9.73±0.35	14.09±1.52	21.88±0.08	30.83±1.70	50.39±0.16	67.69±1.79	78.15±4.55	198.60±2.54
Ext AE	29.28±2.72	46.92±1.30	71.91±4.57	88.51±0.81	91.47±2.24	91.79±0.29	92.92±0.21	29.82± 0.36
Ext D	31.16±1.37	45.13±2.57	72.80±3.70	91.65±1.81	92.92±0.16	93.20±0.16	93.34±0.08	29.46± 0.36
Ext B	30.13±6.22	47.62±1.90	72.29±0.51	89.12±0.94	91.09±2.85	91.23±1.97	92.36±0.81	28.93±2.30
Ext PA	8.40±1.31	10.20±3.84	26.73±0.28	36.58±0.66	59.80±1.97	91.73±0.68	92.71±0.41	157.27±6.18
	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	IC <sub>50</sub> µg/mL
BHA	49.22± 0.75	59.22± 0.59	78.55± 3.43	90.36± 0.00	92.18± 1.27	93.37± 0.86	94.87± 0.87	1.59± 0.03
BHT	83.42± 4.09	93.52± 0.09	93.58± 0.09	93.63± 0.16	93.63± 0.95	94.20± 0.90	95.39± 2.62	1.03± 0.00



**Figure 17 :** Histogramme des valeurs d'IC<sub>50</sub> du test ABTS.



**Figure 18 :** Résultats du test ABTS sur microplaques.

Les résultats obtenus dans le cadre du test ABTS<sup>+</sup> illustrent des variations significatives de l'activité antioxydante entre les différents extraits testés, bien que tous soient moins efficaces que les standards de référence, BHT et BHA, en termes de capacité à piéger les radicaux ABTS<sup>+</sup>. L'extrait *n*-butanolique (Ext B) présente une valeur IC<sub>50</sub> de 28.93 ± 2.3 µg/ml, ce qui en fait l'extrait le plus actif parmi ceux testés. Il est suivi de près par l'extrait de dichlorométhane (Ext D) avec un IC<sub>50</sub> de 29.46 ± 0.36 µg/ml, et de l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE) qui affiche un IC<sub>50</sub> de 29.82 ± 0.36 µg/ml. Ces trois extraits montrent une activité antioxydante relativement similaire et sont considérablement plus efficaces que l'extrait aqueux (Ext PA) et l'extrait d'éther de pétrole (Ext E), qui présentent des valeurs IC<sub>50</sub> de 157.27 ± 6.18 µg/ml et 198.6 ± 2.54 µg/ml, respectivement. Cette différence de performance est en partie expliquée par la concentration en polyphénols et flavonoïdes présents dans chaque extrait, les extraits ayant des concentrations plus élevées en ces composés ayant généralement une meilleure activité antioxydante.

Il est pertinent de noter que l'extrait *n*-butanolique (Ext B), bien qu'il soit l'extrait le plus actif parmi ceux testés, reste presque dix-neuf fois moins efficace que le BHT (IC<sub>50</sub> = 1.59 ± 0.03 µg/ml) et vingt-neuf fois moins efficace que le BHA (IC<sub>50</sub> = 1.03 ± 0.00 µg/ml), deux standards antioxydants largement utilisés. Cela suggère que, bien que l'Ext B présente une activité antioxydante intéressante, elle demeure bien inférieure à celle des références dans les conditions de l'étude. En parallèle, les résultats obtenus à partir des tests de DPPH renforcent ces observations, car l'extrait *n*-butanolique (Ext B) a également montré une activité antioxydante significative, avec une IC<sub>50</sub> de 60.18 ± 1.41 µg/ml, ce qui confirme la bonne capacité de cet extrait à neutraliser les radicaux libres. Comparativement, l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE), qui possède une concentration relativement élevée en flavonoïdes (93.16 ± 6.59 mg EQUE/1g EXT), a montré une activité antioxydante moins prononcée que l'Ext B dans les tests DPPH et ABTS<sup>+</sup>, suggérant que la composition chimique et la structure des flavonoïdes présents dans l'extrait *n*-butanolique pourraient favoriser une meilleure interaction avec les radicaux libres.

Les extraits d'éther de pétrole (Ext E) et de la phase aqueuse (Ext PA), ayant des concentrations faibles en polyphénols ( $1.98 \pm 5.30$  mg EAG/1g EXT et  $0.86 \pm 2.28$  1g EXT EAG/1g EXT, respectivement), ont présenté des capacités antioxydantes bien plus faibles, comme en témoignent leurs valeurs IC<sub>50</sub> plus élevées dans les deux tests (DPPH et ABTS). Cette observation met en évidence l'importance des polyphénols dans l'activité antioxydante des extraits botaniques, suggérant que des concentrations plus élevées en ces composés sont souvent associées à une meilleure capacité de neutralisation des radicaux libres.

En résumé, les résultats du test ABTS<sup>+</sup> confirment que l'extrait *n*-butanolique (Ext B) est le plus actif parmi ceux testés, bien que son efficacité reste largement inférieure à celle des standards de référence. Les tests de DPPH et ABTS<sup>+</sup> convergent pour suggérer que les extraits riches en polyphénols et flavonoïdes, comme l'Ext B et l'Ext AE, montrent une capacité significative à neutraliser les radicaux libres, mais que cette capacité est modérée par rapport aux composés antioxydants synthétiques comme le BHT et le BHA. Cette analyse souligne l'importance de la concentration en polyphénols et flavonoïdes dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits botaniques, et met en lumière les différences d'efficacité selon les types de solvants et les conditions d'extraction.

### 3.2.3. Activité du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

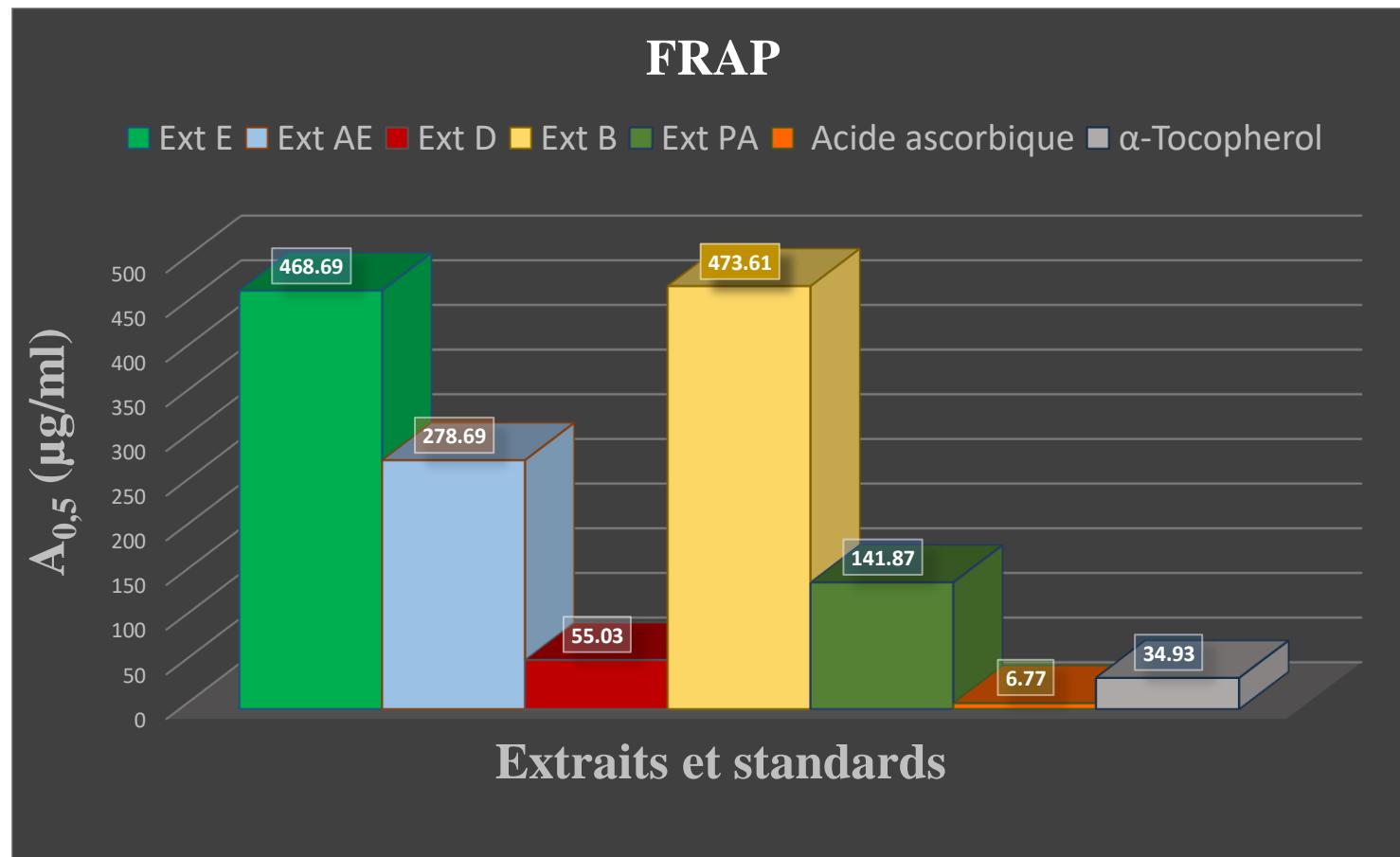
Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), qui évalue le pouvoir antioxydant réducteur ferrique, repose sur la capacité des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>), un ion de couleur jaune, en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), dont la couleur est bleu-vert. Ce test permet ainsi de mesurer l'efficacité des composés antioxydants à interagir avec et réduire les ions métalliques, ce qui est un indicateur direct de leur activité antioxydante. Le changement de couleur, allant du jaune au bleu-vert, est proportionnel à la quantité de fer ferrique réduit et, par conséquent, à la capacité antioxydante de l'échantillon testé. Les valeurs d'absorbance de cette réaction sont mesurées à une longueur d'onde de 700 nm, une méthode couramment utilisée pour suivre les réactions de réduction des ions métalliques, car elle offre une mesure précise et fiable de l'intensité du changement colorimétrique.

Les résultats obtenus à partir de ce test ont été présentés sous forme de données dans le tableau 11 et les figures 19 et 20 correspondantes. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les standards de référence, à savoir le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butylhydroxytoluène), deux antioxydants synthétiques largement utilisés dans l'industrie en raison de leur forte activité antioxydante. En utilisant ces standards, il est possible d'évaluer la capacité des extraits testés à réduire les ions ferriques par rapport aux antioxydants connus,

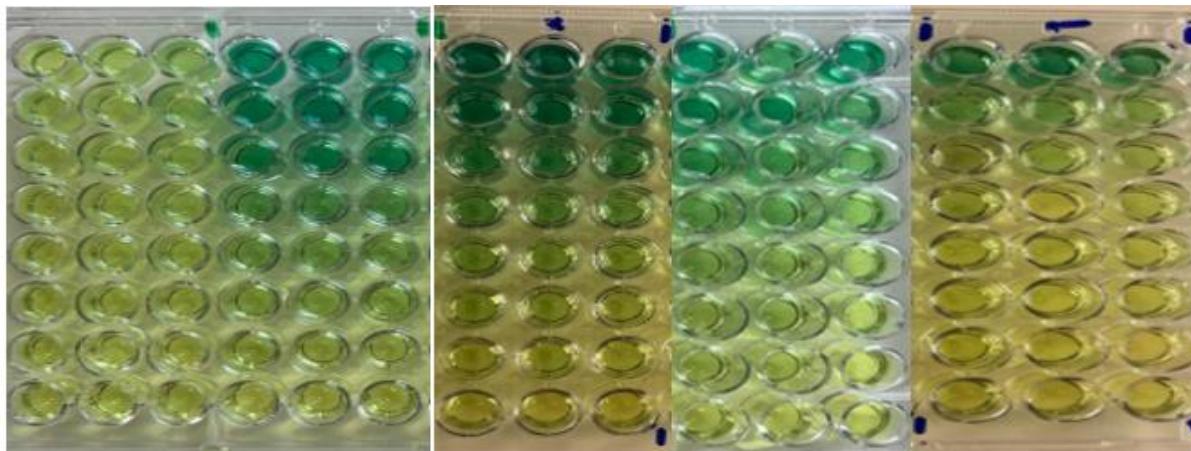
offrant ainsi une base de comparaison pour déterminer l'efficacité relative des différents extraits botaniques dans la neutralisation des radicaux libres et leur potentiel antioxydant. Ces comparaisons permettent de mieux comprendre les propriétés antioxydantes des extraits en question et d'établir des liens entre la composition chimique des extraits et leur capacité à réduire les espèces réactives de l'oxygène.

**Tableau 11 :** Absorbances du pouvoir réducteur par les extraits de la plante de la famille Linaceae.

Extraits	Pourcentage Inhibition (%) de FRAP							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	A <sub>0.5</sub> µg
Ext E	0.06±0.06	0.06±0.01	0.08±0.01	0.09±0.00	0.13±0.02	0.19±0.03	0.23±0.13	468.69 ± 148.26
Ext AE	0.06±0.00	0.07±0.00	0.10±0.01	0.14±0.02	0.25±0.01	0.28±0.03	0.33±0.06	278.69 ± 32.75
Ext D	0.12±0.01	0.17±0.01	0.22±0.01	0.33±0.01	0.46±0.03	0.77±0.04	0.99±0.12	55.03 ± 4.14
Ext B	0.06±0.00	0.07±0.01	0.09±0.00	0.11±0.01	0.14±0.02	0.13±0.02	0.25±0.04	473.61± 71.75
Ext PA	0.07±0.03	0.09±0.00	0.11±0.01	0.13±0.00	0.19±0.04	0.32±0.01	0.72±0.04	141.87± 6.4
Acide ascorbique	0.35± 0.05	0.460±0.03	0.84±0.12	0.93±0.3	1.18±0.34	1.37±0.2	1.44±0.21	6.77 ± 1.15
α -Tocopherol	0.11± 0.00	0.16± 0.00	0.21± 0.03	0.35± 0.03	0.73± 0.03	1.37± 0.08	1.81± 0.09	34.93 ± 2.38



**Figure 19 :** Histogramme des valeurs d' $A_{0.5}$  du test FRAP.



**Figure 20 :** Résultats du test FRAP sur microplaques.

Les résultats obtenus lors des tests de pouvoir réducteur ferrique (FRAP) révèlent que l'extrait D présente la meilleure capacité à réduire le fer ferrique parmi les extraits testés, avec une valeur d'absorbance de ( $A_{0.5} = 55.03 \pm 14.14 \mu\text{g/ml}$ ). Cette valeur est significativement plus faible que celle de l'acide ascorbique, qui agit comme standard avec une valeur d'absorbance ( $A_{0.5} = 6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/ml}$ ), et qui démontre une activité antioxydante bien plus forte. Toutefois, l'extrait D reste supérieur à l'extrait aqueux (Ext PA), l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext A), l'extrait d'éther de pétrole (Ext E), et l'extrait *n*-butanolique (Ext B), qui affichent des valeurs d'absorbance respectivement de ( $A_{0.5} = 141.87 \pm 6.4 \mu\text{g/ml}$ ) et des valeurs dépassant ( $A_{0.5} > 200 \mu\text{g/ml}$ ) pour certains extraits. Cette différence d'absorbance suggère que l'extrait D possède une activité réductrice plus marquée, bien que cette capacité reste modeste par rapport à celle de l'acide ascorbique.

En comparaison, l'extrait D présente une activité presque huit fois inférieure à celle de l'acide ascorbique, mais seulement environ une fois et demie moins élevée que celle du standard  $\alpha$ -tocophérol ( $A_{0.5} = 34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/ml}$ ), un autre antioxydant bien connu pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Ces résultats indiquent que l'extrait D possède une certaine efficacité dans la réduction du fer ferrique, mais cette activité reste loin de celle des standards utilisés, notamment l'acide ascorbique.

Les résultats des tests DPPH et ABTS, qui évaluent respectivement l'activité antioxydante par la capacité des extraits à piéger les radicaux libres DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>+</sup>, ont montré que l'extrait D, bien que présentant une activité plus faible que les standards, reste l'un des extraits les plus efficaces parmi ceux testés. L'extrait D a également montré une concentration relativement plus élevée en polyphénols et flavonoïdes, avec  $69.82 \pm 2.46 \text{ mg EAG/1g EXT}$  et  $69.82 \pm 2.46 \text{ mg EQUE/1g EXT}$  respectivement. Cette concentration élevée en composés bioactifs pourrait

expliquer, en partie, sa capacité à réduire le fer ferrique, bien que d'autres facteurs, tels que la structure chimique des composés, joue également un rôle clé dans cette activité.

Les autres extraits, tels que l'Ext PA et l'Ext E, avec des valeurs de ( $A_{0.5}$ ) plus élevées, ont montré des capacités antioxydantes moins marquées, ce qui est cohérent avec les résultats des tests DPPH et ABTS où ces extraits ont présenté une activité antioxydante modérée. De plus, ces extraits ont montré des concentrations beaucoup plus faibles en polyphénols et flavonoïdes (respectivement  $0.86 \pm 2.28$  mg EAG/1g EXT pour l'Ext PA et  $1.98 \pm 5.30$  mg EAG/1g EXT pour l'Ext E), ce qui pourrait expliquer leur faible activité réductrice dans le test FRAP.

Ces observations suggèrent que la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits est un facteur important contribuant à leur activité antioxydante. Cependant, d'autres composés donneurs d'électrons, comme les tanins ou les acides phénoliques, pourraient également être responsables de l'activité réductrice observée dans le test FRAP, en complément des polyphénols et flavonoïdes. En conclusion, bien que l'extrait D montre une activité réductrice intéressante, il est encore loin de l'efficacité des standards comme l'acide ascorbique et  $\alpha$ -tocophérol, et il semble que l'effet antioxydant soit lié à la synergie entre les différents composés présents dans les extraits testés.

#### 3.2.4. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ phenanthroline

Le test de la phénanthroline repose sur une méthode simple qui permet la formation d'un complexe appelé ferroïne, résultant de la réaction entre le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et la phénanthroline. Ce complexe, de couleur rouge-orange foncé, est obtenu à partir du fer sous sa forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en solution aqueuse. L'intensité de la couleur formée est directement liée à la quantité de fer ferreux présent dans l'échantillon. L'absorbance de ce complexe est mesurée à une longueur d'onde de 510 nm, permettant ainsi d'évaluer la concentration en fer ferreux dans l'échantillon.

- Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 12 et les figures 21 et 22, ont été comparés aux standards BHA et BHT, deux antioxydants de référence, afin d'évaluer l'efficacité relative des extraits testés en termes de capacité à réduire les ions ferriques.

**Tableau 12 :** Absorbances du Fe<sup>2+</sup> Phenanthroline par les extraits de la plante de la famille Linaceae.

Extraits	Absorbances de PHENANTHROLINE							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5µg	25µg	50µg	100 µg	200 µg	A <sub>0.5</sub> µg/ml
Ext E	0.27±0.01	0.28±0.01	0.28±0.03	0.31±0.03	0.31±0.03	0.37±0.04	0.58±0.03	162.02±15.38
Ext AE	0.29±0.01	0.33±0.02	0.37±0.05	0.57±0.04	0.79±0.03	1.22±0.12	2.10±0.09	22.26±3.84
Ext D	0.26±0.01	0.28±0.01	0.30±0.00	0.36±0.03	0.48±0.02	0.70±0.04	1.09±0.11	55.27±6.27
Ext B	0.32±0.02	0.33±0.04	0.37±0.01	0.48±0.03	0.63±0.01	0.88±0.05	1.59±0.03	29.80±1.61
Ext PA	0.24±0.02	0.25±0.00	0.30±0.06	0.30±0.05	0.33±0.01	0.38±0.02	0.55±0.02	170.82±9.32
	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	A <sub>0.5</sub> µg/ml
BHA	0.49± 0.01	0.59± 0.01	0.73± 0.02	0.93± 0.01	1.25± 0.04	2.10± 0.05	4.89± 0.06	0.93± 0.07
BHT	0.47± 0.01	0.47± 0.01	0.53± 0.03	1.23± 0.02	1.84± 0.01	3.48± 0.03	4.84± 0.01	2.24± 0.17

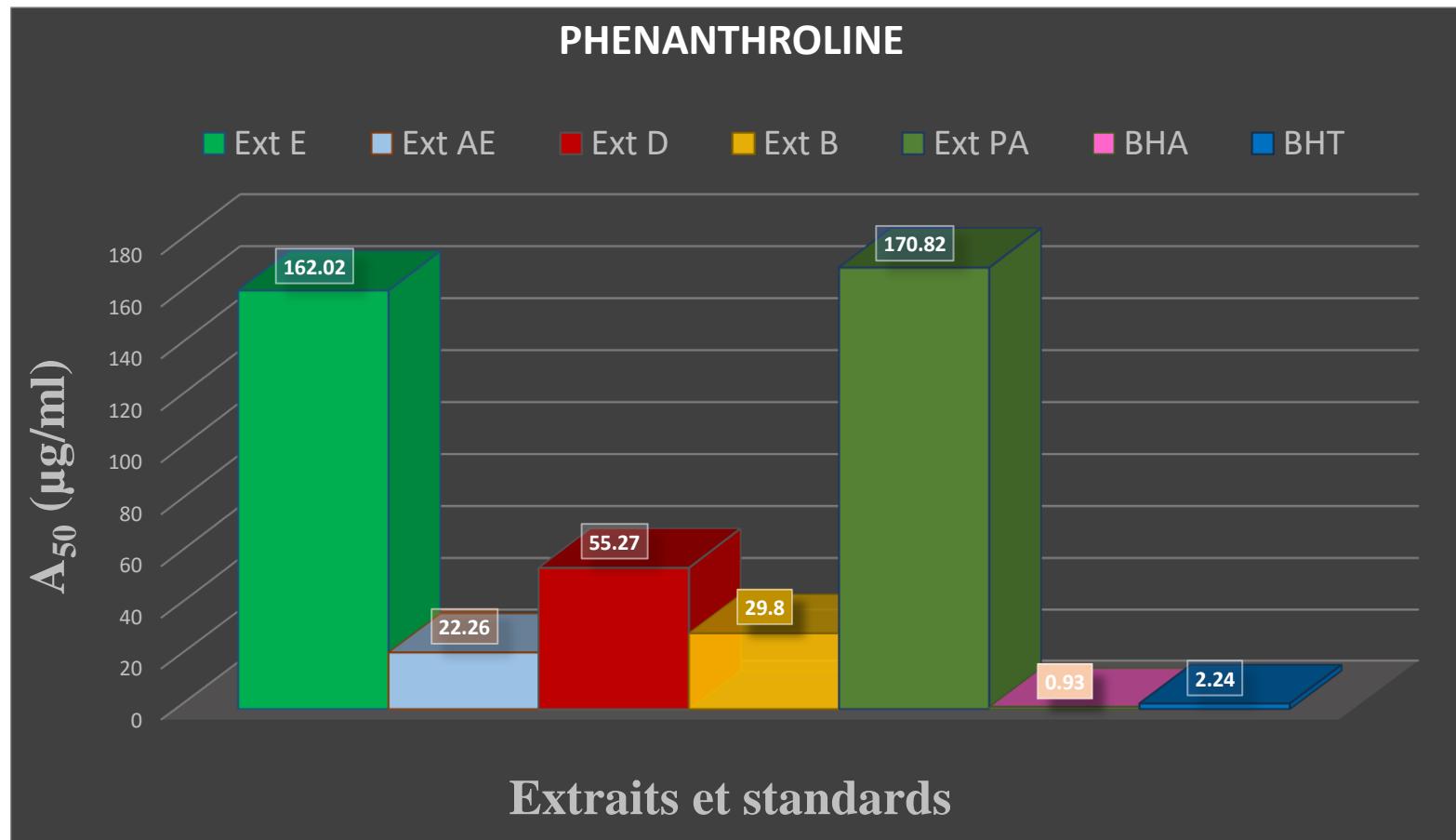
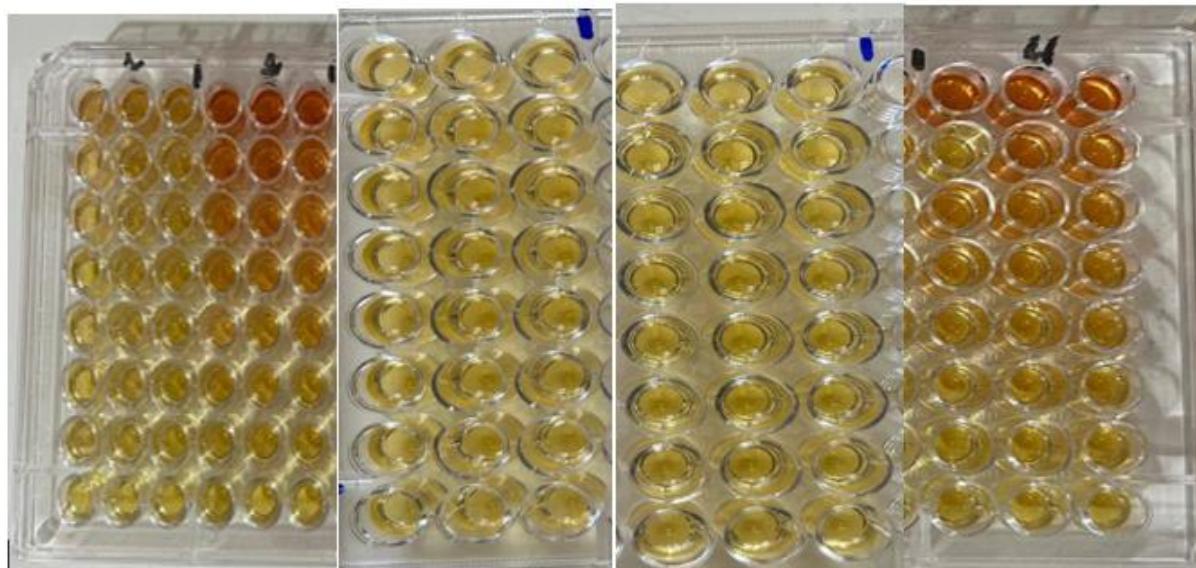


Figure 21 : Histogramme des valeurs d' $A_{0.5}$  du test de la phénanthroline.



**Figure 22 :** Résultats du test Phenanthroline sur microplaques.

Les résultats obtenus à partir des tests réalisés avec la phénanthroline montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE) présente la meilleure capacité à réduire les ions ferriques parmi tous les extraits testés, avec une valeur d'absorbance de ( $A_{0.5} = 22.26 \pm 3.84 \mu\text{g/ml}$ ). Cet extrait surpassé ainsi l'extrait *n*-butanolique (Ext B), l'extrait de dichlorométhane (Ext D), l'extrait d'éther de pétrole (Ext E) et l'extrait aqueux (Ext PA), qui affichent respectivement des valeurs d'absorbance de ( $A_{0.5} = 29.8 \pm 1.61 \mu\text{g/ml}$ ), ( $A_{0.5} = 55.27 \pm 6.27 \mu\text{g/ml}$ ), ( $A_{0.5} = 162.02 \pm 15.38 \mu\text{g/ml}$ ) et ( $A_{0.5} = 170.8 \pm 9.32 \mu\text{g/ml}$ ). Cette variation des valeurs d'absorbance indique une différence significative dans la capacité des extraits à réduire le fer ferrique en fer ferreux, ce qui témoigne de l'efficacité relative des extraits dans ce processus de réduction.

Cependant, l'extrait AE présente une activité antioxydante qui reste environ vingt-quatre fois inférieure à celle du standard BHA ( $A_{0.5} = 0.93 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ ), un antioxydant bien connu pour sa forte capacité à piéger les radicaux libres, et dix fois inférieure à celle du standard BHT ( $A_{0.5} = 2.24 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ ), un autre composé de référence. Cette différence de performance pourrait être expliquée par la structure chimique et la concentration en composés actifs de l'extrait AE, qui bien que relativement riche en polyphénols et flavonoïdes ( $93.16 \pm 6.59 \text{ mg EQUE/1g EXT}$ ), n'atteint pas l'efficacité des standards de synthèse.

Les résultats des tests DPPH, ABTS et FRAP effectués parallèlement sur les mêmes extraits confirment cette observation, montrant que l'extrait AE, bien qu'il présente une activité antioxydante significative, demeure bien moins puissant que les standards. Par exemple, dans le test DPPH, l'Ext AE a montré une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de  $38.93 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ , et dans le test ABTS, une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de  $29.82 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ . Bien que ces résultats soient encourageants, ils sont

inférieurs à ceux observés pour les standards comme le BHA et le BHT, dont les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont bien plus faibles.

En parallèle, l'extrait *n*-butanolique (Ext B), qui présente une concentration relativement plus élevée en flavonoïdes ( $288.19 \pm 6.88$  mg EQUE/1g EXT), affiche également une capacité antioxydante notable, mais demeure inférieur à l'extrait AE dans les tests de réduction du fer ferrique, avec une valeur d'absorbance plus élevée ( $A_{0.5} = 29.8 \pm 1.61$  µg/ml). Cette différence peut être attribuée à l'impact de la polarité des solvants d'extraction sur l'efficacité des extraits. En effet, bien que l'Ext B montre une concentration plus élevée en flavonoïdes, ces derniers semblent moins efficaces que ceux présents dans l'Ext AE pour réduire les ions ferriques.

Les extraits d'éther de pétrole et aqueux, qui présentent des concentrations bien plus faibles en flavonoïdes et polyphénols (respectivement  $1.98 \pm 5.30$  mg EAG/1g EXT et  $0.86 \pm 2.28$  mg EAG/1g EXT), ont montré les plus faibles activités antioxydantes, avec des valeurs d'absorbance beaucoup plus élevées dans le test de la phénanthroline ( $A_{0.5} > 200$  µg/ml), ce qui confirme que des concentrations plus faibles en ces composés bioactifs sont associées à une moins bonne capacité de réduction du fer ferrique.

En conclusion, bien que l'extrait AE présente une activité antioxydante intéressante, il reste inférieur aux standards BHA et BHT en termes de pouvoir réducteur ferrique. Cependant, il demeure plus efficace que plusieurs autres extraits, et cette différence d'efficacité peut être expliquée en grande partie par la concentration en polyphénols et flavonoïdes présents dans les extraits, ainsi que par les interactions complexes entre ces composés et les radicaux libres. Ces résultats soulignent l'importance de la composition chimique des extraits dans leur capacité à réduire le fer ferrique et à interagir avec les espèces réactives de l'oxygène.

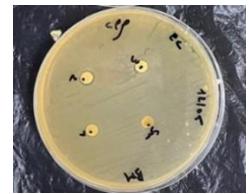
### **3.3. Activité antibactérienne**

La sélection des bactéries s'est concentrée sur deux souches courantes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes, à savoir les bactéries Gram positif et Gram négatif. L'efficacité des produits évalués et leur mode de pénétration dans la bactérie varient. Les souches bactériennes utilisées sont :

- Bactérie Gram négative (*Escherichia coli*).
- Bactérie Gram positive (*Staphylococcus aureus*).

**Tableau 13** : Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extrait sur la souche Escherichia coli.

	souche	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition Dmso(mm)	Zone d'inhibition obtenu
Extrait		100(solution Mére)	8		
		50	7	0	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<i>Escherichia coli</i>	25	7		
		12.5	7		
	Témoin de				
	<i>Escherichia coli</i>	/	16	0	




## CHAPITRE 03

## Résultats et discussion

**Tableau 14 :** Résultat de l'activité antibactérienne de l'extrait sur la souche *Staphylococcus aureus*.

Extrait	souche	Concentration (mg/ml)	Zone D'inhibition (mm)	Zone D'inhibition Dmso(mm)	Zone d'inhibition obtenu
		100(solution	9		
<i>Staphylococcus</i>	Mère)				
<i>aureus</i>	50		8	0	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25		8		
	12.5		7		
Témoin de					
<i>Staphylococcus</i>					
<i>Aureu</i>	/		19	0	




Les données présentées dans les tableaux indiquent une variation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la souche bactérienne testée et de la concentration de l'extrait.

Les diamètres d'inhibition observés à la suite de l'application de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sur la souche *E. Coli* sont significativement inférieurs à celui du témoin positif, qui est de 16 mm. Les trois concentrations, à savoir 50 mg/ml, 25 mg/ml et 12.5 mg/ml, présentent une activité faible mais constante avec des zones d'inhibition de 7 mm. Une légère augmentation est observée aux concentrations de 100 mg/ml (solution mère), atteignant un diamètre de 8 mm. De plus, les diamètres d'inhibition observés avec l'extrait de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contre la souche *S. aureus* sont également plus petits que celui du témoin positif de 19 mm. Cependant, une variation modérée des diamètres comprise entre 7 et 9 mm indique une sensibilité légèrement plus élevée de *S. aureus* à l'extrait par rapport à *E. coli*.

Il convient de noter que les extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle, *n*-butanolique et la phase aqueuse n'ont montré aucune activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, à l'exception de l'extrait dichlorométhane qui a démontré une activité antibactérienne faible.

### 3.4. Activité antifongique

*Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*, un champignon phytopathogène la tomate en provoquant un flétrissement des feuilles.

L'évaluation de l'activité antifongique a été réalisée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance en millimètres, et les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition.

$$P.I.c (\%) = (d_t - d_T/d_t) \times 100$$

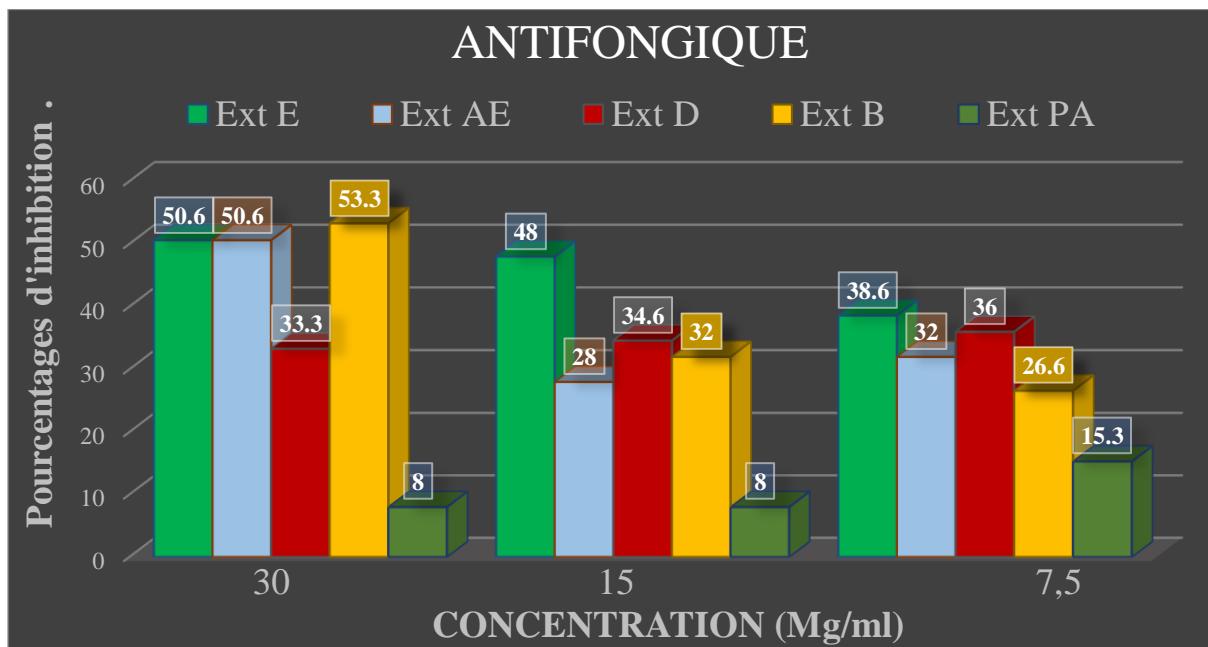
- P.I.c : pourcentage d'inhibition de la croissance mycéienne (%)
- d<sub>t</sub> : la croissance diamétrale du témoin (cm).
- d<sub>T</sub> : la croissance diamétrale du champignon en présence d'une concentration d'extrait (cm).

Les extraits testés sur la souche FOL ont révélé une activité inhibitrice significative, laquelle varie en fonction de la concentration de l'extrait utilisé.

Les taux d'inhibition calculés par rapport au témoin sont présentés dans le tableau 15 et les figures 23 et 24 présentent également les images des zones d'inhibition des 5 extraits à différentes concentrations.

**Tableau 15 :** Pourcentages d'inhibition de l'activité antifongique calculés.

Souche testée	Répétition	PI (%)				
		Ether de pétrole	Acéate d'éthyle	Dichlorométhane	n-Butanolique	Phase aqueuse
<i>Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici</i>	30mg/mL	50.6	50.6	33.3	53.3	8
	15mg/mL	48	28	34.6	32	8
	7.5mg/mL	38.6	32	36	26.6	15.3



**Figure 23 :** Histogramme des Pourcentages d'inhibition calculés de l'activité antifongique.

Les divers résultats obtenus suggèrent que l'extrait *n*-butanolique se révèle être le plus efficace contre le champignon, en raison de son effet antifongique le plus significatif. À une concentration de 30 mg/ml, il démontre la plus grande efficacité inhibitrice sur la souche fongique, entraînant une réduction de 53.3 % du diamètre du mycélium. En comparaison, l'éther de pétrole et l'acétate d'éthyle extrait ont démontré des activités similaires, avec des taux d'inhibition de 50.6 % et 50.6 %, respectivement, tandis que l'extrait de dichlorométhane s'est révélé avoir une activité plus faible (36%). Par contre, la Phase aqueuse n'a pas montré d'activité envers ce champignon.

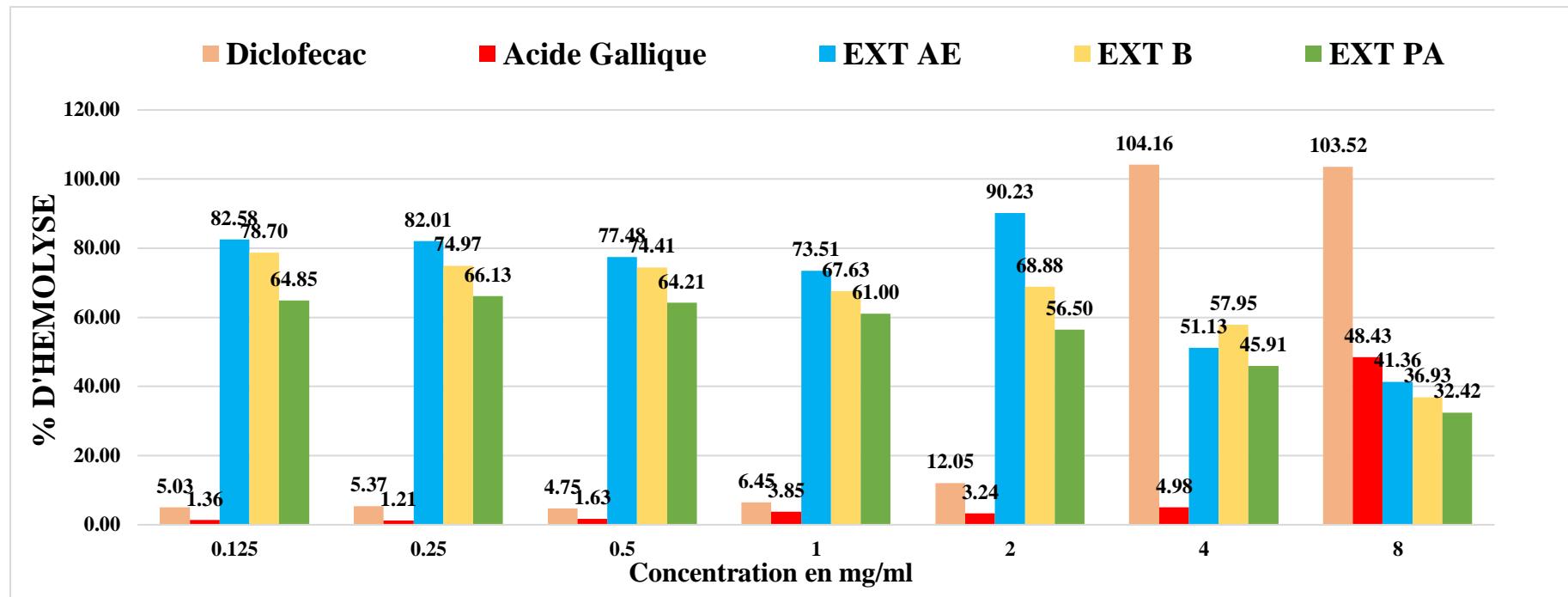


**Figure 24 :** Résultat de l'activité antifongique des extraits : Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, Dichlorométhane, *n*-Butanolique et la phase aqueuse.

### 3.5. Activité Anti-inflammatoire *in vitro*

#### 3.5.1. Test de l'innocuité des extraits vis-à-vis des globules rouges

Les pourcentages d'hémolyse résultant de l'incubation des érythrocytes ont été déterminés en présence des extraits Ext E, Ext AE, Ext D, Ext B, Ext PA, ainsi que des témoins positif (globules rouges avec de l'eau distillée) et négatif (extrait avec tampon phosphate salin).



**Figure 25 :** Histogramme montrant les pourcentages d'hémolyse en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus dans ce test montrent que l'activité hémolytique, c'est-à-dire la capacité des extraits à détruire ou à endommager les globules rouges, est une mesure importante de la cytotoxicité de ces extraits. En effet, une activité hémolytique élevée indique une toxicité potentielle des extraits vis-à-vis des cellules sanguines. L'extrait de la phase aqueuse (Ext PA) présente une activité hémolytique notable, avec des taux de destruction des globules rouges variant entre  $64.85 \% \pm 6.81$  et  $56.50 \% \pm 2.72$  pour des concentrations comprises entre 0.125 et 2 mg/ml. À des concentrations plus élevées (4 à 8 mg/ml), cette activité devient modérée, avec des valeurs allant de  $45.91 \% \pm 1.82$  à  $32.42 \% \pm 3.18$ . Ces résultats suggèrent que l'Ext PA exerce une toxicité cellulaire importante, en particulier à faible concentration, ce qui peut être préoccupant pour son utilisation dans des applications thérapeutiques ou industrielles.

De même, l'extrait *n*-butanolique (Ext B) montre une activité hémolytique de  $78.70 \% \pm 0.20$  à  $36.93 \% \pm 1.76$ , tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle (Ext AE) présente une activité hémolytique encore plus marquée de  $82.58 \% \pm 1.00$  à  $41.36 \% \pm 6.01$ . Ces résultats montrent que ces extraits exercent une action cytotoxique plus forte sur les globules rouges par rapport à l'Ext PA, indiquant que les concentrations élevées de certains composés bioactifs dans ces extraits peuvent être responsables de cette toxicité.

En comparaison, les standards comme le diclofénac montrent une faible activité hémolytique de  $5.03 \% \pm 0.87$  à une concentration de 0.125 mg/ml, ce qui suggère qu'à faible concentration, cet anti-inflammatoire est relativement sûr vis-à-vis des globules rouges. Cependant, à des concentrations plus élevées (4 mg/ml), le diclofénac présente un taux d'hémolyse très élevé, atteignant  $104.16 \% \pm 0.76$ , ce qui indique une toxicité accrue à des doses plus fortes. Cette élévation du taux d'hémolyse à haute concentration montre que même les substances habituellement considérées comme relativement sûres peuvent devenir cytotoxiques lorsque la concentration augmente.

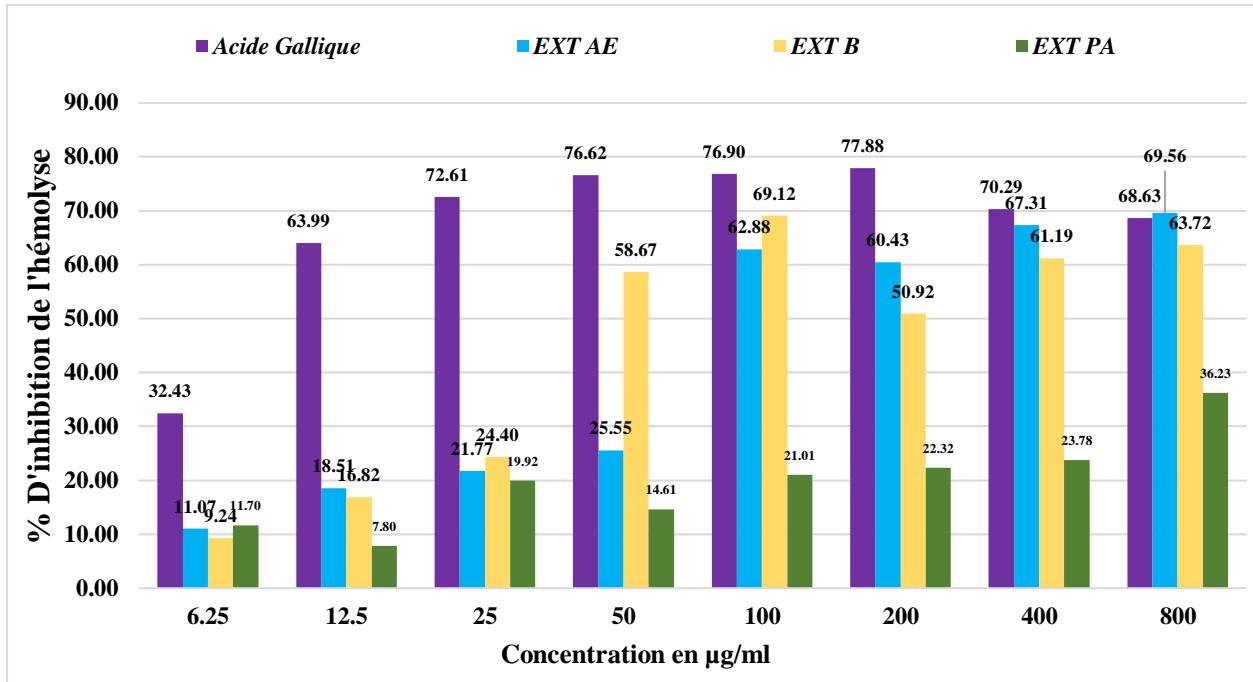
Le standard acide gallique, comme les autres extraits, montre initialement une faible activité hémolytique ( $1.36 \% \pm 0.71$ ) à 0.125 mg/ml, mais son taux d'hémolyse augmente à  $48.43 \% \pm 0.92$  à des concentrations plus élevées, ce qui indique que l'acide gallique, bien qu'il présente une faible toxicité pour les globules rouges à faible concentration, peut aussi devenir toxique à des doses plus élevées.

L'activité hémolytique, indicatrice de la cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges, montre que certains extraits, comme l'Ext PA, l'Ext B et l'Ext AE, présentent une toxicité significative à faible concentration. En revanche, des standards comme le diclofénac et l'acide gallique, bien que sûrs à faible concentration, montrent une augmentation importante de la

cytotoxicité à des doses plus élevées. Ces résultats mettent en évidence la nécessité de considérer la concentration et la composition des extraits lors de leur utilisation, afin de prévenir toute toxicité cellulaire indésirable et garantir leur sécurité pour les globules rouges.

### 3.5.2. Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges contre stress osmotique associé à un stress thermique

La méthode décrite par Ganesh et al. (2013) a été utilisée pour évaluer l'impact de différents extraits de la plante de la famille Linaceae sur la stabilisation des erythrocytes après l'induction d'une hémolyse. Cette hémolyse a été provoquée par l'exposition des globules rouges à une solution hypotonique associée à des températures élevées, ce qui a pour effet de perturber l'intégrité des membranes des erythrocytes. Cette approche permet de simuler des conditions qui favorisent la rupture des globules rouges, entraînant la libération de l'hémoglobine. Les extraits testés comprennent l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le *n*-butanol et la phase aqueuse. L'objectif était d'observer l'effet protecteur de ces extraits contre l'hémolyse induite, en mesurant leur capacité à stabiliser les membranes des erythrocytes et à prévenir leur rupture sous l'effet de la solution hypotonique et de la chaleur. Les résultats obtenus ont montré dans quelle mesure chaque extrait était capable de réduire l'hémolyse, offrant ainsi des indications sur leur potentiel à protéger les globules rouges contre des conditions de stress osmotique et thermique. Ces résultats fournissent des informations importantes sur les propriétés stabilisantes de ces extraits, ce qui pourrait avoir des applications dans le développement de traitements pour protéger les cellules sanguines contre des agressions similaires.



**Figure 26 :** Histogramme montrant les pourcentages de protection des hématies vis-à stress osmotique et thermique en fonction des concentrations.

Les résultats obtenus mettent en évidence un effet protecteur croissant de l'acide gallique en fonction des concentrations. Ce dernier atteint un effet maximal de  $77.88 \pm 1.22\%$  à une concentration de  $200 \mu\text{g/ml}$ . Cependant, cet effet protecteur commence à diminuer légèrement à partir de la concentration de  $400 \mu\text{g/ml}$ . Ainsi, l'acide gallique exerce une action significative contre l'hémolyse à faible concentration, mais cette protection devient moins marquée à des concentrations plus élevées.

En revanche, les extraits d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol et la phase aqueuse des plantes étudiées ont montré une protection des globules rouges contre l'hémolyse, mais principalement à des concentrations plus élevées. Plus précisément, l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté une activité maximale de  $69.56 \pm 1.66\%$  à une concentration de  $800 \mu\text{g/ml}$ , tandis que l'extrait *n*-butanolique a montré une activité maximale de  $69.12 \pm 1.95\%$  à une concentration de  $100 \mu\text{g/ml}$ . L'extrait de la phase aqueuse a présenté une activité maximale de  $36.23 \pm 1.6\%$  à une concentration de  $800 \mu\text{g/ml}$ .

Il a été observé que, à des concentrations variant de  $6.25$  à  $400 \mu\text{g/ml}$ , l'acide gallique exerçait une inhibition de l'hémolyse nettement plus élevée que celle des trois extraits. Toutefois, à une concentration de  $800 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une efficacité supérieure à celle de l'acide gallique, avec une activité de  $69.56 \% \pm 1.66$ . Cela suggère que, bien que l'acide gallique soit plus efficace à faible concentration, les extraits d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol et

la phase aqueuse peuvent offrir une protection comparable, voire supérieure à l'acide gallique, à des concentrations plus élevées.

En conclusion, les résultats montrent que les extraits testés sont efficaces pour protéger les membranes des globules rouges contre l'hémolyse, avec une légère préférence pour l'acétate d'éthyle à haute concentration. L'acide gallique, bien qu'efficace à faible concentration, semble perdre de son efficacité à des concentrations plus élevées, ce qui met en évidence l'importance de la concentration des extraits dans leur capacité à protéger les globules rouges.

### 3.6. Récapitulatif des résultats de tous les tests

#### 3.6.1. Rendement d'extrait brut et dosage des polyphénols et flavonoïdes

- Les extraits ont été évalués pour leur rendement, avec une attention particulière portée à la concentration en polyphénols et flavonoïdes.

L'extrait *n*-butanol et l'extrait d'acétate d'éthyle ont montré des concentrations relativement élevées en flavonoïdes, tandis que l'extrait de dichlorométhane a été plus riche en polyphénols, ce qui pourrait expliquer leur activité antioxydante ainsi que leur effet sur l'inhibition de l' $\alpha$ -amylase.

#### 3.6.2. Activité antioxydante (DPPH, ABTS, FRAP, et phénanthroline)

Les tests DPPH, ABTS, FRAP et la méthode à la phénanthroline ont été réalisés pour évaluer les capacités antioxydantes des extraits. Les résultats ont montré que l'acétate d'éthyle (Ext AE) et l'extrait *n*-butanolique (Ext B) présentaient les meilleures capacités antioxydantes lors des tests de piégeage des radicaux libres, notamment pour les tests DPPH et ABTS. En revanche, pour les tests mesurant le pouvoir réducteur, tels que le FRAP et la méthode à la phénanthroline, l'extrait de dichlorométhane (Ext D) et l'acétate d'éthyle (Ext AE) ont montré les meilleurs pouvoirs réducteurs.

#### 3.6.3. Activité antimicrobienne :

- L'extrait de dichlorométhane a montré une activité antimicrobienne modérée contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, tandis que les autres extraits n'ont montré aucune activité antibactérienne contre ces souches.
- L'activité antimicrobienne était particulièrement significative contre le champignon *Fusarium oxysporum*, avec l'extrait *n*-butanolique présentant le

taux d'inhibition le plus élevé (53.3 % à 30 mg/ml), suivi de près par l'éther de pétrole et l'acéate d'éthyle (50.6 %).

#### 3.6.4. Activité antifongique :

- L'extrait *n*-butanolique a montré l'activité antifongique la plus significative contre *Fusarium oxysporum*, avec un taux d'inhibition de 53.3 % à une concentration de 30 mg/ml. L'acéate d'éthyle et l'éther de pétrole ont présenté des résultats similaires (50.6 %), tandis que l'extrait de dichlorométhane a montré une activité plus faible (36 %).

#### 3.6.5. Activité anti-inflammatoire (antihémolytique) :

- L'acide gallique a montré une activité anti-inflammatoire significative, avec un effet protecteur important contre l'hémolyse des globules rouges, en particulier à des concentrations faibles. L'acéate d'éthyle, bien que moins efficace que l'acide gallique à faible concentration, a présenté une activité comparable à des concentrations élevées.

# **Conclusion**

Ce mémoire a exploré les propriétés biologiques de plusieurs extraits de plantes, en mettant l'accent sur leur potentiel antioxydant, antimicrobien, antifongique et anti-inflammatoire (antihémolytique). Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence des résultats prometteurs, bien que les extraits étudiés présentent une efficacité variable selon les tests et les concentrations.

L'analyse des rendements des extraits bruts et des dosages des polyphénols et flavonoïdes a montré que certains extraits, notamment l'acétate d'éthyle et l'extrait *n*-butanolique, sont riches en composés bioactifs, ce qui explique en partie leur activité antioxydante. Cependant, ces extraits sont moins efficaces que les standards de référence comme l'acide ascorbique et le BHT.

Les tests d'activité antimicrobienne ont montré que l'extrait de dichlorométhane avait une faible activité contre *E. coli* et *S. aureus*, mais il a démontré une activité antifongique intéressante, en particulier contre *Fusarium oxysporum*, où l'extrait *n*-butanolique a montré une inhibition significative. L'activité anti-inflammatoire a été confirmée par l'effet protecteur de l'acide gallique contre l'hémolyse des globules rouges, bien que l'acétate d'éthyle ait montré une efficacité supérieure à des concentrations élevées.

En conclusion, bien que certains extraits aient montré une activité biologique prometteuse, ces résultats soulignent l'importance de la concentration et de la composition chimique des extraits dans la détermination de leur efficacité. Des études complémentaires, y compris des tests *in vivo* et des analyses plus approfondies de la composition chimique, sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action des extraits et évaluer leur potentiel pour des applications thérapeutiques futures. Ce travail ouvre la voie à l'utilisation des extraits végétaux comme sources potentielles de nouveaux agents bioactifs, notamment dans le cadre du développement de traitements naturels pour des maladies inflammatoires, microbiennes et fongiques.

# **Références bibliographiques**

1. Muanda Nsemi F. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques [thèse]. Metz: Université Paul Verlaine - Metz; 2010.
2. Kouider H, Benaissa M, Mohammed M, Abdelkader O, Abdelkarim R. IMPORTANCE DES PLANTES MEDICINALES POUR LA POPULATION RURALE DU PARC NATIONAL DE DJEBEL AISSA (SUD OUEST ALGERIEN). Lejeunia. 22 déc 2019;199:1-12.
3. Desmier T. Les antioxydants de nos jours : définition et applications [thèse]. Limoges: Université de Limoges; 2016.
4. Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. J Taibah Univ Sci. 1 oct 2015;9(4):449-54.
5. Law BMH, Waye MMY, So WKW, Chair SY. Hypotheses on the Potential of Rice Bran Intake to Prevent Gastrointestinal Cancer through the Modulation of Oxidative Stress. Int J Mol Sci. 24 juin 2017;18(7):1352.
6. Aziz MA, Majeed GH, Diab KS, Al-Tamimi RJ. The association of oxidant–antioxidant status in patients with chronic renal failure. Ren Fail. 2 janv 2016;38(1):20-6.
7. Delattre, Jacques, Jean-Louis Beaudeux, et Dominique Bonnefont-Rousselot. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Paris Londres New-York: Tec & Doc Éditions médicales internationales, 2005. Print.
8. Guillouty A, El Bibili F, Université Toulouse 3 Paul Sabatier (1969-....)., Université Paul Sabatier (Toulouse). Faculté des sciences pharmaceutiques. Plantes médicinales et antioxydants. 2016.
9. Djouadi A, Lanez T. Evaluation de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de deux variétés de *Solanum melongena* L. de la région d'El-Oued par voltampérométrie cyclique et ondes carrées.
10. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. Rev Rhum. 1 juill 2007;74(7):636-43.
11. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev. avr 1998;78(2):547-81.
12. Baudin B. Stress oxydant et protections antioxydantes. Rev Francoph Lab. 1 mai 2020;2020(522):22-30.
13. Abuajah CI, Ogbonna AC, Osuji CM. Functional components and medicinal properties of food: a review. J Food Sci Technol. mai 2015;52(5):2522-9.
14. Zehiroglu C, Ozturk Sarikaya SB. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. J Food Sci Technol. nov 2019;56(11):4757-74.

15. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci.* 2018;12(3):88-93.
16. Valko M, Rhodes C, Izakovic M, Mazur M. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur MFree radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40. *Chem Biol Interact.* avr 2006;160:1-40.
17. Boukher I. Etude et valorisation du potentiel antioxydant, de l'effet anti-inflammatoire et de l'index glycémique de farines issues de légumes amylacés : Manihot esculenta, Ipomoea batatas, Canna edulis et de leurs sous-produits [thèse]. Montpellier: Université de Montpellier; 2022. French.
18. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* 2007;62(10):628-38.
19. Delattre J, Beaudeux JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques). Paris: Editions Tec & Doc; 2005.
20. Rézaire A. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa) [thèse]. La Pointe à Pitre: Université des Antilles et de la Guyane; 2012.
21. Retsky KL, Chen K, Zeind J, Frei B. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic Biol Med.* 1 janv 1999;26(1):90-8.
22. Kaiser S, Mascio PD, Murphy ME, Sies H. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch Biochem Biophys.* 1990;277(1):101-8.
23. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 10 mars 2006;160(1):1-40.
24. Bettger WJ. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidation. *Can J Physiol Pharmacol.* sept 1993;71(9):721-4.
25. Zbadi R, Mohti H, Moussaoui F. Stress oxydatif: évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Med Ther.* 1 mars 2018;24:134-41.
26. Teraoka M, Hato N, Inufusa H, You F. Role of Oxidative Stress in Sensorineural Hearing Loss. *Int J Mol Sci.* janv 2024;25(8):4146.
27. Roux C, Bioret F, Thébaud G. Prodrome des végétations de France 2: Tome 1 - Synthèse des classes déclinées 2009-2024. BIOM - Rev Sci Pour Biodiversité Massif Cent. 30 avr 2024;5(1):1-324.
28. NICHOLLS MS. A systematic study of the Linum tenuifolium group (Linaceae). *Bot J Linn Soc.* mai 2008;91(4):473-90.
29. Yissibi EP, Tajeukem VC, Kpoumie HM, Mfifen AM, Maffo NM, Mfifen AM, et al. Connaissance, identification et étude phytochimique de deux plantes médicinales appelées «ginseng» à Yaoundé (Cameroun). *Int J Biol Chem Sci.* 24 août 2023;17(3):1147-62.

30. Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes M. Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Phytotherapie. 6 janv 2008;6:160-4.
31. Srinivas C, Devi DN, Murthy KN, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, et al. Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity— A review. Saudi J Biol Sci. 4 juin 2019;26(7):1315.
32. Rahman MZ, Ahmad K, Bashir Kutawa A, Siddiqui Y, Saad N, Geok Hun T, Hata EM, Hossain MI. Biology, diversity, detection and management of Fusarium oxysporum f. sp. niveum causing vascular wilt disease of watermelon (*Citrullus lanatus*): a review. Agronomy. 2021;11(7):1310.
33. Hahn MW, Lünsdorf H, Wu Q, Schauer M, Höfle MG, Boenigk J, et al. Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. Appl Environ Microbiol. mars 2003;69(3):1442-51.
34. Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M. Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien. Doin; 1995.
35. Avril JL, Dabernat H, Monteil H, Denis F. Bactériologie clinique. Ellipses; 2000. 602 p.
36. Ferron A. Bactériologie : à l'usage des étudiants en médecine. 8 éd. Lille: Crouan et Roques; 1975. 403 p.
37. Pibiri MC, Roulet CA, Seignez C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants.
38. Meizlish ML, Franklin RA, Zhou X, Medzhitov R. Tissue Homeostasis and Inflammation. Annu Rev Immunol. 26 avr 2021;39(Volume 39, 2021):557-81.
39. Hawiger J, Zienkiewicz J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. Scand J Immunol. déc 2019;90(6):e12812.
40. Nagra D, Bechman K, Adas M, Yang Z, Alveyn E, Subesinghe S, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Anti-Rheumatic Drugs and Pneumococcal Vaccine Immunogenicity in Inflammatory Arthritis. Vaccines. nov 2023;11(11):1680.
41. Xu X, Guo W, Zhao L, Sun Y, Xu D, Yang J, et al. Exploring the in vitro anti-inflammatory activity of gross saponins of *Tribulus terrestris* L. fruit by using liquid chromatography-mass spectrometry-based cell metabolomics approach. J Sep Sci. 2023;46(24):2300531.
42. Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F, Ksouri R, Azzi R, Boucherit Z, et al. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. Ind Crops Prod. févr 2015;64:182-7.
43. Tigrine N. Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* [mémoire]. Bejaïa: Université Abderrahmane Mira; 2016.

44. Lagnika L. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises [thèse]. Strasbourg: Université Louis Pasteur; 2005.
45. Ydjedd S, Bouriche S, López-Nicolás R, Sanchez T, Frontela C, Ros G, et al. Effect of in Vitro Gastrointestinal Digestion on Encapsulated and Nonencapsulated Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Pulp Extracts and Their Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem.* janv 2017;65.
46. Kotha RR, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative Stress and Antioxidants-A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxid Basel Switz.* 1 déc 2022;11(12):2388.
47. Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J Agric Food Chem.* 13 juill 2011;59(13):6837-46.
48. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc.* avr 2013;21(2):143-52.
49. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst.* janv 2002;127(1):183-98.
50. Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich K, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* janv 2013;85.
51. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
52. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Sci Technol.* 1 sept 1997;30(6):609-15.
53. Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Rupérez P, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J Agric Food Chem.* avr 1999;47(4):1603-6.
54. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of « antioxidant power »: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 15 juill 1996;239(1):70-6.
55. Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* févr 1999;47(2):633-6.
56. Maisuthisakul P, Pasuk S, Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Compos Anal.* 1 mai 2008;21(3):229-40.
57. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004;26(2).
58. Gülcin I, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein H. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem.* janv 2010;3:43-53.

59. Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* [Internet]. 2020;9(8). Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/8/709>
60. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. avr 1958;181(4617):1199-200.
61. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. mai 1999;26(9-10):1231-7.
62. el Ferchichi H, Ghnimi W, Khouja ML, Dicko A. Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: Ricinus communis et Jatropha curcas. Evaluation de leur propriété anti- oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acetylcholinestérase. [PhD Thesis]. 2015.
63. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2013;21(2):143-52.
64. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*. 1996;384(3):240-2.
65. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. mai 1999;26(9-10):1231-7.
66. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*. sept 2003;133(9):2812-9.
67. Techer S. Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya [thèse]. La Réunion: Université de la Réunion; 2013.
68. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr Diet*. 1986;44(6):307-15.
69. Mukhopadhyay D, Dasgupta P, Roy DS, Palchoudhuri S, Chatterjee I, Ali S, et al. A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1,10-Phenanthroline. *Free Radic Antioxid*. 2016;6(1):124-32.
70. Su D, Cheng Y, Liu M, Liu D, Cui H, Zhang B, et al. Comparision of Piceid and Resveratrol in Antoxidation and Antiproliferation Activities In Vitro. *PLOS ONE*. 16 janv 2013;8(1):e54505.
71. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007;12(7):1496-547.

72. Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szłyk E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 15 août 2008;76(4):899-905.
73. Evaluation de l'activité antibactérienne de deux extraits de la plante *Centaurea dimorpha* [Internet]. Constantine: Université des Frères Mentouri; 2022.
74. Biokar Diagnostics. Guide d'utilisation des milieux: préparation, utilisation et stockage. Beauvais: Biokar Diagnostics; 2015. p. 1-24.
75. Meddour A, Yahia M, Benkiki N, Ammar A. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa*. *Leban Sci J*. janv 2013;14:49-60.
76. Nassar MSM, Hazzah WA, Bakr WMK. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *J Egypt Public Health Assoc*. 2019;94(1):4.
77. Ai L, Fu S, Li Y, Zuo M, Huang W, Huang J, et al. Natural products-based: Synthesis and antifungal activity evaluation of novel L-pyroglutamic acid analogues. *Front Plant Sci*. 2022;13:1102411.
78. Tan J, Yang J, Aobulikasimu N, Zhang C, Cao B, Lv H, Jiang M, Han L, Huang X. Senkyunolide B exhibits broad-spectrum antifungal activity against plant and human pathogenic fungi via inhibiting spore germination and destroying the mature biofilm. *Pest Manag Sci*. 2023;79(12):4952-63.
79. Mascarin GM, Marinho-Prado JS, Assalin MR, Martins LG, Braga ES, Tasic L, Dita M, Lopes RB. Natural occurrence of *Beauveria caledonica*, pathogenicity to *Cosmopolites sordidus* and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Pest Manag Sci*. 2022;78(11):4458-70.
80. Khedimallah N, Filali IN. Etude phytochimique et activités biologiques des deux espèces *Ocimum basilicum* L et *Lavandula angustifolia* Miller [Internet]. Constantine: Université des Frères Mentouri.
81. Boughendjioua H. Activité antifongique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Citrus reticulata*. *Rev Nat Technol*. 30 janv 2019;11(1):54-7.
82. Abe H, Katada K, Orita M, Nishikibe M. Effects of calcium antagonists on the erythrocyte membrane. *J Pharm Pharmacol*. janv 1991;43(1):22-6.
83. Ganesh SK, Arnett DK, Assimes TL, Basson CT, Chakrabarti A, Ellinor PT, et al. Genetics and genomics for the prevention and treatment of cardiovascular disease: update: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 24 déc 2013;128(25):2813-51.

## Résumé

Cette étude se focalise sur l'analyse des activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires d'une plante de la famille **Linaceae** répandue en Algérie. Ce genre est connu pour sa richesse en métabolites secondaires, en particulier les polyphénols et les flavonoïdes.

L'activité biologique des extraits a été évaluée *in vitro* à l'aide de quatre techniques pour mesurer l'activité antioxydante : DPPH, ABTS, FRAP et Phénanthroline, ainsi que la quantification des polyphénols et flavonoïdes. L'acétate d'éthyle (Ext AE) et l'extrait *n*-butanolique (Ext B) ont montré les meilleures capacités antioxydantes lors des tests DPPH et ABTS, avec des IC<sub>50</sub> de  $38.93 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$  pour Ext AE (DPPH) et  $28.93 \pm 0.81 \mu\text{g/ml}$  pour Ext B (ABTS). En revanche, pour les tests mesurant le pouvoir réducteur (FRAP et Phénanthroline), l'Ext D et l'Ext AE ont montré les meilleurs résultats, avec des A<sub>0.5</sub> de  $55.03 \pm 4.14 \mu\text{g/ml}$  pour Ext D (FRAP) et  $22.26 \pm 3.84 \mu\text{g/ml}$  pour Ext AE (Phénanthroline).

Les concentrations mesurées pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes à l'aide des extraits de dichlorométhane et de *n*-butanolique étaient de  $281.75 \pm 18.56 \text{ mg EAG/g}$  et  $288.19 \pm 6.88 \text{ mg EQUE/1g EXT}$ , respectivement.

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits a établi une forte efficacité contre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, notamment l'extrait *n*-butanolique étant le plus actif, avec un taux d'inhibition de 53.3 % à une concentration de 30 mg/mL. Il convient de noter que les extraits aqueux du genre Linaceae n'ont montré aucune activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, à l'exception de l'extrait dichlorométhane qui a démontré une activité antibactérienne faible.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* à travers le test de protection de la membrane cytoplasmique des globules rouges face au stress osmotique et thermique, en utilisant du sang de rats, révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle démontre une activité significative, avec une concentration de  $69.56 \% \pm 1.66$ .

**Mots clés :** Linaceae, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antifongique, activité antibactérienne et anti inflammatoire.

## Abstract

This study focuses on the analysis of the antioxidant, enzymatic, antifungal, antibacterial, and anti-inflammatory activities for plant from the **Linaceae** family widespread in Algeria. This family is known for its richness in secondary metabolites, particularly polyphenols and flavonoids.

The biological activity of the extracts was evaluated *in vitro* using four techniques to measure antioxidant activity: DPPH, ABTS, FRAP, and Phenantroline, as well as the quantification of polyphenols and flavonoids. Ethyl acetate (Ext AE) and n-butanolic extract (Ext B) demonstrated the best antioxidant capacities in the DPPH and ABTS tests, with IC<sub>50</sub> values of  $38.93 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$  for Ext AE (DPPH) and  $28.93 \pm 0.81 \mu\text{g/ml}$  for Ext B (ABTS). In contrast, for tests measuring reducing power (FRAP and Phenantroline), Ext D and Ext AE showed the best results, with A<sub>0.5</sub> values of  $55.03 \pm 4.14 \mu\text{g/ml}$  for Ext D (FRAP) and  $22.26 \pm 3.84 \mu\text{g/ml}$  for Ext AE (Phenantroline).

The concentrations measured for the determination of polyphenols and flavonoids using dichloromethane and *n*-butanolic extracts were  $281.75 \pm 18.56 \text{ mg GAE/g}$  and  $288.19 \pm 6.88 \text{ mg RE/g}$ , respectively.

The evaluation of the antifungal activity of the extracts established a strong efficacy against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, notably the *n*-butanolic extract being the most active, with an inhibition rate of 53.3% at a concentration of 30 mg/mL. It should be noted that the aqueous extracts of the Linaceae genus showed no antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, except for the dichloromethane extract which demonstrated weak antibacterial activity.

The evaluation of anti-inflammatory activity *in vitro* through the test of protecting the red blood cell membrane against osmotic and thermal stress, using rat blood, reveals that the ethyl acetate extract demonstrates significant activity, with a concentration of  $69.56\% \pm 1.66$ .

**Keywords:** Linaceae, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antifungal activity, antibacterial activity and anti-inflammatory.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحليل الأنشطة المضادة للأكسدة ، الفطرية، البكتيرية، و المضادة لالالتهاب نبات من عائلة Linaceae المنتشر في الجزائر. هذا الجنس معروف بعنه بالمواد الأيضية الثانوية، و خاصة البوليفينولات و الفلافونويدات.

تم تقييم النشاط البيولوجي للمستخلصات في المختبر باستخدام أربع تقنيات لقياس النشاط المضاد للأكسدة FRAP، ABTS، DPPH و الفينانثرولين ، بالإضافة إلى تحديد كمية البوليفينولات و الفلافونويدات.

أظهر كل من مستخلص أسيتات الإيثيلي (Ext AE) ومستخلص البيتانول (Ext B) أفضل القدرات المضادة للأكسدة في اختبارات DPPH و ABTS ، حيث كانت قيم IC<sub>50</sub> هي  $38.93 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$  للأسيدات الإيثيلي (DPPH) و  $28.93 \pm 0.81 \mu\text{g/ml}$  للمستخلص البيتانول (ABTS). بالمقابل، في الاختبارات التي تقيس القدرة الاختزالية (FRAP) و الفينانثرولين، أظهرت كل من Ext AE و Ext D أفضل النتائج، مع قيم A<sub>0.5</sub> قدرها  $55.03 \pm 4.14 \mu\text{g/ml}$  و  $22.26 \pm 3.84 \mu\text{g/ml}$  (FRAP) و Ext AE في فحص الفينانثرولين.

كانت التركيزات المقاسة لتقدير البوليفينول و الفلافونويد باستخدام مستخلصات ثانوي كلوروميثان و ، على التوالي.  $6.88 \pm 288.19 \text{ mg EAG/1g EXT}$  و  $18,56 \pm 281,75 \text{ mg EQUE/1g EXT}$ .

تقييم نشاط مضاد للفطريات للمستخلصات أظهر فعالية قوية ضد *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* حيث كان المستخلص البوتانيولي الأكثر نشاطا، بمعدل تثبيط يبلغ 53.3% بتركيز 30 ملغم/مل.

يجدر بالذكر أن المستخلصات المائية من نبات من عائلة Linaceae لم تظهر أي نشاط مضاد للبكتيريا ضد *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، باستثناء المستخلص ثانوي كلورو ميثان الذي أظهر نشاطا مضادا للبكتيريا ضعيفا.

تقييم لنشاط المضاد لالالتهابات في المختبر من خلال اختبار حماية الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء ضد الإجهاد الأسموزي والحراري، باستخدام دم الفرمان، يكشف أن مستخلص أسيتات الإيثيل يظهر نشاطا كبيرا، بتركيز  $1.66 \pm 69.56 \%$ .

**الكلمات المفتاحية:** *Linacea* ، البوليفينولات، الفلافونويدات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للفطريات، النشاط المضاد للبكتيريا، مضاد الالتهابات.

<b>Année universitaire : 2024-2025</b>	<b>Présenté par : Boulahlib Mohamed Khairi et Merniz Salih</b>
<b>Exploration des propriétés biologiques d'une plante de l'Est algérien</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master</b>	
<b>Résumé</b>	
<p>Cette étude se focalise sur l'analyse des activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires d'une espèce du genre Linaceae répandue en Algérie. Ce genre est connu pour sa richesse en métabolites secondaires, en particulier les polyphénols et les flavonoïdes.</p> <p>L'activité biologique des extraits a été évaluée <i>in vitro</i> à l'aide de quatre techniques pour mesurer l'activité antioxydante : DPPH, ABTS, FRAP et Phénanthroline, ainsi que la quantification des polyphénols et flavonoïdes. L'acétate d'éthyle (Ext AE) et l'extrait <i>n</i>-butanolique (Ext B) ont montré les meilleures capacités antioxydantes lors des tests DPPH et ABTS, avec des IC<sub>50</sub> de 38.93 ± 0.35 µg/ml pour Ext AE (DPPH) et 28.93 ± 0.81 µg/ml pour Ext B (ABTS). En revanche, pour les tests mesurant le pouvoir réducteur (FRAP et Phénanthroline), l'Ext D et l'Ext AE ont montré les meilleurs résultats, avec des A<sub>0.5</sub> de 55.03 ± 4.14 µg/ml pour Ext D (FRAP) et 22.26 ± 3.84 µg/ml pour Ext AE (Phénanthroline).</p> <p>Les concentrations mesurées pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes à l'aide des extraits de dichlorométhane et de <i>n</i>-butanolique étaient de 281.75 ± 18.56 mg EAG/1g EXT et 288.19 ± 6.88 mg EQUE/1g EXT, respectivement.</p> <p>L'évaluation de l'activité antifongique des extraits a établi une forte efficacité contre <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>, notamment l'extrait <i>n</i>-butanolique étant le plus actif, avec un taux d'inhibition de 53.3 % à une concentration de 30 mg/ml. Il convient de noter que les extraits aqueux du genre Linaceae n'ont montré aucune activité antibactérienne contre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>, à l'exception de l'extrait dichlorométhane qui a démontré une activité antibactérienne faible.</p> <p>L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> à travers le test de protection de la membrane cytoplasmique des globules rouges face au stress osmotique et thermique, en utilisant du sang de rats, révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle démontre une activité significative, avec une concentration de 69.56 % ± 1.66.</p>	
<p><b>Mots-clés :</b> Linaceae, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antifongique, activité antibactérienne et anti inflammatoire.</p>	
<p>Laboratoires de recherche : Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (Université Frères Mentouri, Constantine 1). Laboratoire de biochimie laboratoire 5, mycologie laboratoire 9, bactériologie laboratoire 10 (CRBT Constantine).</p>	
<p><b>Encadreur :</b> Mr KITOUNI Rachid (MCA – UFM Constantine1).</p> <p><b>Co-Encadreur :</b> Mr BEZZI Tarek (MRA – CRBT Constantine).</p> <p><b>Présidente :</b> Mme BENSMIRA Soumia (MAA- UFM Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p><b>Examinateuse :</b> Mme ZEHANI Lamia (MCB- UFM Constantine 1).</p>	