

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des sciences exactes

Département de chimie

N° d'ordre : 53/DC/2022

N° de série : 05/CH/2022

**Thèse**

**Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences**

**En Chimie Organique**

**Option : phytochimie**

**Par : Mme Trifa Ouarda, Ep Boudraa**

*Thème :*

**Caractérisation phytochimique et évaluation de  
l'activité antioxydante de *Nicotiana glauca*  
(Solanaceae)**

*Sous l'encadrement académique du : Pr Akkal Salah*

*Devant le jury composé de :*

M <sup>me</sup>	Zaabat Nabila	MCA.	Université des Frères Mentouri,	Constantine 1	Présidente
M <sup>r</sup>	Akkal Salah	Prof.	Université des Frères Mentouri,	Constantine 1	Rapporteur
M <sup>r</sup>	Gherraf Noureddine	Prof.	Université Larbi ben M'hidi,	Oum El-Bouaghi	Examineur
M <sup>r</sup>	Laouer Hocine	Prof.	Université Ferhat Abbes,	Sétif 1	Examineur

**Année universitaire 2021-2022**

## Remerciements

Mes remerciements sont d'abord au Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, Monsieur **Akkal Salah**, professeur de l'université de Constantine 1, de m'avoir accordé l'honneur de diriger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus profond respect.

Je bénie également les membres du jury pour avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.

Ainsi, Je tiens à adresser mes vifs remerciements et l'expression de mon profond respect à Madame **ZAABAT Nabila**, M.C.A à l'université des Frères Merntouri, Constantine 1, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse malgré ses multiples obligations.

J'aimerais remercier, Monsieur **GHERRAF Noureddine**, professeur à l'université de Larbi ben M'hidi, Oum El-Bouaghi, pour l'honneur qu'il nous a fait, en acceptant d'examiner ce travail.

Mes vifs et sincères remerciements vont également à Monsieur **LAOUER Hocine**, professeur à l'université de Ferhat Abbes, Sétif 1, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, plus particulièrement **Dr. BENSOUICI Chawki** pour son aide concernant la réalisation de l'activité antioxydante qui ont été effectués au Laboratoire de biochimie, à CRBT Nouvelle ville Constantine et **Dr. LEFHAL Mostefa** de m'avoir aidé à réaliser le spectre UV et le screening phytochimiques des extraits.

Un grand merci également à **Dr. PERRUCHON Olivier**, **SCHMITZ-AFONSO Isabelle**, **Pr. AFONSO Carlos** et **Pr. ELOMRI Abdelhakim** pour la réalisation des analyses LC-MS/MS de nos échantillons au sein du Laboratoire COBRA, France.

## Remerciements

Je tiens à remercier profondément ma chère collègue **Dr. Busetla Ahlem** pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse qu'elle a apporté à ce travail. Merci pour tes conseils et encouragements.

Enfin, pour tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma famille, notamment :

*A*mes **parents** qui m'ont tout donné sans rien en retour et qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.

*A*mes frères **FARID** et **AMER** et A mes sœurs **FIFOU** et **WIDED** qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont toujours soutenu et encouragée psychologiquement.

*A*mes neveux et nièces : **ANES**, **SERADJ**, **AHMED YAZEN**, **RITEL**, **SADJIDA**,  
**ROKAYA**, **ASSILE**, **DJOUMANA**, **DJIHANE ET DOHA**.

Je dédie spécialement cette thèse à mon marie **ABEDELFATAH** pour sa patience, son soutien et ses nombreux encouragements, à mes fils **TEDJE EDDINE** et **NIZER** qui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles, qui ont toujours suraviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.

Je voudrais simplement leur dire que je les aime de tout mon cœur.

*A*mes chères amies **Kawter**, **souad** et **chahra** pour leur amour et soins.

*A*toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*A*tous mes collègues , en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.

Ainsi qu'à toutes les amies qui ont répondu à notre invitation.

*OUARDA*

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Table de matières

Abréviations et symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

## Chapitre I : Etude bibliographique

<b>1. Présentation de la famille : Solanaceae .....</b>	<b>4</b>
1.1 Généralités.....	4
1.2 Distribution géographique .....	4
1.3 Description botanique des Solanaceae .....	5
1.4 Les métabolites secondaires chez les Solanaceae .....	5
1.5 Importance des Solanaceae.....	9
<b>2 Présentation du genre : <i>Nicotiana</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1 Généralité .....	10
2.2 Description botanique du genre <i>Nicotiana</i> .....	10
2.3 Les métabolites secondaires du genre <i>Nicotiana</i> .....	11
2.3.1 Les alcaloïdes .....	11
2.3.2 Les composés phénoliques .....	13
2.4 Usages traditionnels du genre <i>Nicotiana</i> .....	31
2.5 Intérêt pharmacologique du genre <i>Nicotiana</i> .....	32
<b>3. Présentation de l'espèce : <i>Nicotiana glauca</i>.....</b>	<b>34</b>
3.1. Généralités.....	34
3.2. Description botanique de <i>Nicotiana glauca</i> .....	34
3.3. Classification dans la systématique .....	35
3.4. Noms communs et vernaculaires .....	35
3.5. Origine et distribution géographique.....	36
3.6. Les métabolites secondaires de <i>Nicotiana glauca</i> .....	36
3.7. Usages traditionnels de <i>Nicotiana glauca</i> .....	39
3.8. Intérêt pharmacologique de <i>Nicotian glauca</i> .....	40
3.9. Toxicité de l'espèce <i>Nicotiana glauca</i> .....	42

# TABLE DES MATIERES

## Chapitre II : Activité antioxydante

<b>1. Introduction .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Les radicaux libres .....</b>	<b>51</b>
2.1. Définition.....	51
2.2. Principaux radicaux libres.....	51
<b>3. Le stress oxydatif .....</b>	<b>53</b>
3.1. Définition.....	53
3.2. Origine du stress oxydant .....	53
3.3. Conséquence de stress oxydatif .....	54
<b>4. Les antioxydants .....</b>	<b>55</b>
4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	55
4.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	56
4.2.1. Source de synthèse.....	56
4.2.2. Source naturelle.....	57
<b>5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .....</b>	<b>60</b>
5.1. Test au DPPH.....	60
5.2. Test d'ABTS.....	61
5.3. Test de DMSO alcalin.....	62
5.4. Test de phénantroline.....	62
5.5. Test de FRAP .....	63
5.6. Test de CUPRAC .....	64

## Chapitre III : Matériel et méthodes

<b>1. Matériel végétal .....</b>	<b>69</b>
1.1. Origine du matériel végétal.....	69
1.2. Extraction.....	69
1.3. Calcul du rendement .....	70
<b>2. Analyses qualitative par screening phytochimique .....</b>	<b>71</b>
<b>3. Analyse quantitative par dosage .....</b>	<b>73</b>
3.1. Dosage des polyphénols .....	73
3.2. Dosage des flavonoïdes .....	74
3.3. Dosage des flavonols .....	75
<b>4. Analyse par spectrométrie de masse et ses couplages .....</b>	<b>76</b>

## TABLE DES MATIERES

4.1.	La spectrométrie de masse.....	76
4.2.	La masse couplée à l'HPLC (LC/MS).....	76
4.3.	Spectrométrie de masse tandem (LC/MS/MS).....	77
<b>5.</b>	<b>Evaluation du potentiel antioxydant.....</b>	<b>79</b>
5.1.	Détermination de l'activité antioxydante par le test DPPH.....	79
5.2.	Détermination de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS.....	80
5.3.	Détermination de l'activité antioxydante par Superoxide DMSO alcalin.....	80
5.4.	Détermination de l'activité antioxydante par le test Phénantroline.....	81
5.5.	Détermination de l'activité antioxydante par le test FRAP.....	81
5.6.	Détermination de l'activité antioxydante par le test CUPRAC.....	82
<b>6.</b>	<b>Expression des résultats.....</b>	<b>82</b>
6.1.	Pourcentage d'inhibition.....	82
6.2.	Calcul des concentrations inhibitrice 50% " IC <sub>50</sub> ".....	82
<b>7.</b>	<b>Analyse Statistique.....</b>	<b>83</b>

### Chapitre IV : Résultats et discussion

<b>1.</b>	<b>Rendement d'extraction.....</b>	<b>89</b>
<b>2.</b>	<b>Composition qualitative des extraits.....</b>	<b>89</b>
<b>3.</b>	<b>Composition quantitative des extraits.....</b>	<b>91</b>
3.1.	Dosage des polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux.....	91
3.1.1.	Teneur en phénols totaux.....	91
3.1.2.	Teneur en flavonoïdes totaux.....	92
3.1.3.	Teneur en flavonols totaux.....	92
<b>4.</b>	<b>Identification des composés chimiques par LC-ESI-MS/MS des extraits.....</b>	<b>95</b>
4.1.	Composés majoritaires de l'extrait DCM.....	96
4.2.	Composés majoritaires de l'extrait AE.....	103
4.3.	Composés majoritaires de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	110
<b>5.</b>	<b>Détermination du potentiel antioxydant des extraits.....</b>	<b>117</b>
5.1.	Test au DPPH.....	117
5.2.	Test à l'ABTS.....	119
5.3.	Test par superoxide DMSO alcalin.....	121
5.4.	Test de phénantroline.....	124
5.5.	Test de FRAP.....	126
5.6.	Test de CUPRAC.....	128
<b>6.</b>	<b>Fractionnement de l'extrait <i>n</i>-BuOH.....</b>	<b>131</b>

## TABLE DES MATIERES

<b>6.1.</b>	<b>Détermination stucturale du composé P*</b> .....	<b>132</b>
<b>6.1.1.</b>	<b>UV-visible</b> .....	<b>132</b>
<b>6.1.2.</b>	<b>RMN<sup>1</sup>H</b> .....	<b>133</b>
<b>6.1.3.</b>	<b>RMN <sup>13</sup>C</b> .....	<b>135</b>
<b>6.1.4.</b>	<b>L'hydrolyse acide des hétérosides</b> .....	<b>137</b>
<b>6.2.</b>	<b>Détermination du potentiel antioxydant du composé isolé P*</b> .....	<b>139</b>
	<b>Conclusion</b> .....	<b>142</b>

## Abréviations et symboles

<b>ABTS</b>	acide 2,2'- azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
<b>AE</b>	acétate d'éthyle
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	trichlorure d'aluminium
<b>BHA</b>	butylHydroxyAnisole
<b>BHT</b>	butylHydroxyToluene
<b>CAS</b>	service des résumés chimiques (Chemical Abstracts Service)
<b>CC</b>	chromatographie sur Colonne
<b>CCM</b>	chromatographie sur Couche Mince
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	Cuivre
<b>CUPRAC</b>	capacité antioxydante par réduction de cuivre
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	diméthylsulfoxyde deutéré
<b>DPPH</b>	1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl
<b>EAG</b>	équivalent en acide gallique.
<b>ERO</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>ERN</b>	espèces réactives de l'azote
<b>FRAP</b>	ferric ion Reducing Antioxydant Parameter
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	acide borique
<b>HCl</b>	acide chlorhydrique
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentration Inhibitrice à 50%
<b>J(Hz)</b>	constante de couplage exprimé en Hertz
<b>LC</b>	chromatographie en phase liquide
<b>LC/MS</b>	couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse
<b>LC/MS/MS</b>	chromatographie Liquide couplée à deux spectrométries de masse
<b>Me</b>	méthyl
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>m/z</b>	rapport masse / charge élémentaire de l'ion
<b>NaOAc</b>	acétate de sodium
<b>NaOH</b>	hydroxyde de sodium
<b>OMe</b>	Méthoxy
<b>PG</b>	gallate propylée
<b>ppm</b>	partie par million

## Abréviations et symboles

<b>QE</b>	équivalent en quercétine.
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	résonance Magnétique Nucléaire du Carbone
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>TCA</b>	acide trichloracétique
<b>TBHQ</b>	Tétrabutylhydroquinone
<b>δC</b>	déplacement chimique du carbone en ppm
<b>δH</b>	déplacement chimique du proton en ppm
<b>λ</b>	longueur d'onde

## Liste des figures

### Chapitre I

<b>Figure I.1.</b>	Répartition géographique des Solanaceae dans le monde	<b>5</b>
<b>Figure I.2.</b>	Exemples des alcaloïdes trouvés dans les plantes des Solanaceae	<b>7</b>
<b>Figure I.3.</b>	Exemples des composés polyphénoliques trouvés dans les plantes des Solanaceae.	<b>8</b>
<b>Figure I.4.</b>	Exemples des alcaloïdes isolés du genre <i>Nicotiana</i> .	<b>12</b>
<b>Figure I.5.</b>	Structures des principales classes des flavonoïdes	<b>13</b>
<b>Figure I.6.</b>	Propriétés biologiques des flavonoïdes	<b>14</b>
<b>Figure I.7.</b>	Structures chimiques des flavones isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>16</b>
<b>Figure I.8.</b>	Représentation des différentes applications des acides phénoliques.	<b>21</b>
<b>Figure I.9.</b>	Structures chimiques des acides phénoliques isolés du genre <i>Nicotiana</i> .	<b>24</b>
<b>Figure I.10.</b>	Structures chimiques de coumarines isolées du genre <i>Nicotiana</i>	<b>27</b>
<b>Figure I.11.</b>	Structures des stérols isolés à partir du <i>Nicotiana</i>	<b>28</b>
<b>Figure I.12.</b>	Structures des caroténoïdes isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>28</b>
<b>Figure I.13.</b>	Structures des triterpènes isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>29</b>
<b>Figure I.14.</b>	Structures des lignanes isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>29</b>
<b>Figure I.15.</b>	Structures des terpénoïdes isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>30</b>
<b>Figure I.16.</b>	Structures des diterpènes isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>30</b>
<b>Figure I.17.</b>	Différentes activités biologiques des espèces du genre <i>Nicotiana</i>	<b>32</b>
<b>Figure I.18.</b>	Morphologie générale de <i>N.glauca</i>	<b>34</b>
<b>Figure I.19.</b>	Répartition géographique de <i>N.glauca</i> dans le monde	<b>36</b>
<b>Figure I.20.</b>	Principaux alcaloïdes isolés de <i>N.glauca</i>	<b>37</b>

## Liste des figures

### Chapitre II

<b>Figure II.1.</b>	Les voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO).	<b>53</b>
<b>Figure II.2.</b>	Les causes du stress oxydative.	<b>54</b>
<b>Figure II.3.</b>	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes.	<b>55</b>
<b>FigureII.4.</b>	Antioxydants de synthèse les plus utilisés.	<b>56</b>
<b>FigureII.5.</b>	Représentation des différentes activités biologiques des flavonoïdes	<b>58</b>
<b>Figure II.6.</b>	Les éléments structuraux essentiels pour l'obtention d'un pouvoir antioxydant des flavonoïdes	<b>58</b>
<b>Figure II.7.</b>	Mécanisme d'action antioxydante des flavonoides (3',4'-diOH)	<b>59</b>
<b>Figure II.8.</b>	Sites de chélation des ions métalliques (M) des flavonoïdes	<b>59</b>
<b>Figure II.9.</b>	Mécanisme d'action antioxydante des hydroxyflavones C3-OH ou C5-OH	<b>60</b>
<b>Figure II.10.</b>	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	<b>61</b>
<b>Figure II.11.</b>	Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant.	<b>61</b>
<b>Figure II.12.</b>	Mécanisme réactionnel de l'activité de piégeage des anions radicalaires superoxyde	<b>62</b>
<b>FigureII.13.</b>	Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline.	<b>63</b>
<b>FigureII.14.</b>	Schéma de la réaction du test FRAP	<b>63</b>
<b>FigureII.15.</b>	Réduction du complexe neocuproïne/copper(II).	<b>64</b>

### Chapitre III

<b>Figure III.1.</b>	Les étapes d'extraction des différents extraits de <i>N. glauca</i>	<b>70</b>
<b>Figure III.2.</b>	Structure de l'acide gallique	<b>73</b>
<b>Figure III.3.</b>	Structure de base des flavonoides	<b>74</b>
<b>Figure III.4.</b>	Structure de base des flavonols	<b>75</b>
<b>Figure III.5.</b>	Schéma d'un système LC-MS	<b>77</b>
<b>Figure III.6.</b>	Schémas de principe du fonctionnement des techniques de spectrométrie de masse	<b>78</b>
<b>Figure III.7.</b>	Principe de la LC-MS/MS quadripolaire.	<b>78</b>

## Liste des figures

### Chapitre IV

<b>Figure IV.1.</b>	Rendement des extraits des feuilles de <i>N.glauca</i>	<b>89</b>
<b>Figure IV.2.</b>	Courbe étalonnage de l'acide gallique pour le dosage phénols totaux.	<b>91</b>
<b>Figure IV.3.</b>	Courbe étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	<b>92</b>
<b>Figure IV.4.</b>	Courbe étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.	<b>93</b>
<b>Figure IV.5.</b>	Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait DCM des feuilles de <i>N.glauca</i> en mode positif	<b>96</b>
<b>Figure IV.6.</b>	Spectre de masse du composé D1	<b>97</b>
<b>Figure IV.7.</b>	Schéma de fragmentation de Nicotine	<b>97</b>
<b>Figure IV.8.</b>	Spectre de masse du composé D2	<b>98</b>
<b>Figure IV.9.</b>	Schéma de fragmentation de l'Anabasine	<b>98</b>
<b>Figure IV.10.</b>	Spectre de masse de composé D3	<b>99</b>
<b>Figure IV.11.</b>	Schéma de fragmentation de $\beta$ -Damascénone	<b>99</b>
<b>Figure IV.12.</b>	Spectre de masse du composé D4	<b>100</b>
<b>Figure IV.13.</b>	Schéma de fragmentation de Scopolétine	<b>100</b>
<b>Figure IV.14.</b>	Spectre de masse du composé D5	<b>101</b>
<b>Figure IV.15.</b>	Spectres de masse du composé D6	<b>101</b>
<b>Figure IV.16.</b>	Spectre de masse du composé D7	<b>102</b>
<b>Figure IV.17.</b>	Schéma de fragmentation de N-cis-Feruloyltyramine	<b>102</b>
<b>Figure IV.18.</b>	Spectre de masse du composé D8	<b>102</b>
<b>Figure IV.19.</b>	Schéma de fragmentation d'Octanoyl-Nornicotine	<b>103</b>
<b>Figure IV.20.</b>	Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait AE des feuilles de <i>N.glauca</i> en mode positif	<b>103</b>
<b>Figure IV.21.</b>	Spectre de masse du composé A3	<b>105</b>
<b>Figure IV.22.</b>	Schéma de fragmentation de 3-Hydroxycoumarine	<b>105</b>
<b>Figure IV.23.</b>	Spectre de masse du composé A4	<b>106</b>
<b>Figure IV.24.</b>	Schéma de fragmentation de Puromycine	<b>106</b>
<b>Figure IV.25.</b>	Spectre de masse du composé A6	<b>107</b>

## Liste des figures

<b>Figure IV.26.</b>	Schéma de fragmentation de Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside	<b>107</b>
<b>Figure IV.27.</b>	Spectre de masse du composé A7	<b>108</b>
<b>Figure IV.28.</b>	Schéma de fragmentation de Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	<b>108</b>
<b>Figure IV.29.</b>	Spectre de masse du composé A8	<b>109</b>
<b>Figure IV.30.</b>	Schéma de fragmentation de 3,4-Dicaffeoyl-1,5-quinolactone	<b>109</b>
<b>Figure IV.31.</b>	Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait <i>n</i> -BuOH des feuilles de <i>N.glauca</i> en mode positif	<b>110</b>
<b>Figure IV.32.</b>	Spectre de masse du composé B3	<b>111</b>
<b>Figure IV.33.</b>	Schéma de fragmentation Caffeoyl putrescine	<b>111</b>
<b>Figure IV.34.</b>	Spectre de masse du composé B4	<b>112</b>
<b>Figure IV.35.</b>	Schéma de fragmentation d'Acide indole acrylique	<b>112</b>
<b>Figure IV.36.</b>	Spectre de masse du composé B8	<b>113</b>
<b>Figure IV.37.</b>	Schéma de fragmentation de 3-oxo-C4-homoserine lactone	<b>113</b>
<b>Figure IV.38.</b>	Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>117</b>
<b>Figure IV.39.</b>	Valeurs d'IC <sub>50</sub> du test DPPH pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>119</b>
<b>Figure IV.40.</b>	Plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>120</b>
<b>Figure IV.41.</b>	Valeurs d'IC <sub>50</sub> du test ABTS pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>121</b>
<b>Figure IV.42.</b>	Plaque de dosage de l'activité du piégeage par superoxide DMSO alcalin des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>122</b>
<b>Figure IV.43.</b>	Valeurs d'IC <sub>50</sub> du test DMSO alcalin pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>123</b>
<b>Figure IV.44.</b>	Plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline par les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>124</b>
<b>Figure IV.45.</b>	Valeurs des A <sub>0,5</sub> du test phénantroline pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>125</b>
<b>Figure IV.46.</b>	Plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>126</b>

### Liste des figures

<b>Figure IV.47.</b>	Valeurs des $A_{0,5}$ du test FRAP pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>127</b>
<b>Figure IV.48.</b>	Plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>128</b>
<b>Figure IV.49.</b>	Valeurs des $A_{0,5}$ du test CUPRAC pour les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>129</b>
<b>Figure IV.50.</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H étalé du composé P* (région $\delta=6,20$ ppm - $12,59$ ppm)	<b>134</b>
<b>Figure IV.51.</b>	Spectre RMN <sup>1</sup> H étalé du composé P* à 300 (région $\delta=0,99$ ppm - $5,34$ ppm)	<b>135</b>
<b>Figure IV.52.</b>	Spectre <sup>13</sup> C du composé P* à 75 MHz enregistré dans le DMSO-d <sub>6</sub> .	<b>136</b>
<b>Figure IV.53.</b>	Co-chromatographie des sucres libérés de composé P*.	<b>137</b>
<b>Figure IV.54.</b>	Structure de la Rutine	<b>138</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre I

<b>Tableau I.1.</b>	Exemples des alcaloïdes biologiquement actifs isolés de la famille des Solanaceae	<b>6</b>
<b>Tableau I.2.</b>	Les flavones isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>15</b>
<b>Tableau I.3.</b>	Structures chimiques des flavones isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>16</b>
<b>Tableau I.4.</b>	Les flavonoles aglycones isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>17</b>
<b>Tableau I.5.</b>	Structures chimiques des flavonoles aglycones isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>18</b>
<b>Tableau I.6.</b>	Les flavonoles glycosides isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>19</b>
<b>Tableau I.7.</b>	Structures chimiques des flavonoles glycosides isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>19</b>
<b>Tableau I.8.</b>	Les isoflavonoides isolés à partir de <i>Nicotiana tabacum</i>	<b>20</b>
<b>Tableau I.9.</b>	Structures chimiques des isoflavonoides isolés à partir de <i>N.tabacum</i>	<b>20</b>
<b>Tableau I.10.</b>	Les acides phénoliques isolés du genre <i>Nicotiana</i>	<b>22</b>
<b>Tableau I.11.</b>	Divers métabolites secondaires isolés à partir du genre <i>Nicotiana</i>	<b>25</b>
<b>Tableau I.12.</b>	Les composés majoritairement présents dans l'huile essentielle du <i>N.glauca</i> d'origine jordanienne	<b>38</b>
<b>Tableau I.13.</b>	Les composés majoritairement présents dans l'huile essentielle du <i>N.glauca</i> d'origine tunisienne	<b>38</b>

### Chapitre II

<b>Tableau II.1.</b>	Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.	<b>52</b>
----------------------	---	-----------

### Chapitre III

<b>Tableau III.1.</b>	Tableau synthétique de groupes chimiques, réactions d'identification et indicateurs utilisés	<b>72</b>
-----------------------	--	-----------

### Chapitre IV

<b>Tableau IV.1.</b>	Résultat du criblage phytochimique de <i>N.glauca</i> .	<b>90</b>
<b>Tableau IV.2.</b>	Quantité des polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols dans les extraits de <i>N.glauca</i> .	<b>93</b>

### Liste des tableaux

<b>Tableau IV.3.</b>	Composés de l'extrait DCM identifiés par LC-ESI-MS/MS	<b>96</b>
<b>Tableau IV.4.</b>	Composés de l'extrait AE identifiés par LC-ESI-MS/MS	<b>104</b>
<b>Tableau IV.5.</b>	Composés de l'extrait <i>n</i> -BuOH identifiés par LC-ESI-MS/MS	<b>110</b>
<b>Tableaux IV.6.</b>	Les composés majoritaires identifiés par LC-ESI-MS/MS. dans les extraits des feuilles de <i>N.glauca</i>	<b>114</b>
<b>Tableau IV.7.</b>	Inhibition du radical DPPH par les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>118</b>
<b>Tableau IV.8.</b>	Inhibition du cation radical ABTS <sup>•+</sup> par les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>120</b>
<b>Tableau IV.9.</b>	Inhibition du DMSO alcalin par les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>122</b>
<b>Tableau IV.10.</b>	Absorbance du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline des extraits de <i>N.glauca</i>	<b>124</b>
<b>Tableau IV.11.</b>	Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits de <i>N.glauca</i>	<b>126</b>
<b>Tableau IV.12.</b>	La capacité antioxydante de réduction du cuivre de <i>N.glauca</i>	<b>128</b>
<b>Tableau IV.13.</b>	La progression de la colonne polyamide de l'extrait <i>n</i> -BuOH	<b>131</b>
<b>Tableau IV.14.</b>	Données de la série spectrale UV-Visible du composé P*	<b>132</b>
<b>Tableau IV.15.</b>	Données spectrales RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de composé P*.	<b>138</b>
<b>Tableau IV.16.</b>	Capacité antioxydante du composé isolé P* mesurés par différentes méthodes	<b>139</b>

# **Introduction générale**

## Introduction générale

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gents apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé humaine (Mghezzi *et al.*,2016)

Il faut toutefois noter que, de nos jours en Afrique, nous sommes de plus en plus confrontés à la résurgence de nouvelles maladies. Entre autres, les maladies liées au stress oxydant. En effet, certains extraits de plantes se sont montrés efficaces pour contrôler la propagation de ces maladies pluri-factorielles (Gheffour *et al.*,2015)

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques ainsi qu'un très large éventail d'activités biologiques (Kechar & Hellal .,2017). Parmi ces biomolécules, les composés phénoliques qui sont utilisés dans diverses applications. D'autre part, ces composés possèdent différentes propriétés biologiques incluant principalement les pouvoirs anti-inflammatoire, antimicrobien, anticancéreux, antiviral, ainsi que la prévention des maladies cardiovasculaires et dégénératives (Bettaieb *et al.*,2017)

L'Algérie, au sein du bassin méditerranéen, possède une flore riche et peu valorisée du point de vue de ses potentiels chimiques sensoriels ou biologiques (Gheffour *et al.*,2015), avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires(Hamel *et al.*,2018) . La région tellienne qui s'étend au-delà de 4% de la superficie du territoire national englobe à elle seule 2/3 de la faune et de la flore algérienne. Le Tell littoral en particulier est considéré par plusieurs auteurs comme une zone d'intérêt majeur vu la richesse biologique et l'endémisme élevé qui le caractérisent (Sakhraoui *et al.*,2020).

Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (Hamel *et al.*,2018).

L'évaluation du potentiel antioxydant, des teneurs en polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols des extraits bruts et leurs caractérisations chimiques en utilisant LC-ESI-MS/MS et l'identification structurale des molécules bioactives à partir des feuilles de *Nicotiana glauca* Graham, constitue l'objectif principal de ce travail.

Le manuscrit est divisé en deux parties :

- Dans une première partie, nous résumerons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Solanaceae ainsi que l'espèce étudiée (chapitre I). Cette partie comprend aussi des généralités sur l'activité antioxydante (Chapitre II).
- La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des techniques d'extraction, les méthodes de séparation et analyse LC-ESI-MS/MS ainsi que les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (chapitre III). Le quatrième chapitre de cette partie regroupe les résultats obtenus et la discussion qui mettra l'accent sur leur signification.
- Enfin le manuscrit se terminera par une conclusion.

### *Références bibliographiques*

**Bettaieb Rebey, I.**, Bourgou, S., Saidani Tounsi, M., Fauconnier, M. L., & Ksouri, R. (2017). Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavandula dentata*). *Journal of New Sciences*, 39(2), 2096-2105.

**Hamel, T.**, Sadou, S., Seridi, R., Boukhdar, S., & Boulemtafes, A. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est algérien). *Ethnopharmacologia*, 59, 65-70.

**Gheffour, K.**, Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.

**Kechar, K. & Hellal, B.** (2017). Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Ballota hirsuta* Benth. du Tessala (Algérie occidentale), *Phytothérapie*, 15(4), 217-221.

**Mghezzi Habellah R.**, Karoune S., Kechebar M.S.A., & Bounab H. (2016). Etude des composés phénoliques et des activités antioxydantes de *Acacia ehrenbergiana* de la région de Tindouf. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)*, 13(1), 27-34.

**Sakhraoui, N.**, Boussouak, R., Metallaoui, S., Chefrou, A., & Hadeif, A. (2020). La flore endémique du Nord-Est algérien face à la menace des espèces envahissantes. *Acta Botanica Malacitana*, 45.

# **CHAPITRE I :**

## **Etude**

# **Bibliographique**

## 1. Présentation de la famille : Solanaceae

### 1.1 Généralités

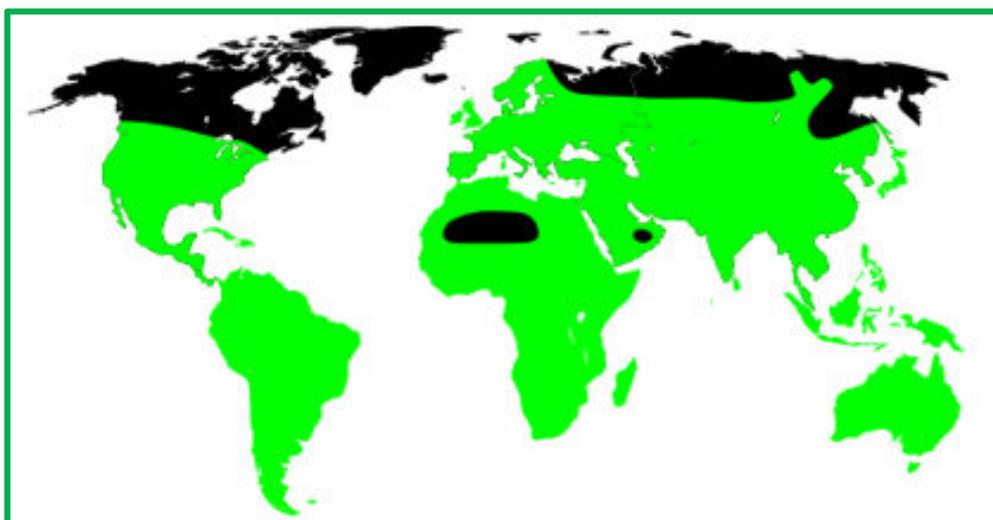
Le nom ou terme Solanaceae dérive du mot latin " Solamen " ce qui fait référence aux effets sédatives. La famille se compose 2300 espèces réparties en 96 genres. Quelques genres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un grand nombre d'espèces : *Solanum* (1500 espèces), *Lycianthes* (Dunal) Hassl (200 espèces), *Cestrum* L (175 espèces), *Nicotiana* L (95 espèces), *Physalis* L (80 espèces), et *Lycium* L 75 espèces) (Bikandu *et al.*,2021). En Afrique du Nord, la famille des Solanaceae est représentée par 92genre comportant 260 espèces dont 9 sont endémiques. En Algérie, cette famille regroupe 38 espèces réparties en 12 genres dont *Solanum* sont largement distribués à travers le monde (Chelghoum *et al.*, 2020).

### 1.2 Distribution géographique

La famille des Solanaceae possède une distribution cosmopolite dont les espèces sont très répandues dans les régions tropicales et tempérées chaudes, particulièrement en Amérique du Sud. Elles se trouvent aussi en Australie et en Afrique, avec un petit nombre en Europe et en Asie (Furer *et al.*,2011 ; Bikandu *et al.*,2021).

Les espèces médicinales les plus importantes de la famille des Solanaceae appartenant aux genres suivants (Shah *et al.*,2012) :

- *Solanum*
- *Atropa*
- *Capsicum*
- *Datura*
- *Withania*
- *Hyoscyamus*
- *Nicotiana*
- *Miscellaneous*



**Figure I.1.** Répartition géographique des Solanaceae dans le monde (zones vert clair)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanaceae\\_map.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanaceae_map.svg) (14/02/2021)

### 1.3 Description botanique des Solanaceae

La famille des Solanaceae appartenant au deuxième groupe végétal des tubiflores qui comporte 6 familles (Goullé *et al.*,2004). Elles présentent quelques caractères communs : ce sont essentiellement des herbes, arbustes, lianes et herbes vivaces ou annuelles (Goullé *et al.*,2004 ; Pomilio *et al.*,2008). Les feuilles sont alternes, composées ou entières, généralement pétiolées. Les fleurs ont 5 sépales soudés qui forment une corolle en étoile ou en tube (Ganaie *et al.*,2018).

Les fruits sont des capsules (datura, jusquiame, tabac) ou des baies charnues (belladone, piments, solanum divers, withania) renfermant de très nombreuses graines. (Hammiche *et al.*,2013 ;Ganaie *et al.*,2018).

### 1.4 Les métabolites secondaires chez les Solanaceae

La famille des Solanaceae comprenant de nombreuses plantes toxiques et renfermant des drogues importantes (Giorgetti & Negri.,2011). De 60 à 70% des espèces produisent de différents types d'alcaloïdes plus ou moins actifs ou toxiques, qui jouent un rôle important contre les agents pathogènes et les herbivores (Castillo *et al.*,2010).

Les proportions des alcaloïdes majoritaires isolés des espèces de cette famille sont très variables et représentent généralement entre 0.01 à 3%, on peut citer comme exemple

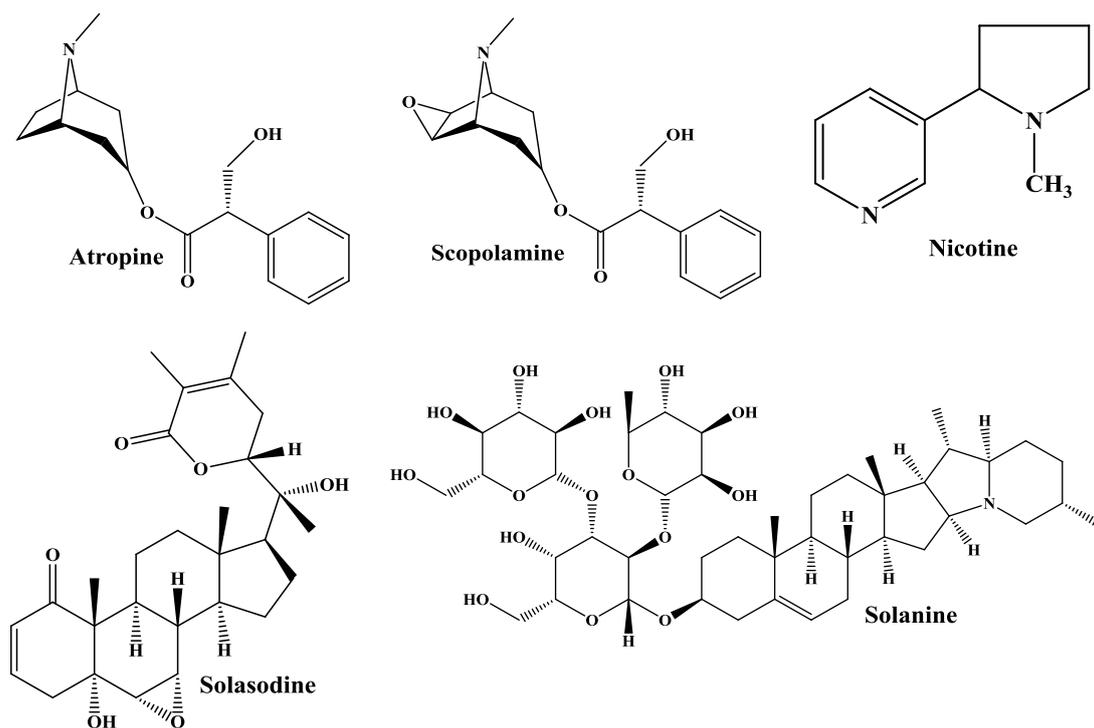
les alcaloïdes issus de l'acide tropique, les alcaloïdes pyridiniques et les alcaloïdes stéroïdiques ou les glycoalcaloïdes (Christen *et al.*,2020).

Les alcaloïdes tropaniques comme la scopolamine et l'atropine sont les plus fréquemment présents dans les espèces des Solanaceae (Hammiche *et al.*,2013) telles que la jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*), la belladone (*Atropa belladonna*), la stramoine (*Datura stramonium*), la mandragore (*Mandragora autumnalis*)(Jouzier., 2005 ; Pomilio *et al.*,2008 ; Chowański *et al.*,2016).

Le **tableau I.1.** présente quelques exemples des alcaloïdes biologiquement actifs isolés de la famille des Solanaceae.

**Tableau I.1.** Exemples des alcaloïdes biologiquement actifs isolés de la famille des Solanaceae

<b>Alcaloïdes (type)</b>	<b>Propriétés biologiques</b>	<b>Références</b>
<b>Atropine</b> (Tropanique)	Mydriatiques ;antiémétiques;antimypopie antispasmodiques ;anesthésiques ; anticholinergique.	Giorgetti&Negri.,2011 ; Kabera <i>et al.</i> ,2014 ; Debnath <i>et al.</i> ,2018
<b>Scopolamine</b> (Tropanique)	Effect sédatif, antiémétique et amnésique.	Debnath <i>et al.</i> ,2018
<b>Nicotine</b> (Pyridine)	Stimulants, antiherbivore, insecticide, anti-inflammatoire et anticancéreux.	Debnath <i>et al.</i> ,2018 ; Chirchir <i>et al.</i> ,2018.
<b>Solanine</b> (Steroïdique)	Antifongiques, antipesticide, sédatif, antiépileptique, anticancérigène, anti-inflammatoire.	Marciniak <i>et al.</i> ,2019 ; Gutiérrez-Grijalva <i>et al.</i> ,2020
<b>Solasodine</b> (Steroïdique)	Diurétique, anticancéreux, antifongique, cardiotonique, antispermatoogénétique, antiandrogénique, immunomodulateur, antipyrétique.	Patel <i>et al.</i> ,2013

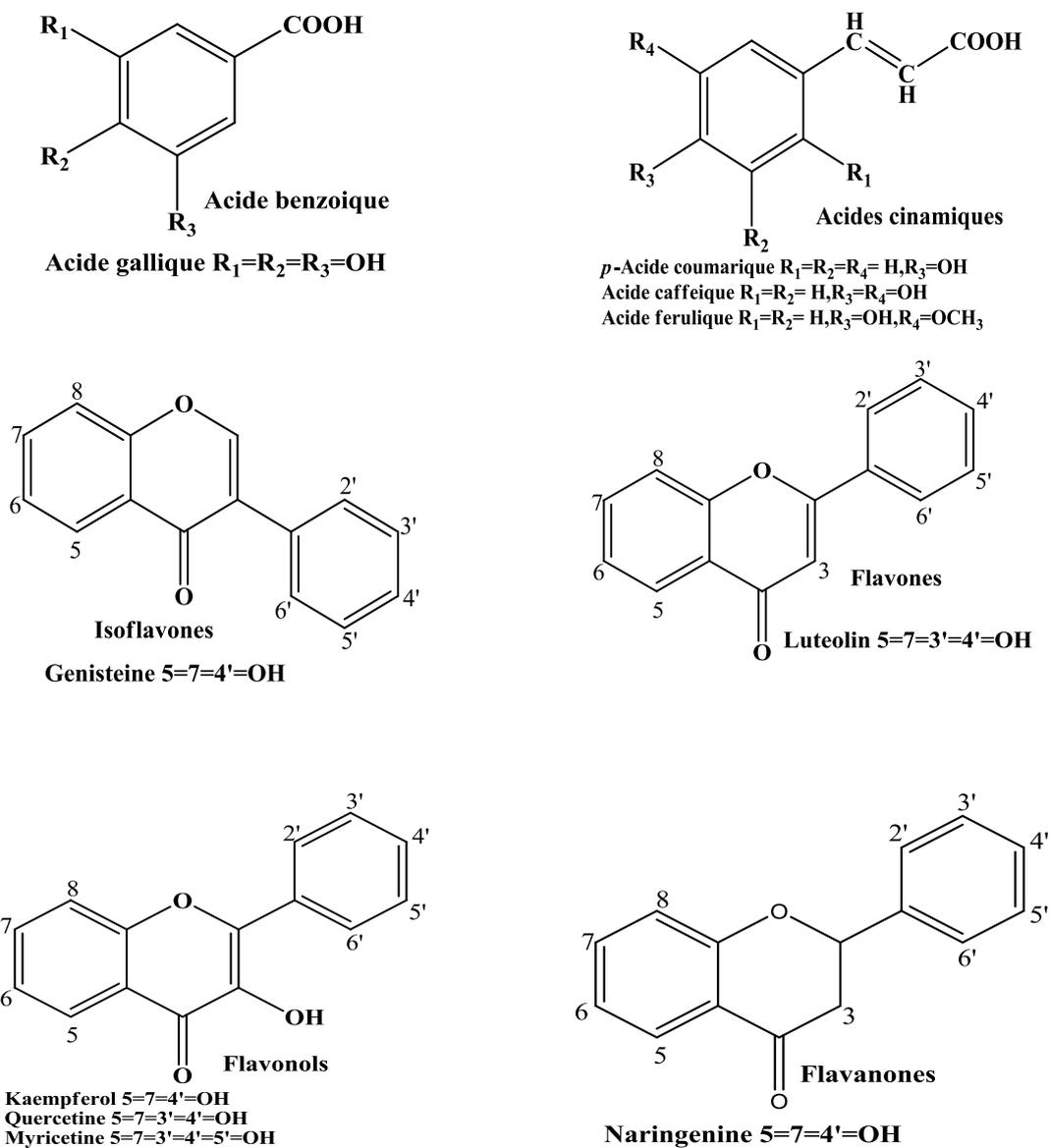


**Figure I.2.** Exemples des alcaloïdes isolés des Solanaceae

L'utilisation de ces espèces en alimentation est due à leurs richesses en polyphénols (Helmja *et al.*, 2007), par exemple :

- La tomate (*Solanum lycopersicum*) est riche en composés phénoliques (flavonoïdes, flavones, dérivés de l'acide cinnamique), glycoalcaloïdes, caroténoïdes (lycopène et  $\beta$ -carotène), vitamines C et E.
- Les principaux polyphénols présents dans l'aubergine (*Solanum meloena*) sont les acides phénoliques (acide chlorogénique, acide caféique et l'acide *p*-coumarique), vitamines C et B et les anthocyanes.
- Les flavones (lutéoline), les flavonols (myricétine, quercétine) et les capsaïcinoïdes sont les plus rencontrés dans l'espèce *Capsicum annuum* (le piment rouge)
- L'acide chlorogénique et caféique, la catéchine et aussi les glycoalcaloïdes plus la vitamine C ont été signalés comme étant les principaux composés présents dans la pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

On y trouve également des flavonoïdes, des tanins, des acides phénoliques et des stéroïdes (Giorgetti & Negri .,2011) (**Figure I.3.**)



**Figure I.3.** Exemples des composés polyphénoliques isolés des Solanaceae (Helmja *et al.*, 2007)

## 1.5 Importance des Solanaceae

D'après la littérature les espèces de la famille des Solanaceae sont utilisées en production alimentaires, en médecine et comme drogues (Chowański *et al.*,2016).

- Sur le plan alimentaire, Cette famille comprend des espèces alimentaires d'une grande importance économique telles que la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), la tomate (*Solanum lycopersicum L.*), l'aubergine (*Solanum melongena L.*) et les piments (*Capsicum spp.*)(Pomilio *et al.*,2008 ;Chowański *et al.*,2016 ; Bikandu *et al.*,2021)
- Sur le plan médical, certaines espèces riches en alcaloïdes, sont mondialement connues pour leurs usages médicaux, leurs effets psychotropes ou pour leur toxicité, notamment la belladone (*Atropa belladonna L.*), la morelle (*Solanum nigrum L.*), le Brugmansia (*Brugmansia spp*), le mandragore (*Mandragora officinarum L.*) et le tabac (*Nicotiana tabacum L.*) (Bikandu *et al.* ,2021).
- Sur le plan pharmaceutique, de nombreuses plantes appartenant à la famille des Solanaceae ont été utilisées comme source des produits pharmaceutiques pendant des siècles en raison de la présence de tropane et de la nicotine, comme principes actifs (Giorgetti & Negri.,2011).
- En médecine traditionnelle, les fruits de *Solanum maunse* sont utilisés pour leurs propriétés antibactériennes et anticancéreuses. Au Kenya la décoction des graines moulues est utilisée pour traiter la tuberculose et les douleurs de la poitrine. (Chirchir *et al.*,2018) . En médecine traditionnelle Rwandaise, les fruits de *Solanum* sont employés pour traiter la blennorrhagie, alors que les feuilles sont utilisées pour soigner les hémorroïdes et comme émétique (Jouzier., 2005).
- Sur le plan ornemental, certaines espèces des Solanaceae à l'image de *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* et *Brugmansia* sont souvent des xénophytes subspontanées des jardins (Chelghoum *et al.*, 2020 ; Bikandu *et al.*,2021)

## 2 Présentation du genre : *Nicotiana*

### 2.1 Généralité

Le genre *Nicotiana* (Tabac) a été nommé en hommage à Jean Nicot, ambassadeur au Portugal, qui en 1565, a envoyé cette plante à la Cour de Catherine de Médicis qui l'adopte pour soulager ses fréquents maux de tête (Jouzier., 2005 ; Jassbi *et al.*,2017). Ce genre était initialement divisée en trois sous-genres et 14 sections avec plus de 75 espèces (Long *et al.*,2016).

Un grand nombre d'espèces de ce genre possèdent un intérêt majeur sur le plan alimentaire et sur le plan économique. De toutes les espèces, seule *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana rustica* poussent dans le monde entier. Les espèces de ce genre se retrouvent également à l'état sauvage (Long *et al.*,2016).

### 2.2 Description botanique du genre *Nicotiana*

Les espèces du genre *Nicotiana* sont des plantes annuelles ou vivaces (*N. linearis* Phil ; *N. plumbaginifolia* Viv) des arbustes et des petits arbres (*N. tomento* sa Ruiz et Pav., *N. wigandioides* Koch et Fintelm) originaires des régions tropicales (Knapp.,2020). Ces plantes peuvent se révéler très toxiques (Soulimane.,2014).

- **Leurs feuilles** sont disposées de façon alterne. Leur forme est ovale, leur contour est entier et leur nervation pennée. Elles sont grandes, pouvant atteindre une longueur de 1 mètre pour une largeur de 50 centimètres, duveteuses et charnues.
- **Leurs fleurs** en forme de trompette sont tubulaires, allongées et resserrées à la base. Elles sont réunies en grandes panicules terminales. Elles sont de couleur verte, blanche, rose ou jaune (Knapp.,2020).
- **Leurs fruits** sont des capsules déhiscentes de forme le plus souvent ovoïde.

## 2.3 Les métabolites secondaires du genre *Nicotiana*

Les espèces du genre *Nicotiana* sont connues pour leurs richesses en différentes classes de composés naturels, plus de 25000 composés ont été identifiés dont les plus isolés sont les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes (Jassbi *et al.*,2017). L'espèce la plus étudiée est *N. tabacum* (Tobacco), les composés isolés de cette espèce appartenant aux différentes classes des composés chimiques.

### 2.3.1 Les alcaloïdes

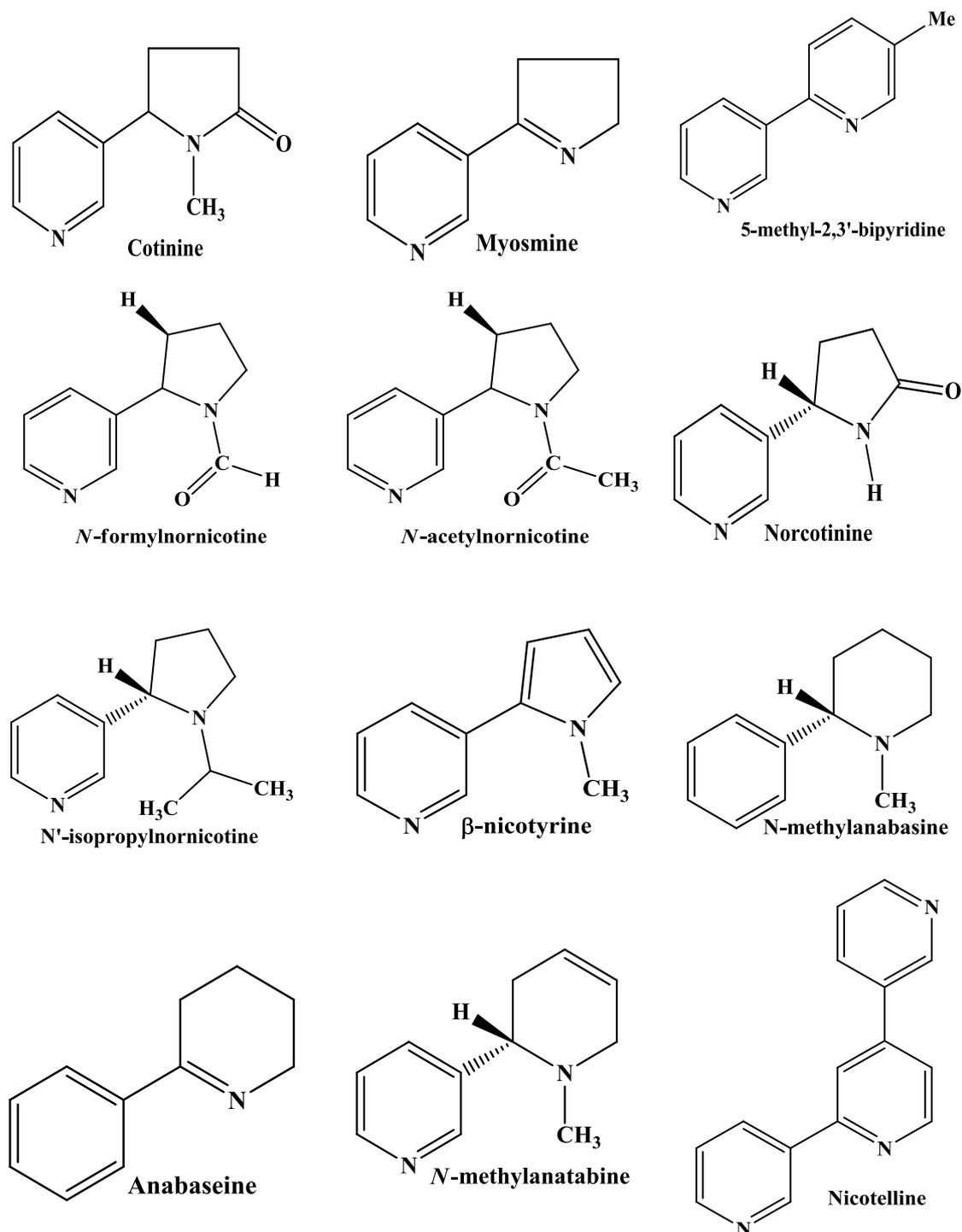
Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées et basiques, qui dérivent des acides aminés (Calatayud *et al.*,2013 ;Yinyang *et al.*,2014). Ils sont distribués de façon spécifique en fonction du statut taxonomique des plantes. Ils sont surtout présents chez les Angiospermes (plantes à fleurs) et rarement rencontrés chez les Gymnospermes (les conifères) et les Cryptogames (les fougères)(Calatayud *et al.*,2013).

Les alcaloïdes représentent un groupe important qui possède diverses activités biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques et alimentaires, telles que l'activité antiplasmodiale, antispasmodique et anticancéreuses. Leurs effets laxatif anti-rhumatismal, antalgique et analgésique ont aussi été révélés (Yinyang *et al.*,2014).

Les espèces du genre *Nicotiana* sont caractérisées par la présence d'alcaloïdes pyridiniques dans les tissus des feuilles et des racines, les plus abondants étant la nicotine, la nor nicotine, l'anabasine, l'anatabine (Furer *et al.*,2011) (Rinez *et al.*,2011 ; Jassbi *et al.*,2017) la cotinine, la myosmine qui ont été identifiés dans 60 espèces *Nicotiana* (Kaminski *et al.*,2020).

Il est important de noter que la nicotine est le constituant principal isolé de la moitié des espèces de ce genre alors que la nor nicotine est l'alcaloïde majoritaire le plus rencontré chez 30 à 40% des espèces *Nicotiana*. Les autres squelettes des alcaloïdes sont présents en quantité minoritaires (moins de 50µg/g de poids sec) ou en quantités nanométriques (Crooks.,1999).

Les structures des alcaloïdes isolées des espèces *Nicotiana* sont présentées dans la figure ci-après (**Figure I.4**)



**Figure I.4.** Exemples des alcaloïdes isolés du genre *Nicotiana*

Chez les espèces *Nicotiana*, les alcaloïdes sont utilisés comme un mécanisme de défense chimique contre les pathogènes et les herbivores. La nicotine et les alcaloïdes pyridiniques apparentés sont synthétisés dans la racine puis transportés vers les parties aériennes de la plante (Long *et al.*, 2016).

### 2.3.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés issus du métabolisme secondaire des végétaux et caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure (Amiot *et al.*,2009).

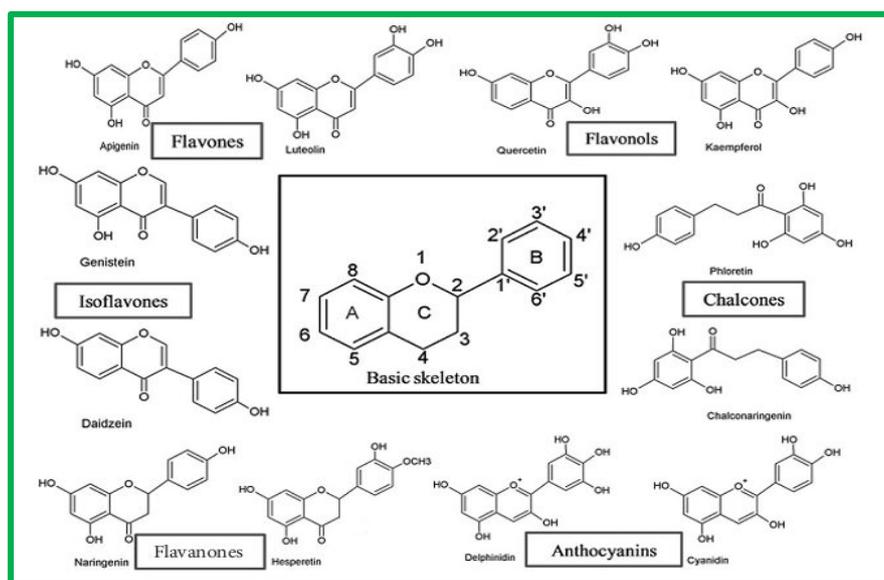
Le genre *Nicotiana* contient de nombreux types des polyphénols, dont les flavonoïdes et les acides phénoliques sont les structures les plus abondants (Nugroho & Verpoorte.,2002).

#### 2.3.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus vaste des polyphénols et le plus largement distribué dans le règne végétal. Plus de 4 000 flavonoïdes différents ont été identifiés (Amiot *et al.*,2009 ;Massaux.,2012).

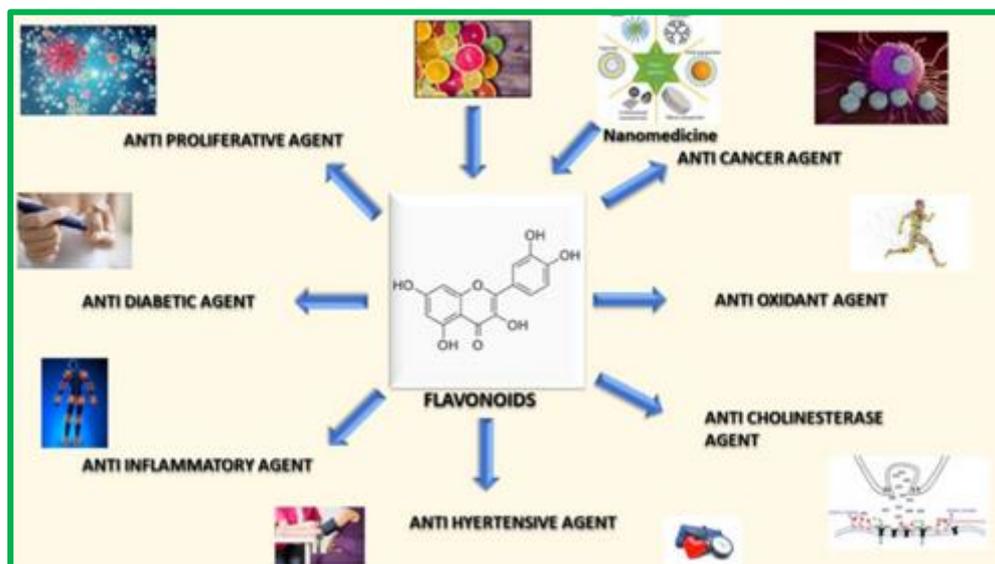
Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatique (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone (**Figure I.5.**) (Chira *et al.*, 2008 ;Chávez-González *et al.*,2020) , ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Stoclet & Schini-Kerth.,2011).

Tous les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette de base (Ghedira.,2005 ; Chávez-González *et al.*,2020).



**Figure I.5.** Structures des principales classes des flavonoïdes (Panche *et al.*,2016)

Les flavonoïdes sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boisson. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Ils possèdent diverses potentialités thérapeutiques telles que les propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, antidiabétique, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et antitumorales (**Figure I.6.**) (Ghedira.,2005 ; Li *et al.*,2018 ; Chávez-González *et al.*,2020 ; Dias *et al.*,2021).



**Figure I.6.** Propriétés biologiques des flavonoïdes (Mondal *et al.*,2020)

D'après la littérature on constate que la pluparts des flavonoides isolés du genre *Nicotiana* appartiennent à la classe des flavones, flavonols et leurs dérivés O- et C-glycosylés.

- **Les flavones**

L'apigénine et la lutéoline sont les plus rencontrés dans le genre *Nicotiana*. Récemment, quatre flavones ont été isolés pour la première fois de l'extrait méthanolique des feuilles de *Nicotiana plumbaginifolia* : 3,5,6,7,8,3',4',5' octaméthoxyflavone [5]; 3,5,6,7,8,3'-hexaméthoxy-4',5' méthylènedioxyflavone [8]; 6,7,4',5' diméthylènedioxy-3,5,3'-triméthoxyflavone [9] et 3,5,8,3',4',5' hexaméthoxy 6,7-méthylènedioxyflavone [10] (Shajob *et al.*,2017).

Le Tableau ci-dessous présente les principales structures des flavones isolés du genre *Nicotiana*.

**Tableau I.2.** Les flavones isolés du genre *Nicotiana*

Flavonoïdes isolés	Espèces	Références
Apigénine [1]	<i>N.tabacum</i> / <i>N.alata/N.rustica</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017 ; Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al</i> <i>.</i> ,2019
Lutéoline [2]		
5,7-dihydroxy-6-méthyl -2'-méthoxyflavone [3]	<i>N.tabacum</i>	Shang <i>et al.</i> ,2019
5-hydroxy-6-méthyl-7,2'-diméthoxyflavone [4]		
3,5,6,7,8,3',4',5'-octaméthoxyflavone [5]	<i>N.plumbaginifolia</i>	Shajob <i>et al.</i> ,2017 ; Shajib <i>et al.</i> ,2018
7- méthoxy apigénine [6]	<i>N. debneyi</i>	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005
7,3'-diméthoxy lutéoline [7]		
3,5,6,7,8,3'-hexaméthoxy-4',5'- méthylènedioxyflavone [8]	<i>N.plumbaginifolia</i>	Shajob <i>et al.</i> ,2017 ; Shajib <i>et al.</i> ,2018
6,7,4',5'-diméthylènedioxy-3,5,3'- triméthoxyflavone [9]		
3, 5, 8,3',4',5'-hexaméthoxy-6,7- méthylènedioxyflavone [10]		
5-hydroxy-3, 6,7,8,3'-pentaméthoxy-4',5'- méthylènedioxyflavone [11]	<i>N.plumbaginifolia</i>	Shajib <i>et al.</i> ,2018

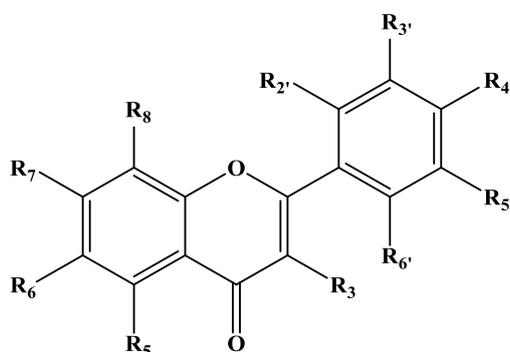
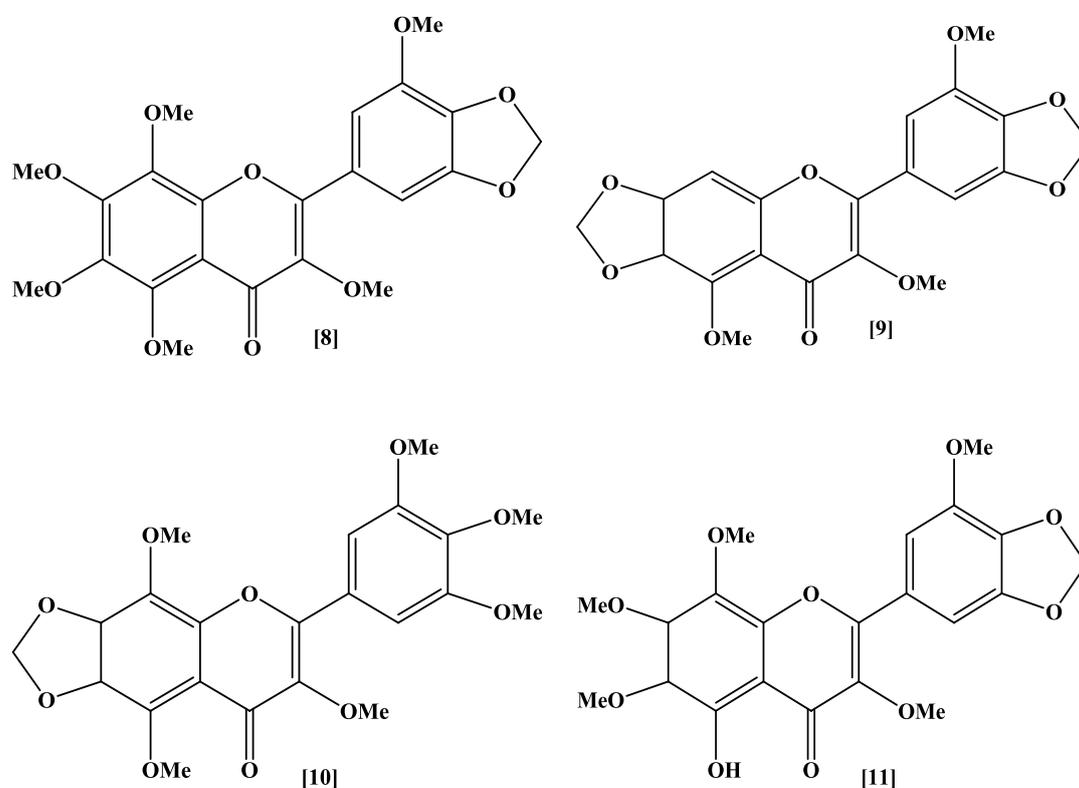


Tableau I.3. Structures des flavones isolés du genre *Nicotiana*

Structure	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>2'</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>	R <sub>6'</sub>
[1]	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
[2]	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
[3]	H	OH	Me	OH	H	OMe	H	H	H	H
[4]	H	OH	Me	OMe	H	OMe	H	H	H	H
[5]	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	OMe	H
[6]	H	OH	H	OMe	H	H	H	OH	H	H
[7]	H	OH	H	OMe	H	H	OMe	OH	H	H

Figure I.7. Les structures des flavones isolés du genre *Nicotiana*

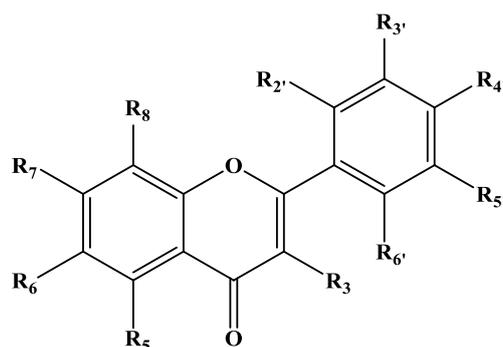
- Les flavonols

Une étude phytochimique réalisée sur les fleurs de 66 espèces de *Nicotiana* a permis d'isoler une seule classe des flavonoïdes il s'agit des flavonols. Les résultats de cette étude indiquent que les flavonols isolés des fleurs présentent une grande diversité structurale par rapport aux flavonols isolés des feuilles. Le squelette des flavonols de

type quercétine et kaempférol méthoxylés sont les marqueurs chimiotaxonomiques de ce genre (**Tableau I.4.**) (Nugroho & Verpoorte .,2002).

**Tableau I.4.** Les flavonoles aglycones isolés du genre *Nicotiana*

Structure	Espèces	Références
Quercétine [12]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. solanifolia</i> / <i>N. glutinosa</i> / <i>N. undulata</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. alata</i> / <i>N. rustica</i>	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005 ; Jassbi <i>et al.</i> ,2017 ; Popova <i>et al.</i> ,2017;Popova <i>et</i> <i>al.</i> ,2019
3-méthoxy quercétine [13]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. solanifolia</i> / <i>N. rustica</i> / <i>N. glutinosa</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. undulata</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. acuminata</i> .	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005
3'-méthoxy quercétine [14]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. knightiana</i> / <i>N. solanifolia</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. undulata</i> .	
3,3'-diméthoxy quercétine [15]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. rustica</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. acuminata</i> / <i>N. debneyi</i> .	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005
3,7-diméthoxy quercétine [16]	<i>N. glutinosa</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. debneyi</i> .	
7,3'-diméthoxy quercétine [17]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. knightiana</i> / <i>N. glutinosa</i>	
7-méthoxy quercétine [18]	<i>N. trigonophylla</i>	
3,7,3'-triméthoxy quercétine [19]	<i>N. paniculata</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. debneyi</i> .	
3,7,4'-triméthoxy quercétine [20]	<i>N. glutinosa</i>	
3,7,3',4'-tétraméthoxy quercétine [21]	<i>N. paniculata</i> .	
3,6,3'-triméthoxy quercétagétine [22]	<i>N. benthamiana</i>	
Kaempférol [23]	<i>N. glutinosa</i> / <i>N. tabacum</i> / <i>N. alata</i> / <i>N. rustica</i>	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005; Jassbi <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et</i> <i>al.</i> ,2019
3-méthoxy kaempférol [24]	<i>N. tabacum</i> / <i>N. acuminata</i> / <i>N. debneyi</i> .	Wollenweber <i>et al.</i> ,2005
7-méthoxy kaempférol [25]	<i>N. glutinosa</i> / <i>N. trigonophylla</i> .	
3,7-diméthoxy kaempférol [26]	<i>N. glutinosa</i> / <i>N. trigonophylla</i> / <i>N. debneyi</i>	
3,4'-diméthoxy kaempférol [27]	<i>N. benthamiana</i>	
7,4'-diméthoxy kaempférol [28]	<i>N. glutinosa</i> / <i>N. benthamiana</i> .	
3,7,4'-triméthoxy kaempférol [29]		
Myricétine [30]	<i>N. tabacum</i> / <i>N. alata</i> / <i>N. rustica</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et</i> <i>al.</i> ,2019



**Tableau I.5.** Les structures des flavonoles aglycones isolés du genre *Nicotiana*

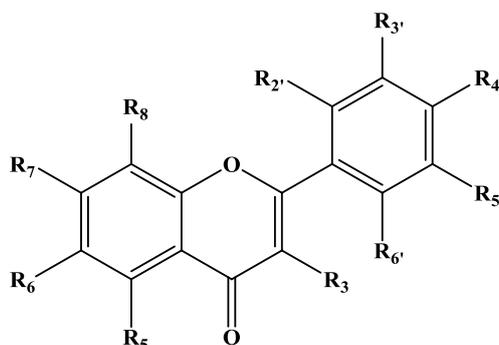
Structure	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
[12]	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[13]	OMe	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[14]	OH	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
[15]	OMe	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
[16]	OMe	OH	H	OMe	H	OH	OH	H
[17]	OH	OH	H	OMe	H	OMe	OH	H
[18]	OH	OH	H	OMe	H	OH	OH	H
[19]	OMe	OH	H	OMe	H	OMe	OH	H
[20]	OMe	OH	H	OMe	H	OH	OMe	H
[21]	OMe	OH	H	OMe	H	OMe	OMe	H
[22]	OMe	OH	OMe	OH	H	OMe	OH	OH
[23]	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
[24]	OMe	OH	H	OH	H	H	OH	H
[25]	OH	OH	H	OMe	H	H	OH	H
[26]	OMe	OH	H	OMe	H	H	OH	H
[27]	OMe	OH	H	OH	H	H	OMe	H
[28]	OH	OH	H	OMe	H	H	OMe	H
[29]	OMe	OH	H	OMe	H	H	OMe	H
[30]	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH

D'après la littérature les flavonols comme la quercétine et le kaempférol-*O*-glycosylés sont les plus fréquemment rencontrés dans le genre *Nicotiana*. On peut citer comme exemple la Quercétine -3-*O*-rutinoside [31], le Kaempférol-3-*O*-rutinoside [32] et la Quercétine -3-*O*-galactoside [33] qui ont été isolés de l'extrait éthanolique des feuilles

de trois espèces *Nicotiana* (*N.tabacum* ; *N.alata* et *N.rustica*) (**Tableau I.6.**) (Jassbi et al.,2017 ; Popova et al.,2017; Popova et al.,2019)

**Tableau I.6.** Les flavonoles glycosylés isolés du genre *Nicotiana*

Flavonoïdes	Espèces	Références
Quercétine -3-O- $\alpha$ -D-rutinoside [31]	<i>N.tabacum</i> / <i>N.alata</i> / <i>N.rustica</i>	Jassbi et al.,2017 ; Popova et al.,2017; Popova et al.,2019
Kaempférol-3- O- $\beta$ -rutinoside [32]		
Quercétine -3-O- $\beta$ -D-galactoside [33]		
Kaempférol-3-O- $\beta$ -D -glucoside [34]	<i>N.tabacum</i>	Jassbi et al.,2017
Kaempférol-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside [35]		
Quercétine-3- O - $\beta$ - D -glucoside [36]		
Quercétine-3- O - $\beta$ - D -galactopyranoside [37]		
Diosmétine-7-rutinoside [38]		



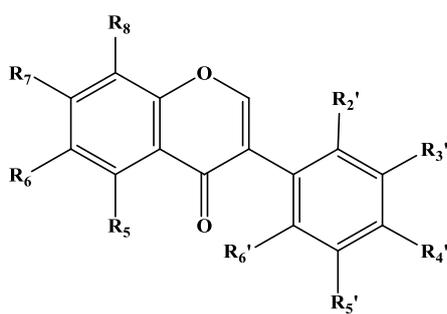
**Tableau I.7.** Les structures des flavonoles glycosylés isolés du genre *Nicotiana*

Structure	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
[31]	O-rutinoside	OH	H	OH	H	H	OH	OH
[32]	O-rutinoside	OH	H	OH	H	H	OH	H
[33]	O- galactoside	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[34]	O-glucoside	OH	H	OH	H	H	OH	H
[35]	O- galactopyranoside	OH	H	OH	H	H	OH	H
[36]	O-glucoside	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[37]	O- galactopyranoside	OH	H	OH	H	OH	OH	H
[38]	H	OH	H	O-rutinoside	H	H	OMe	OH

Une étude réalisé sur l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *N.tabacum* a conduit à l'identification de 3 isoflavones :

4',8-dihydroxy-6,7-diméthoxyisoflavone [39], 4',6-dihydroxy-8- méthoxycarbonyl-7-méthoxyisoflavone [40] et 4',7-diméthoxy-8-hydroxyméthyl-6-hydroxyisoflavone [41] qui ont montré une activité anti-TMV (Tobacco Mosaic Virus) à une concentration de 20 µM avec des taux d'inhibition de 25.2%, 22.6% et 27.4%, respectivement (Jassbi *et al.*,2017).Le tableau ci-dessous présente les isoflavonoïdes isolés de *N.tabacum*

**Tableau I.8.** Les isoflavonoides isolés de *N.tabacum*

4',8-dihydroxy-6,7-diméthoxyisoflavone [39]	
4',6-dihydroxy-8- méthoxycarbonyl-7-méthoxyisoflavone [40]	
4',7-diméthoxy-8-hydroxyméthyl-6-hydroxyisoflavone [41]	
7-hydroxy-3',4',5',6-tétraméthoxy-isoflavone [42]	
Genistein [43]	
2',4',5',6,7-pentaméthoxyisoflavone [44]	
7-hydroxy-6,3',4',5'-tétraméthoxy-isoflavone [45]	
6-hydroxy-7,3',4',5'-tétraméthoxy-isoflavone [46]	
Irigénine [47] ; Glycitéine [48] 8-hydroxyglycitéine [49]	
2',3',4',6,7-pentaméthoxyisoflavone [50]	
3',4',5'-trihydroxyl-5,7-diméthoxyl-isoflavonoid [51]	
4',6-dihydroxy-7,8-diméthoxyisoflavone [52]	

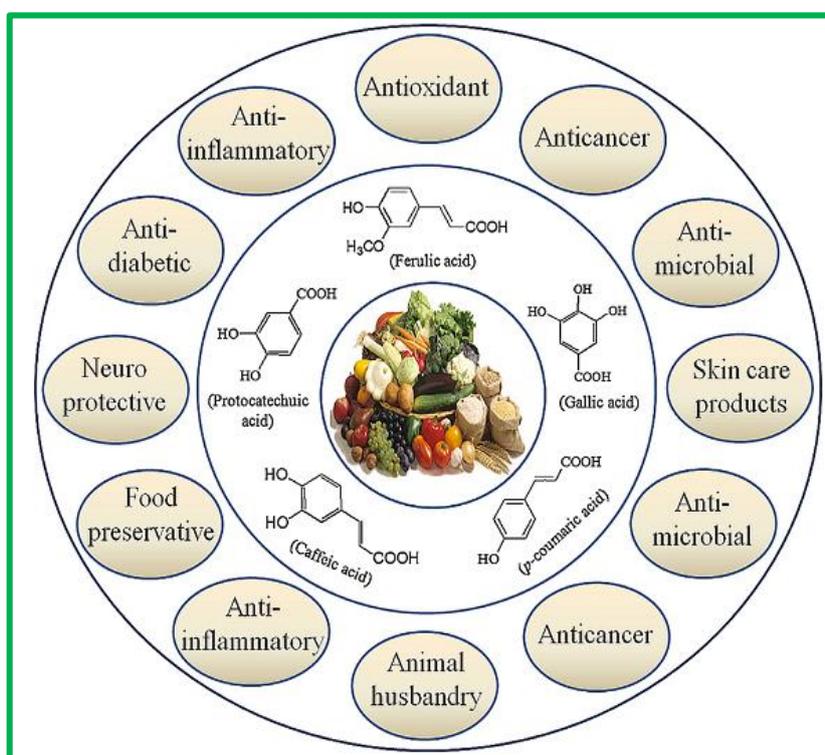
**Tableau I.9.** Les structures des isoflavonoides isolés de *N.tabacum*

Structure	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	R <sub>4</sub> '	R <sub>5</sub> '	R <sub>6</sub> '
[39]	H	OMe	OMe	OH	H	H	OH	H	H
[40]	H	OH	OMe	COOMe	H	H	OH	H	H
[41]	H	OH	OMe	CH <sub>2</sub> OH	H	H	OMe	H	H
[42]	H	OMe	OH	H	H	OMe	OMe	OMe	H
[43]	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
[44]	H	OMe	OMe	H	OMe	H	OMe	OMe	H
[45]	H	OMe	OH	OMe	H	OMe	OMe	H	H
[46]	H	OH	OMe	H	H	OMe	OMe	OMe	H
[47]	OH	OMe	OH	H	H	OMe	OMe	OH	H
[48]	H	Me	OH	H	H	H	OH	H	H
[49]	H	OMe	OH	OH	H	H	OH	H	H
[50]	H	OMe	OMe	H	OMe	OMe	OMe	H	H
[51]	OMe	H	OMe	H	H	OH	OH	OH	H
[52]	H	OH	OMe	OMe	H	H	OH	H	H

### 2.3.2.2 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont également une classe des composés appartenant aux composés polyphénoliques, qui se trouvent naturellement dans les fruits et les légumes. On distingue deux classes principales des acides phénoliques ; les dérivés de l'acide hydroxy-benzoïque et les dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique (De Araújo *et al.*,2021) .

Les acides phénoliques, possèdent diverses applications et servent d'ancêtre pour les molécules bioactives qui sont régulièrement utilisées en médecine thérapeutique, en cosmétique et en industries alimentaires (**Figure I.8.**) (Kumar & Goel .,2019).



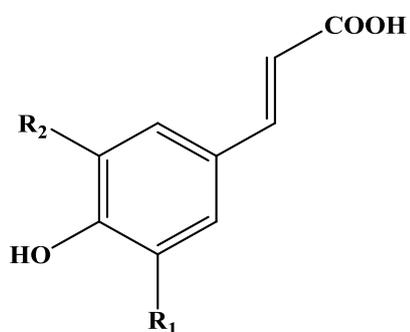
**Figure I.8.** Représentation des différentes applications des acides phénoliques.

Les isomères Caféyl-Quiniques sont des acides phénoliques formé par estérification entre le OH de l'acide quinique et le carboxyle de la chaîne latérale de l'acide caféique. Dans les extraits *Nicotiana* l'acide caféyl-3-quinique [67], l'acide caféyl-4-quinique [68] et l'acide caféyl-5-quinique [69] sont les acides phénoliques les plus abondants. (Zou *et al.*,2021).

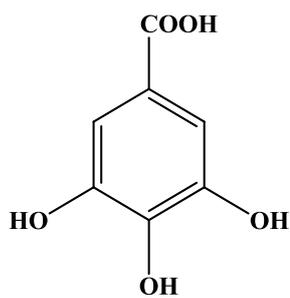
Les acides phénoliques isolés du genre *Nicotiana* sont présentés dans le tableau ci-après:

Tableau I.10. Les acides phénoliques isolés du genre *Nicotiana*

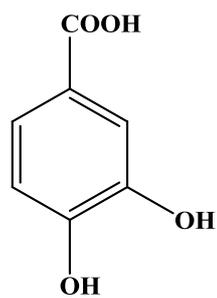
Structures	Espèces	Références
<i>p</i> -coumarique [53]	<i>N.tabacum/N.alata/ N.rustica</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017 ; Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al.</i> ,2019
Acide caféique [54]		
Acide férulique [55]		
Acide sinapique [56]		
Acide gallique [57]	<i>N.tabacum /N.alata/ N.rustica</i>	Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al.</i> ,2019
Acide protocatechique [58]		
Acide salicylique [59]		
Acide-3,4-dihydroxy benzoïque [60]	<i>N.alata</i>	Popova <i>et al.</i> ,2017
Acide-2-hydroxy benzoïque [61]		
Acide-4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque [62]	<i>N.tabacum</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017
Acide syringique [63]	<i>N.tabacum /N.alata / N.rustica</i>	Popova <i>et al.</i> ,2017; Popova <i>et al.</i> ,2019
Acide vanillique [64]		
Acide cinnamique [65]		
Acide rosmarinique [66]		
Acide caféyl-3-quinique [67]		
Acide caféyl-4-quinique [68]		
Acide caféyl-5-quinique [69]	<i>N.tabacum</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017
Nicotphénol A [70]		
Nicotphénol B [71]		
Nicotphénol C [72]		



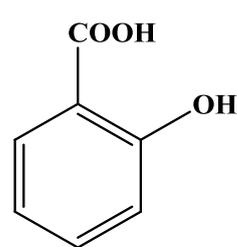
N° de Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
[53]	H	H
[54]	OH	H
[55]	OMe	H
[56]	OMe	OMe



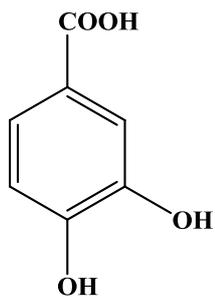
[57]



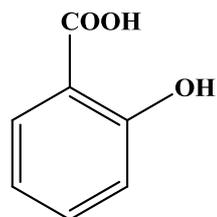
[58]



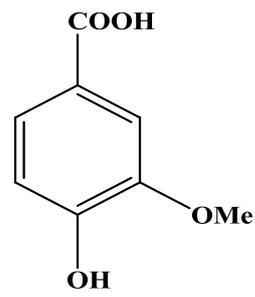
[59]



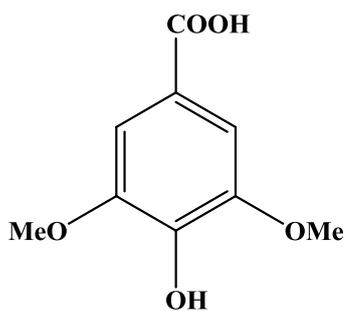
[60]



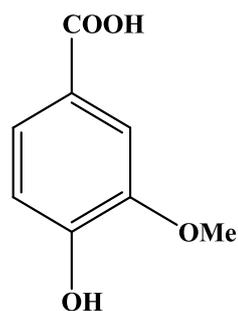
[61]



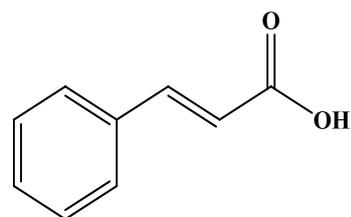
[62]



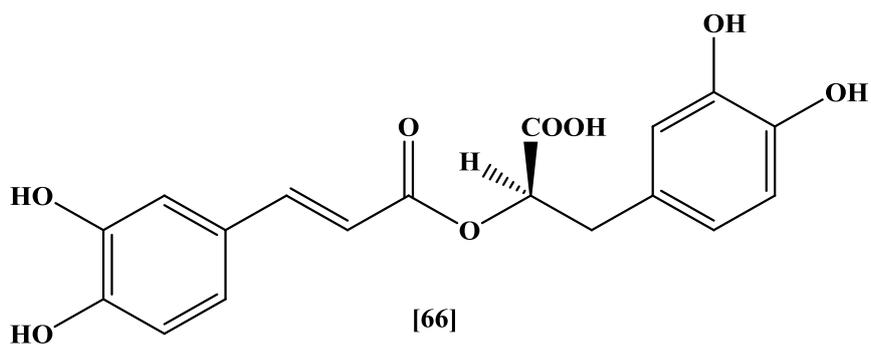
[63]



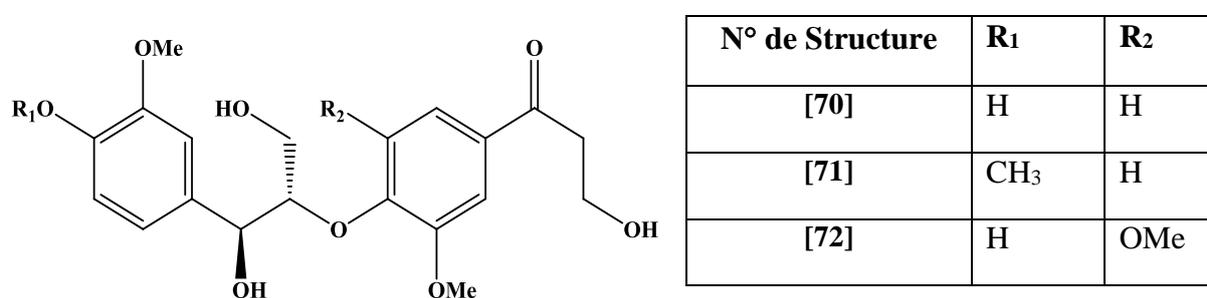
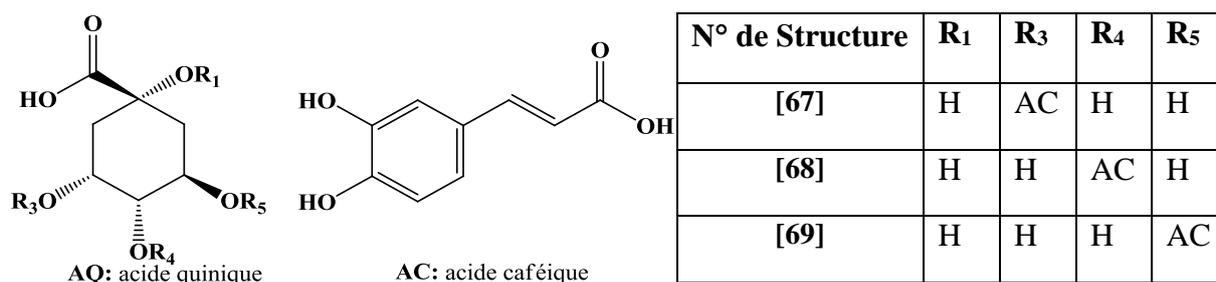
[64]



[65]



[66]



**Figure I.9.** Les Structures des acides phénoliques isolés du genre *Nicotiana*.

### 2.3.2.3 Autres composés

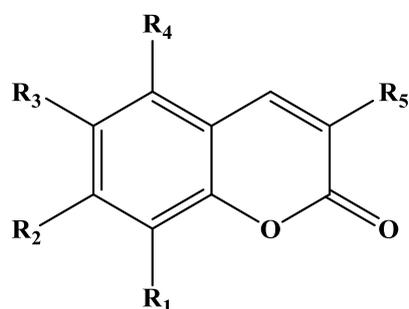
Des études phytochimiques réalisées sur les différentes parties des espèces *Nicotiana* montrent sa richesse en différentes classes de composés naturels (Shang *et al.*, 2019). Plus de 2500 composés ont été identifiés dans l'espèce de *N.tabacum* (l'espèce la plus étudiée) (Yang *et al.*, 2018) et sont principalement de type alcaloïdes et composés phénoliques.

Les Divers métabolites secondaires isolés du genre *Nicotiana* sont présentés dans le **tableau I.11**:

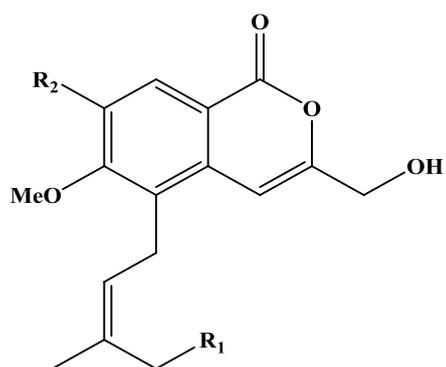
Tableau I.11. Divers métabolites secondaires isolés du genre *Nicotiana*

Type de composés	Le nom du composé	L'espèce	Références
Les coumarines	Esculétine [73]	<i>N.tabacum</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017
	Scopolétine [74]		
	Scopoline [75]		
	Fraxetine [76]		
	Muralatin G [77]		
	Tabaisocoumarine A [78]		
	Tabaisocoumarine D [79]		
	Tabaisocoumarine E [80]		
	Tabaisocoumarine C [81]		
	Décarboxyhydroxycitrine [82]		
Les stérols	Cholestérol [83]	<i>N.suaveolens/</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017
	Campestérol [84]	<i>N.langsdorffii/</i>	
	Stigmastérol [85]	<i>N.tabacum</i>	
	$\beta$ -sistostérol [86]		
	Indioside D [87]		

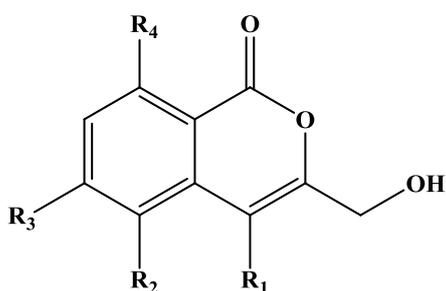
Les caroténoïdes	$\beta$ -carotène [88]	<i>N.tabacum</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017	
	Lutéine [89]			
	Violaxanthine [90]	<i>N.tabacom</i> /	Jassbi <i>et al.</i> ,2017	
	Néoxanthine [91]	<i>N.plumbaginifolia</i>		
	Antheraxanthine [92]	<i>N.plumbaginifolia</i>		
Les triterpènes	Acide Carnosique [93]	<i>N.alata</i> /	Popova <i>et al.</i> ,2019	
	Bétuline [94]			<i>N.rustica</i> /
	Acide bétulinique [95]			<i>N.tabacum</i>
	Acide oléanolique [96]			
	Acide ursolique [97]	<i>N.rustica</i> / <i>N.tabacum</i>	Popova <i>et al.</i> ,2019	
Les lignanes	Nicotnorlignane A [98]	<i>N.tabacom</i>	Jassbi <i>et al.</i> ,2017	
	Nicotnorlignane C [99]			
	Nicotlactone A [100]			
	Séquirine C [101]			



Structures	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
[73]	H	OH	OH	H	H
[74]	H	OH	OMe	H	H
[75]	H	OGlu	OMe	H	H
[76]	H	OMe	OMe	H	H
[77]	CH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>	OMe	H	OMe	H

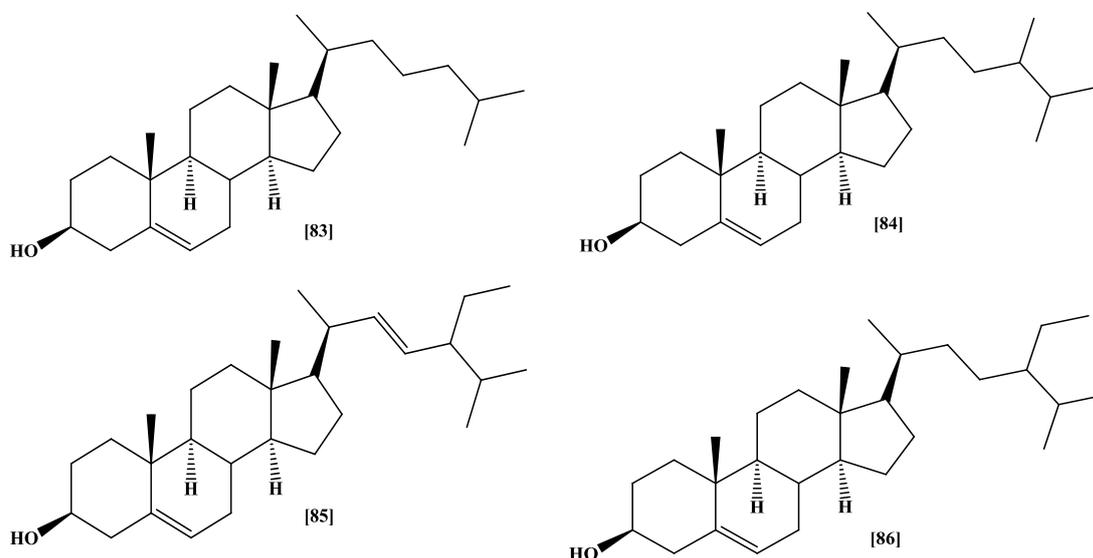


Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
[78]	H	H
[79]	H	OMe
[80]	OH	OMe



Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
[81]	H	CH <sub>2</sub> OH	OMe	H
[82]	Me	Me	OH	OH

Figure I.10. Les Structures des coumarines isolées du genre *Nicotiana*



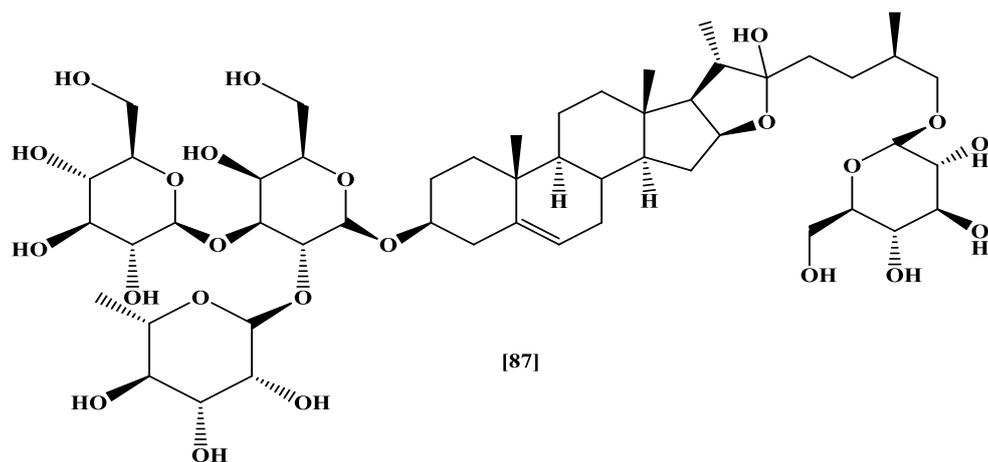


Figure I.11. Les structures des stérols isolés de *Nicotiana*

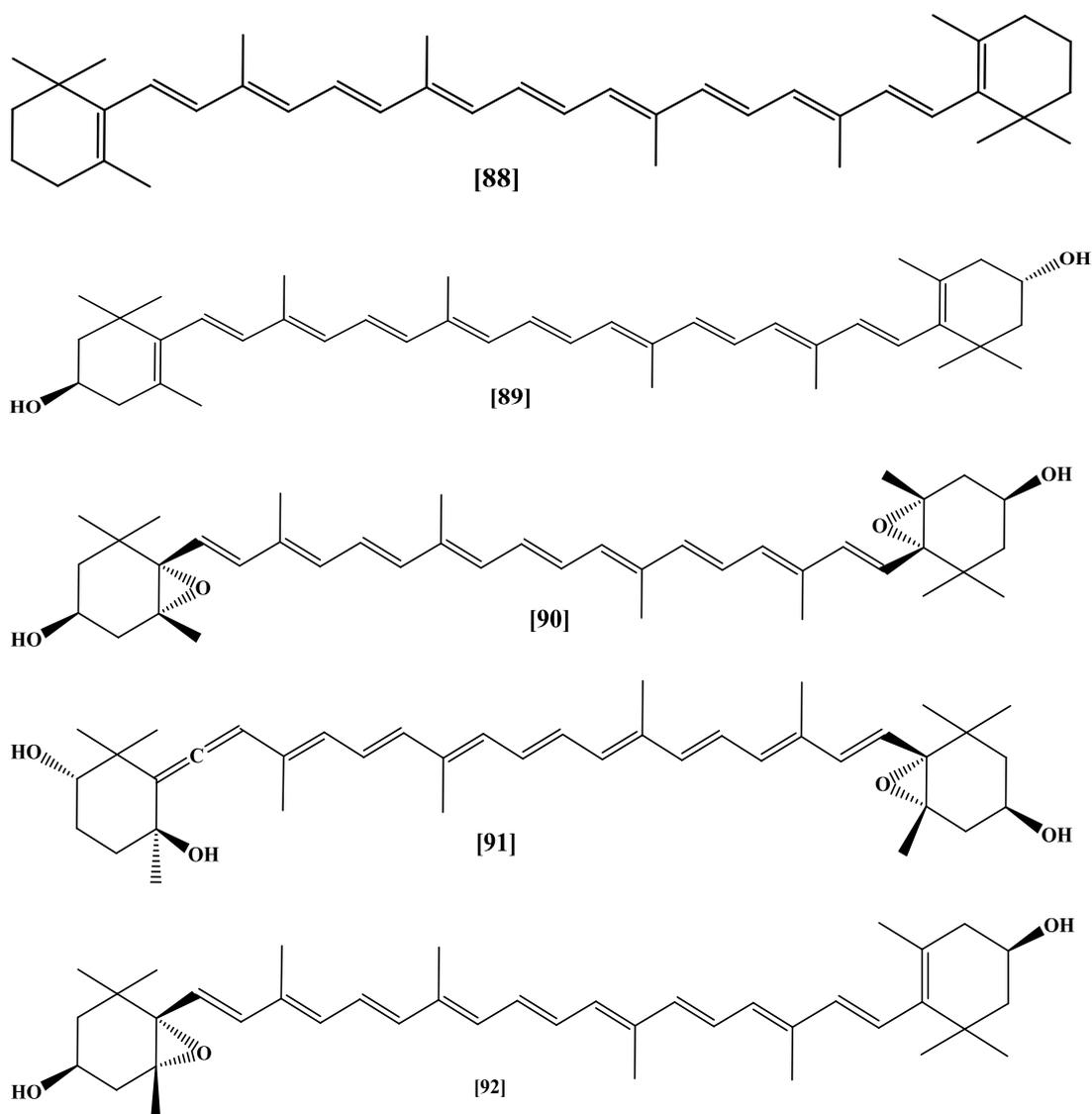


Figure I.12. Les structures des caroténoïdes isolés du genre *Nicotiana*

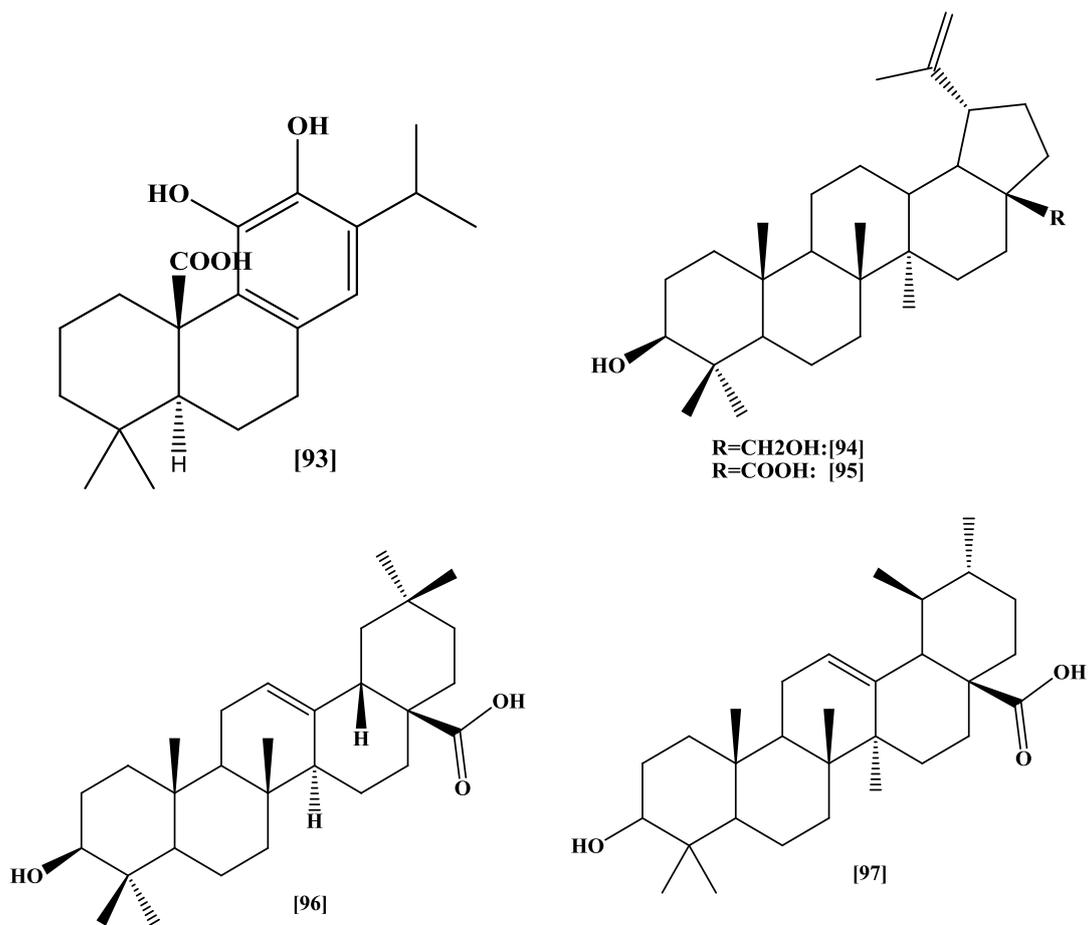


Figure I.13. Les structures des triterpènes isolés du genre *Nicotiana*

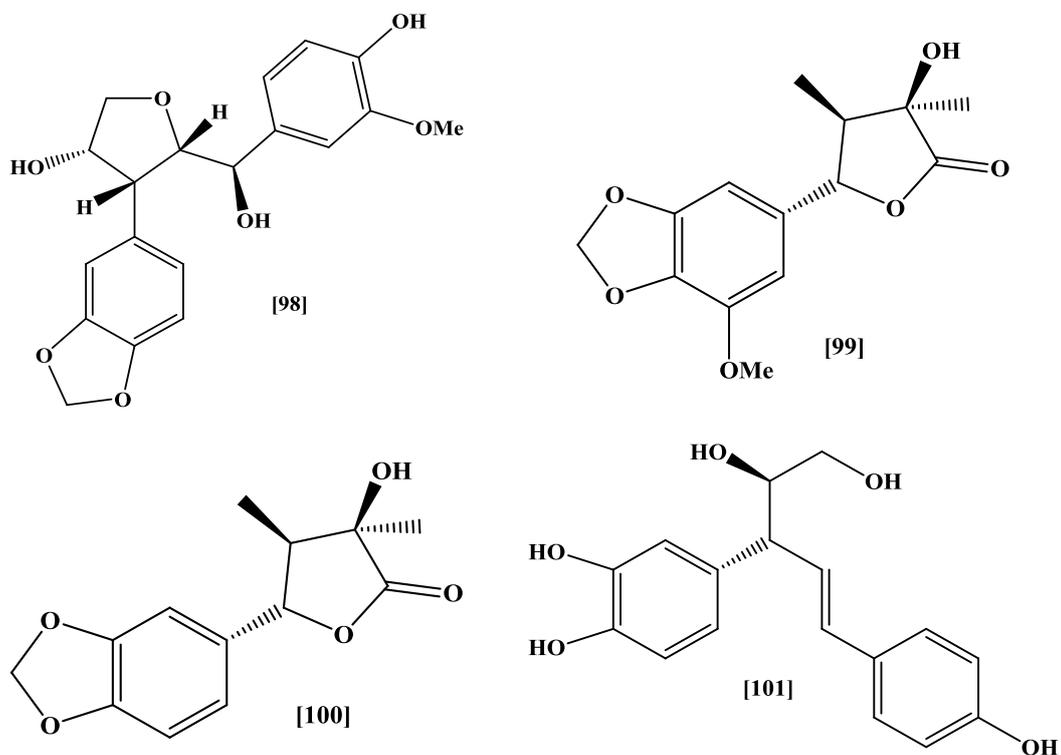
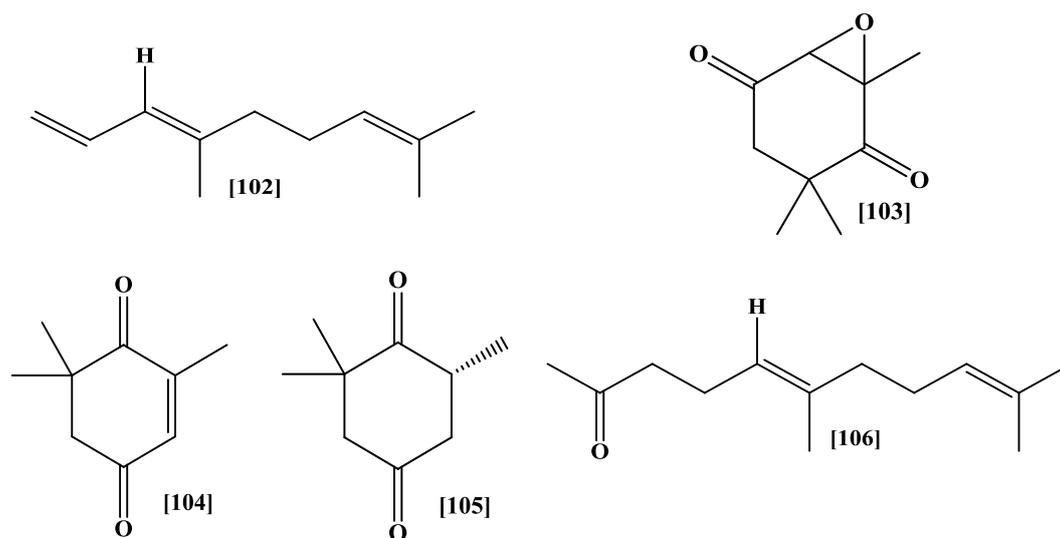


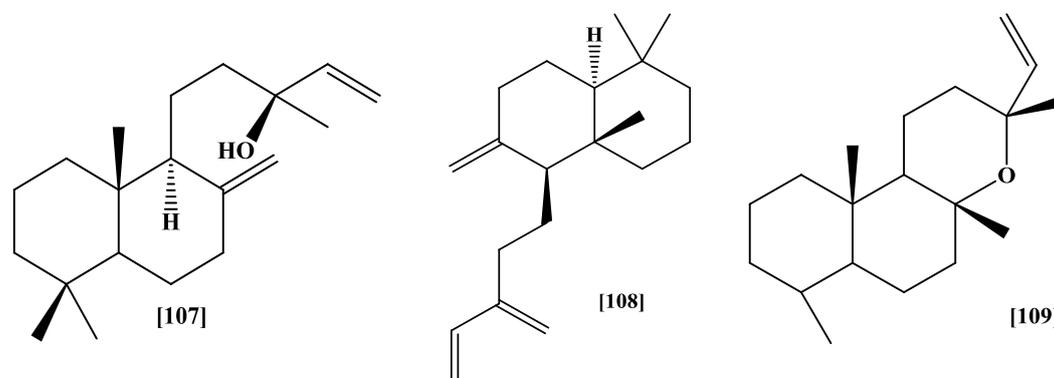
Figure I.14. Les structures des lignanes isolés du genre *Nicotiana*.

Les investigations phytochimiques préalablement entreprises sur les différentes espèces du genre *Nicotiana* ont révélé la présence de 23 monoterpénoides et 27 sesquiterpénoides. Cinq terpénoides ont été isolés comme constituants majoritaires de *N.bonariensis* et *N.rustica* : E-4,8-diméthyl nona-1,3,7-triene [102] , 1,3,3-triméthyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]heptan-2,5-dione [103] , 2,6,6-triméthyl- 2-cyclohexene-1,4-dione [104] , 2,6,6-triméthyl-1,4-cyclo-hexadione [105] , et E-géranylacétone [106] (Zou *et al.*,2021)



**Figure I.15.** Les structures des terpénoides isolés du genre *Nicotiana*

le manool [107], le sclarène [108] et l'oxyde de manoyle [109] sont les squelettes diterpéniques les plus fréquemment présents dans l'espèce *N.glutinosa* (Zou *et al.*,2021).



**Figure I.16.** Structures des diterpènes isolés du genre *Nicotiana*.

## 2.4 Usages traditionnels du genre *Nicotiana*

Les espèces de *Nicotiana* sont très utilisées en médecine traditionnelle dans leurs pays d'origine pour guérir plusieurs maladies (Popova *et al.*, 2020).

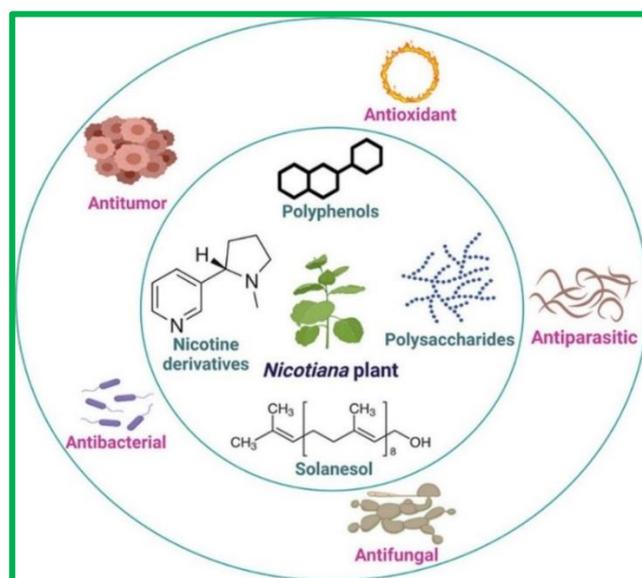
- Les feuilles de *N.rusticas* sont utilisées pour traiter la bronchite, l'amygdalite, les plaies et l'arthrite (Zou *et al.*,2021). L'extrait de cette espèce est également employé comme remède contre les maux de dents et contre les maladies des voies respiratoires (Jouzier., 2005 ;Zou *et al.*,2021).

Les Indiens d'Amérique du Nord utilisaient les feuilles fraîches en cataplasmes contre la douleur (Jouzier., 2005).

- *N.alata* (Tabac d'ornement), cette espèce ornementale est utilisée en élixir floral pour arrêter de fumer (Jouzie., 2005).
- Au Bangladesh *N.plumbaginifolia* est utilisé traditionnellement pour traiter les douleurs dentaires, les hémorroïdes, les plaies, les infections parasitaires de la pyrexie et les inflammations rhumatismales. De plus, les feuilles sont utilisées pour stopper les nausées, comme insecticide et vermifuges (Shajib *et al.*,2018).
- A Madagascar, l'extrait de *N.tabacum* est capable d'arrêter le saignement du nez et guérir la bilharziose, il est également utilisé pour traiter les problèmes d'oreille, les troubles narcotiques et gynécologiques. Les feuilles de *N.tabacum* sont très efficaces pour soigner les troubles du système digestif, les maladies de la peau, la sinusite et les infections de l'estomac (Zou *et al.*,2021).
- *N. tabacum* est traditionnellement utilisé comme : stimulant du système nerveux antispasmodique et vermifuge, antiseptique, antiémétique et narcotique. La décoction de la feuille de *Nicotiana tabacum* est utilisée comme relaxant du muscle et le jus et les extraits sont employés comme insecticides (Diarra.,2021).
- L'espèce la plus connue et la plus importante sur le plan économique est *N.tabacum*, une espèce utilisée pour la production du tabac (Soulimane.,2014).
- Plusieurs espèces de ce genre, telles que *N. alata* et *N. sylvestris*, sont des plantes ornementales (Long *et al.*,2016).

## 2.5 Intérêt pharmacologique du genre *Nicotiana*

Une étude de la littérature récente effectuée sur les activités biologiques des extraits issus de différentes parties des espèces du genre *Nicotiana* a permis de répertorier diverses activités pharmacologiques telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, et antioxydantes (**Figure I.17**). (Zou *et al.*,2021)



**Figure I.17.** Différentes activités biologiques des espèces du genre *Nicotiana*

- **Activité antibactérienne**

Akinpelu & Obuotor.,2000 ont démontré l'existence des propriétés antibactériennes de l'extrait méthanolique des feuilles de *N. tabacum* à une dose de 25mg/mL vis-à-vis les bactéries *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudo -monas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, et *Staphylococcus aureus*.

Une étude récente sur l'activité biologique des extraits hexane et acétone des racines de *N. tabacum* a montré un effet antibactérien très important sur les bactéries *S. aureus* MRSA, *E. faecium*, *E. coli*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *E. floccosum* (Al-Lahham.,2020).

- **Activité antifongique**

Les propriétés insecticides de la nicotine étaient connues depuis longtemps, une étude récente sur les pesticides à base de cette molécule a montré que ces substances sont très actives contre les champignons pathogènes et exercent une faible toxicité pour les plantes. A cette vision, l'effet antifongique de la nicotine a fait l'objet de plusieurs

études et les extraits des plantes *Nicotiana* ont été suggérés comme source des pesticides biologiques (Zou *et al.*,2021). On peut citer comme exemple les extraits obtenus avec différents solvants organiques polaires et apolaires des fleurs de sept espèces de *Nicotiana* cultivés en chine, ont montré une forte activité antifongique sur *Valsa mali* (un micro-organisme causant la pourriture de la pomme) (Popova *et al.*, 2020).

- **Activité antiparasitaires**

Les espèces du genre *Nicotiana* représentent une source importante des alcaloïdes qui possèdent des activités antiparasitaires (Zou *et al.*,2021). Dans ce contexte, l'investigation des potentialités biologiques des plantes *Nicotiana* dans le contrôle des parasites tel que les extraits méthanoliques de *N. glutinosa*, *N. glauca*, *N. debneyi*, et *N. tabacum* a montré que seuls *N. tabacum* et *N. glutinosa*, présentent une activité anthelminthique modérée et repoussent de manière significative les tiques *Rhipicephalus sanguineus* (Weber *et al.*,2019).

- **Activité antioxydante**

Zou *et al.*,2021 ont évalué l'activité antiradicalaire des flavonoïdes et des composés polyphénoliques des espèces du genre *Nicotiana*. Les résultats ont montré que ces composés possèdent la capacité à piéger les radicaux libres : ABTS, DPPH et l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) à une concentration similaire à celle observée avec l'acide ascorbique qui égale à  $600\mu\text{g/mL}$ . Alors que les extraits (hexane, acétone et méthanol) des racines de *N. tabacum* présentent une activité antioxydante significative à des valeurs d' $IC_{50}$  égale à 2,6 et 21  $\mu\text{g/mL}$  respectivement (Al-Lahham *et al.*,2020).

- **Activité antitumorale**

Un test de prolifération cellulaire a été effectué *in vitro* sur une diterpène de type cembranoïde :  $\alpha$ -2,7,11-cyprotermine-4,6-diol ( $\alpha$ -CBD) isolé à partir de l'extrait éthanolique de *N. tabacum* a révélé que cette molécule réduit la formation des clones cellulaires et inhibe la prolifération de carcinome hépatocellulaire. De plus, des observations morphologiques ont montré que  $\alpha$ -CBD modifie la morphologie cellulaire et la perméabilité membranaire avant le processus d'induction de l'apoptose (Yuan *et al.*,2019 ; Zou *et al.*,2021).

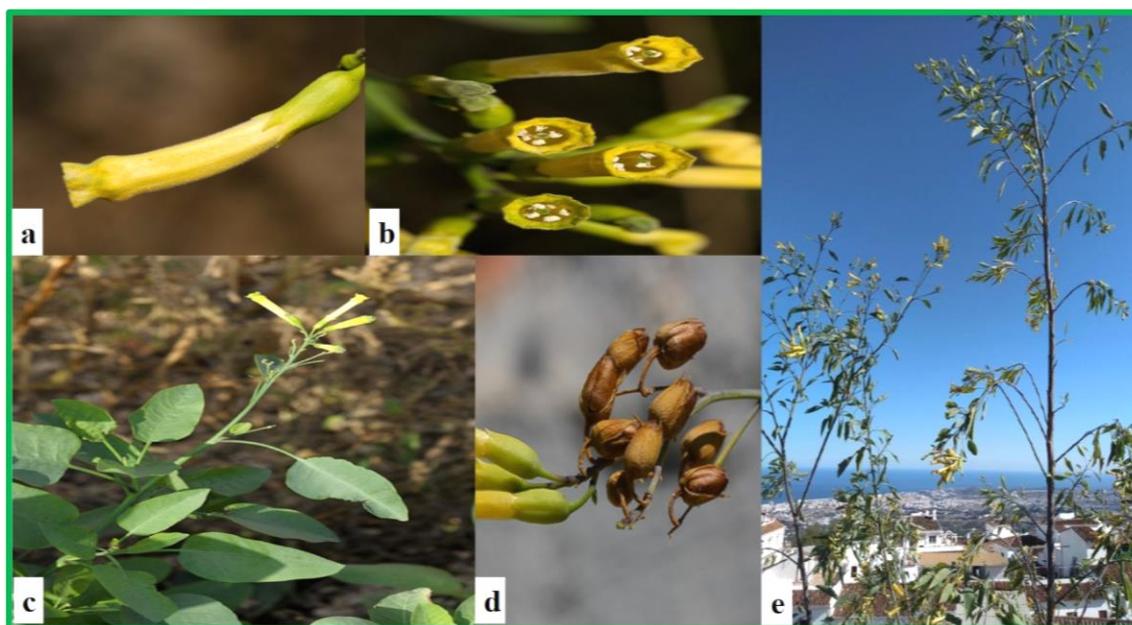
### 3. Présentation de l'espèce : *Nicotiana glauca*

#### 3.1. Généralités

Le terme "**nicotiana**" désigne la "nicotine" le principe actif des espèces de ce genre, Alors que le terme "**Glauca**" est un dérivé grec qui signifie la couleur bleu gris, en référence au poudre sur les feuilles de cette plante (Furer *et al.*,2011)

#### 3.2. Description botanique de *Nicotiana glauca*

*N. glauca* , arbre à tabac (**Figure I.18.**), est un arbuste ou un petit arbre vivace à feuillage persistant, glabre, à bois tendre, atteignant 6 m de haut, aux tiges peu ramifiées. La propagation de la plante se fait par transport des graines par le vent et l'eau. Il s'agit d'une plante invasive (Barguil *et al.*,2018)



**Figure I.18.** morphologie générale de *N. glauca* : a-b) corolle et calice; c) feuille; d) fruit; e) vue d'ensemble

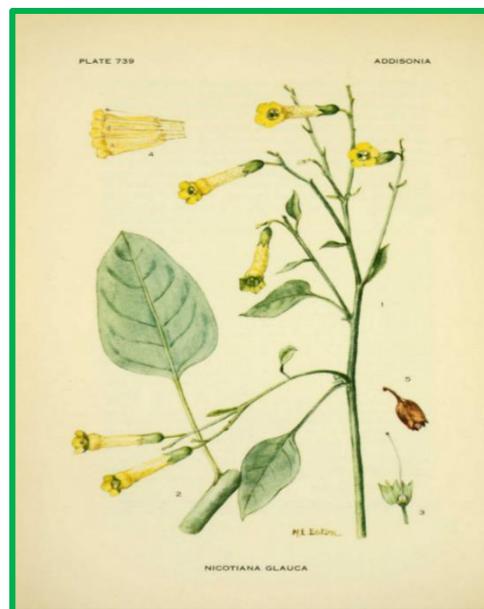
[https://www.florealpes.com/photos/nicoglauca\\_3.jpg?03082021125556](https://www.florealpes.com/photos/nicoglauca_3.jpg?03082021125556) (03-08-2021)

- **Les feuilles** sont pétiolées, alternes, elliptiques à lancéolées ou ovales, pointues, bleuâtres ou vert grisâtre.
- **Les fleurs** sont jaune verdâtres, de 30 à 40 mm de long, beaucoup sont portées par une panicule lache. La corolle est tubulaire avec un membre court-lobé.
- **Le fruit** est une capsule ovoïde à deux valves, de 7 à 10mm de long et légèrement plus long que le calice persistant. Il produit une grande quantité de graines

minuscules presque entièrement recouvert par le calice accrescent à 5 dents aiguës, qui peuvent être dispersées par le vent et l'eau. Toutes les parties de la plante sont extrêmement toxiques (Bogdanović *et al.*,2006 ; Silva *et al.*,2007 ;Rinez *et al.*,2011).

### 3.3. Classification dans la systématique

- Règne : plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Solanales
- Famille : Solanaceae
- Genre : *Nicotiana*
- Nom binominal : *Nicotiana glauca*  
Graham, 1826

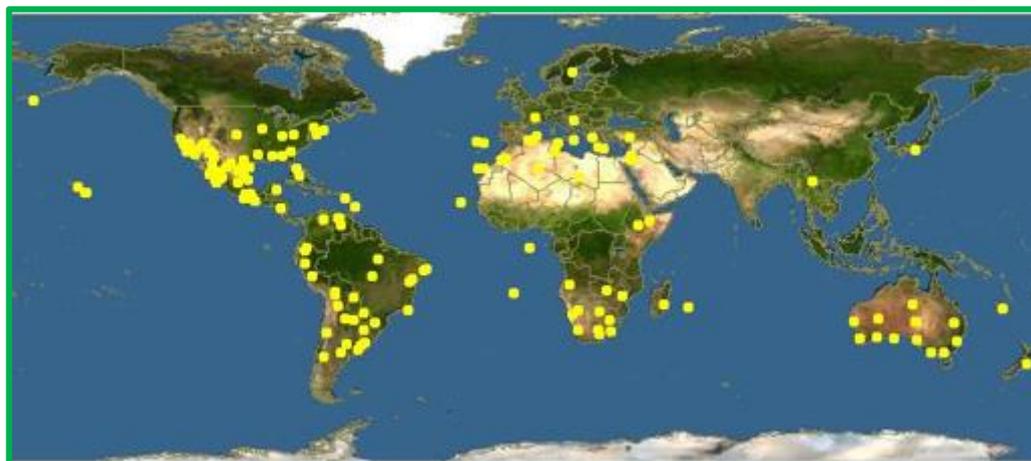


### 3.4. Noms communs et vernaculaires

Pays	Nom commun	Références
En France	Tabac glauque	Jouzier., 2005
	Tabac en arbre	Barguil <i>et al.</i> ,2018
En Angleterre	Tree tobacco	Hassan <i>et al.</i> ,2014
	Wild tobacco	Jassbi <i>et al.</i> ,2017
	Mustard tree	Barguil <i>et al.</i> ,2018
En Amérique	Trochillidae	Nattero & Cocucci .,2007
En Amérique du sud	Palán-palán	Musso <i>et al.</i> ,2020
En nord-est du Brésil	Fumo-bravo	Silva <i>et al.</i> ,2007
En Australie	Meliphagidae	Nattero & Cocucci.,2007
En Afrique	Nectarinidae	Nattero & Cocucci.,2007
En monde Arabe	Massas	Khaled <i>et al.</i> ,2015
En Libye	Akkoz Musa	Khaled <i>et al.</i> ,2015
En Algérie	Tabgha	Miara <i>et al.</i> ,2019

### 3.5. Origine et distribution géographique

*N. glauca* est une plante originaire de l'Amérique du Sud (nord-ouest et centre de l'Argentine, le Paraguay, la Bolivie, le Brésil, l'Équateur, le Pérou, le Chili et l'Uruguay) et se trouve aussi sur tout le pourtour méditerranéen (Espagne, Portugal, France, Italie et Grèce), en Afrique (Maroc, Afrique du Sud et Namibie), en Asie tempérée ainsi qu'en Australie (Barguil *et al.*,2018 ;Knapp.,2020, Alghamdi .,2021).



**Figure I.19.** Répartition géographique de *N. glauca* dans le monde

<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Nicotiana+glauca> (le 03-08-2021)

On la trouve principalement dans les milieux semi-arides de basse à haute altitude (0-3500m), mais jamais dans les localités humides (Benhissen *et al.*,2018).

### 3.6. Les métabolites secondaires de *Nicotiana glauca*

- **Les alcaloïdes**

Comme toutes les espèces du genre *Nicotiana*, *N. glauca* est caractérisée par la présence d'alcaloïdes pyridiniques dans les tissus des feuilles et des racines. La nicotine, la nornicotine, l'anabasine et l'anatabine (**Figure I.20.**) sont les plus majoritairement présents dans ce genre (Furer *et al.*,2011 ; Rinez *et al.*,2011)

La nicotine est l'alcaloïde le plus fréquemment isolé des feuilles de 33 espèces du genre *Nicotiana*, tandis que 24 espèces sont très riches en nornicotine et anabasine a été identifié dans 2 espèces *N. glauca* et *N. debneyi*; alors que l'anabasine est majoritairement présent dans les racines de 7 espèces de *Nicotiana*, dont *N. glauca* (Cherif *et al.*,2019).

Récemment une étude publiée par Massadeh *et al.*,2022 sur l'analyse qualitative par UPLC-HRESI-MS de l'extrait méthanolique des feuilles de *N. glauca* d'origine jordanienne a permis d'identifier pour la première fois deux nouveaux alcaloïdes : anabaseine et ammodendrine (Figure I.20.) avec d'autres alcaloïdes connus : anabasine, nicotine et nor nicotine.

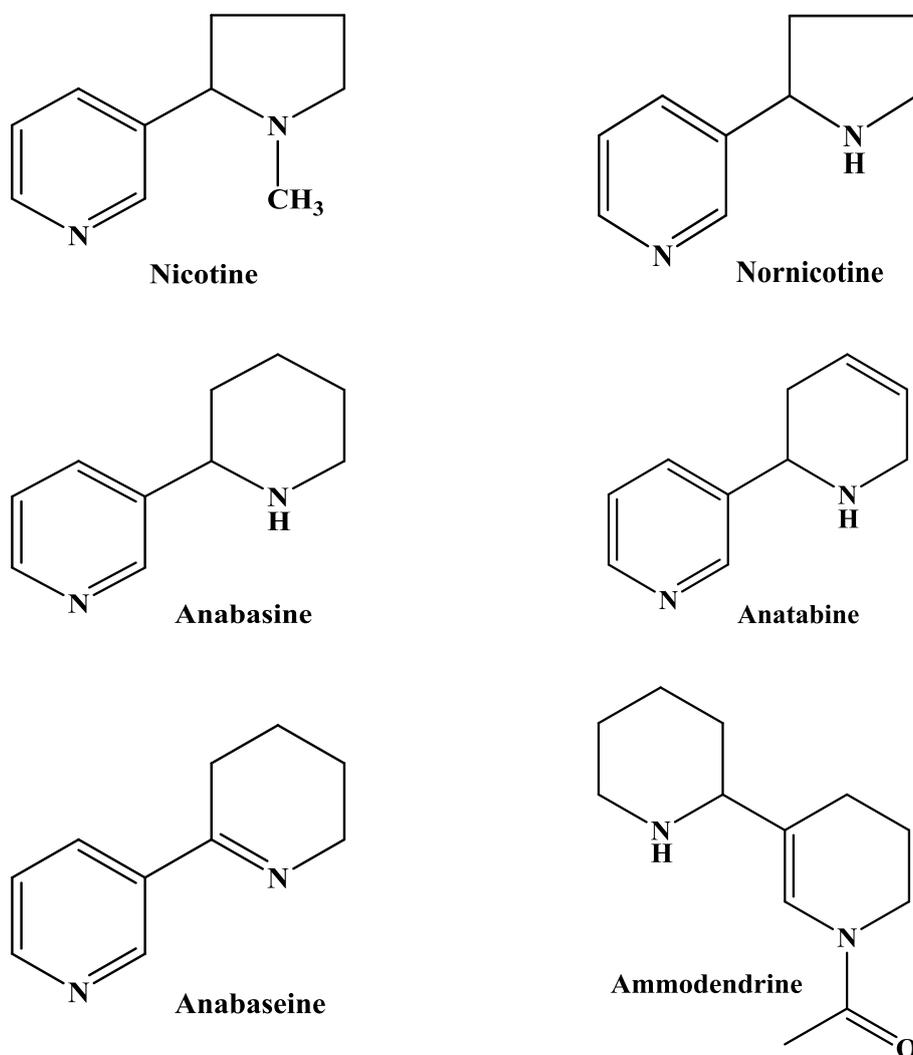


Figure I.20. Les principaux alcaloïdes isolés de *N. glauca* (Azab .,2020 ; Massadeh *et al.*,2022)

- **Les huiles essentielles**

Massadeh *et al.*,2022 ont réalisés l'identification de la composition chimique d'huile essentielle obtenue par l'hydrodistillation des feuilles de *N. glauca* d'origine jordanienne en utilisant la GC-MS. 29 composés ont été identifiés avec une richesse en sesquiterpènes oxygénés ( $\alpha$ -Bisabolol), acides carboxyliques et esters (acide hexadécanoïque et linoléate d'éthyle).

**Tableau I.12.** : Les composés majoritairement présents dans l'huile essentielle du *N.glauca* d'origine jordanienne

Organe	Composant	Pourcentage %
Les feuilles	$\alpha$ -Bisabolol	9.02
	9,17-Octadecadienal	10.83
	acide hexadécanoïque	10.38
	linoléate d'éthyle	34.79

Alors que Cherif *et al.*,2019 ont identifié 18 composés en utilisant la GC-MS pour analyser l'huile essentielle des feuilles de *N.glauca* d'origine tunisienne, dont l'eugénol constitue le composé majoritaire avec 58,49%.

**Tableau I.9.** : Les composés majoritairement présents dans l'huile essentielle du *N.glauca* d'origine tunisienne

Organe	Composant	Pourcentage %
Les feuilles	tridécano,3-méthyl	5.19
	acétate d'eugényle	5.57
	nonadécane	6.38
	eugénol	58.49

- **Autres composés**

Plusieurs études phytochimique effectuées sur l'analyse qualitative de l'extrait méthanolique par UPLC-HRESI-MS ont montré la présence des phytostérols comme daucostérol (Silva *et al.*,2007), stigmastérol ; campestérol ; D- $\alpha$ -tocophérol (Tabana *et al.*,2015),  $\beta$ -sitostérol et  $\beta$ -sitostérol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Massadeh *et al.*,2022).

L'évaluation biologique de la scopolétine isolé à partir de l'extrait chloroformique de *N.glauca* a permis de révéler la présence de diverses activités biologiques comme l'activité hépatoprotectrice, spasmolytique, antioxydante, antiproliférative et anti-tumorales (Cherif *et al.*,2019 ;Musso *et al.*,2020)

D'après la littérature l'espèce *N.glauca* est constituée des acides gras tels que l'acide palmitique, l'acide linoléique, l'acide oléique et vitamine D3 (Silva *et al.*,2007)

Récemment l'acide chlogénique a été détecté pour la première fois dans l'extrait méthanolique des feuilles de *N.glauca* d'origine jordanienne (Massadeh *et al.*,2022)

### 3.7. Usages traditionnels de *Nicotiana glauca*

*N.glauca* est une plante d'ornementation ou sauvage (Barguil *et al.*,2018) utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires (Tabana *et al.*,2015), on peut citer comme exemple :

- *N.glauca* est une plante hautement toxique et tératogène, En Italie cette espèce est utilisée pour traiter les brûlures et les maladies inflammatoire (Janakat & Al-Merie.,2002).
- Dans le le nord-ouest de l'Argentine, les feuilles de cette espèce sont utilisées en applications externes pour soigner les inflammations (Jouzier., 2005).
- Au Brésil, les feuilles séchées de *N.glauca* sont roulées en cigare est utilisées pour soulager les douleurs dentaires (Silva *et al.*,2007).
- En médecine populaire jordanienne *N.glauca* est employée pour traiter la jaunisse (Janakat & Al-Merie.,2002 ; Hassan *et al.*,2014).
- En Algérie, l'organe génital de mouton est exposé à la vapeur des feuilles bouillies dans l'eau pour traiter les infections urinaires de l'animal (Miara *et al.*,2019).
- L'utilisation des espèces du genre *Nicotiana* comme insecticide est due aux propriétés toxiques de la nicotine, un alcaloïde majoritairement présent dans ce genre (Steenkamp *et al.*,2002 ; Benhissen *et al.*,2018)
- *N.glauca* a été utilisée comme anodine, remède contre les furoncles, pour le traitement des brûlures, des maladies inflammatoires et pour la cicatrisation des plaies (Mhinana *et al.*,2010 ; Hassan *et al.*,2014 ; Tabana *et al.*,2015).

- Les feuilles chauffées de cette plante sont appliquées comme compresse sur la tête, sur la gorge et sur les pieds pour soulager la douleur. Cette plante est utilisée sous forme d'infusion pour soigner le rhumatisme (Hassan *et al.*,2014 ;Steenkamp *et al.*,2002 ; Musso *et al.*,2020).
- *N. glauca* est utilisée en tant que remède pour soigner les infections de la peau et de l'oreille et comme agent hépatoprotecteur (Teyeb *et al.*,2017).

### 3.8. Intérêt pharmacologique de *Nicotian glauca*

- **Activité cytotoxique**

Une étude a été réalisée sur les extraits dichlorométhane et hexane des tiges de *N. glauca* a montré que ces deux extraits présentent une activité cytotoxique très importante contre les cellules MCF-7 avec  $IC_{50}=17,98\mu\text{g/mL}$  (Tabana *et al.*,2015)

- **Activité antibactérienne**

Sellem *et al.*,2016 ont rapporté que l'extrait d'acétate d'éthyl des feuilles de *N. glauca* tunisienne présente une meilleure activité contre les bactéries *S.typhimurium* ( $29.7 \pm 1.3$  mm), *E. aerogenes* ( $47.2 \pm 0.7$ mm), *L. monocytogenes* ( $50.1 \pm 0.2$  mm), *M. luteus* ( $54.0 \pm 0.0$  mm) et *S. aureus* ( $26.2 \pm 1.0$  mm) en comparant avec les autres parties (fleurs et tiges) de la plante . De même, une récente étude saoudienne a montré que les extraits des feuilles et des fleurs de *N. glauca* inhibent la croissance d'*E. coli* et de *S .aureu*, suggérant que ces extrait pourraient être utilisés pour le traitement des infections bactériennes (Zou *et al.*,2021).

- **Activité antifongique**

Un groupe tunnisien a étudié l'activité antifongique des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *N.glauca* récoltées de la région de Monastir. Les résultats ont révélé un effet antifongique important des extrais aux concentrations testées (1,2,3 et 4%) (Teyeb *et al.*,2017).

- **Activité larvicide**

Le travail de Benhissen *et al.*,2018 démontre la puissance de l'extrait aqueux des feuilles *N.glauca* comme larvicide efficace contre les larves *Culiseta longiareolata*, il était très toxique pour les larves de moustiques. Les taux élevés de mortalité larvaire observé à 62.ag/L en 24 heures avec une valeur de  $CL_{50}=26.87\text{g/L}$  indique la haute toxicité de l'extrait.

- **Activité antiacétylcholinestérases**

La grande activité de l'extrait de dichlorométhane des feuilles du *N.glauca* tunisienne ( $IC_{50} = 2,5 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ ), peut s'expliquer par le fait que cette plante contient certains composés qui inhibent l'AChE comme l'anabisine (Sellem *et al.*,2016).

- **Activité insecticide**

La nicotine n'est pas le seul composant insecticide présent dans le genre *Nicotiana*, on peut citer comme exemple *N. glauca* qui est riche en anabisine, a été répertorié comme un répulsif naturel contre les arthropodes (Zou *et al.*,2021) et le chou blanc chenilles (*Pieris rapae*) (Azab.,2020).

- **Activité alléopathique**

Une étude a été faite sur les effets des extraits aqueux de différentes parties de *N.glauca* sur la croissance de *Juniperus procera*. L'extrait des feuilles a favorisé la croissance, tandis que l'extrait des racines n'a entraîné aucun effet sur la croissance (Azab.,2020).

- **Activité antioxydante**

L'activité de piégeage des radicaux DPPH effectuée sur les extraits des fleurs de *N. glauca*, a montré que les valeurs  $IC_{50}$  sont comprises entre  $41,4 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$  (extrait acétonitrile des fleurs) et  $>500 \mu\text{g/mL}$  pour les autres extraits (cyclohexane, dichlorométhane, éthyle acétate et acétone) par rapport aux standards : acide gallique ( $IC_{50} = 3,6 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$ ), acide ascorbique ( $IC_{50} = 4,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) et BHT ( $IC_{50} = 28,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) (Sellem *et al.*,2016)

### 3.9. Toxicité de l'espèce *Nicotiana glauca*

La famille des Solanaceae est caractérisée par la présence de nombreuses espèces toxiques, potentiellement dangereuses pour les humains à cause des alcaloïdes qu'elles produisent (Lopez *et al.*,2013).

Des études ont démontré que toutes les parties de *N. glauca* sont extrêmement toxique pour l'homme et l'animal (intoxication grave ou mortelle). Sa toxicité est due à la présence d'anabasine, qui est considérablement plus toxique que la nicotine (Furer *et al.*,2011 ; Hassan *et al.*,2014 ;Barguil *et al.*,2018). L'anabasine constitue une proportion importante (98%) des alcaloïdes présents dans quelques espèces du genre *Nicotiana* , telle que *N.glauca*. Son contenu varie d'une partie à l'autre de la plante, étant plus élevé dans les feuilles et l'écorce. Dans *N.glauca*, l'anabasine existe sous forme de mélange racémique des énantiomères R et S, R-anabasine étant un peu plus puissant par apport à la S-anabasine (Furer *et al.*,2011)

Les intoxications sont le plus souvent, le résultat d'une confusion avec des légumes-feuilles (épinards). La survenue des symptômes (céphalées, diarrhées - absentes cependant de notre présentation -, obnubilation, paresthésies, faiblesse progressive des membres inférieurs, paralysie, arrêt respiratoire) est très rapide (quelques minutes à quelques heures post-ingestion). Les animaux d'élevage (bétail, autruches) peuvent aussi être victimes d'intoxications aiguës mortelles (Barguil *et al.*,2018).

**Références bibliographiques**

- Amiot, M. J.,** Riollet, C., & Landrier, J. F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique : Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des maladies métaboliques*, 3(5), 476-482.
- Akinpelu, D. A.,** & Obuotor, E. M. (2000). Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* leaves. *Fitoterapia*, 71(2), 199-200.
- Alghamdi, A. A.** (2021). Phytoconstituents screening and antimicrobial activity of the invasive species *Nicotiana glauca* collected from Al-Baha region of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1544-1547.
- Al-Lahham, S.,** Sbieh, R., Jaradat, N., Almasri, M., Mosa, A., Hamayel, A., & Hammad, F. (2020). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of *Nicotiana tabacum* L. *European Journal of Integrative Medicine*, 33, 101039.
- Azab, A.** (2020). Solanaceae plants of israel and palestine-rich source of medicinally active natural products. *europaen chemical bulletin*, 9(8), 199-261.
- Benhissen, S.,** Rebbas, K., Habbachi, W., & Masna, F. (2018). Bioactivity of *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae) and its toxic effects on *Culiseta longiareolata* (Diptera; Culicidae). *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(1), 123-126.
- Barguil, Y.,** Antheaume, C., Tatoyan, N., Mikulski, M., Caltot, E., & Laurencu, X. (2018). Intoxication familiale à *Nicotiana glauca*. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 30(2), S28.
- Bikandu, KB.,** Kavumbu, MS., Lukoki, LF. and Sosef, MSM.(2021). Diversité et caractérisation écologiques et phytogéographiques des espèces des Solanaceae dans la région d'Afrique centrale (Rwanda-Burundi-RD Congo). *International Journal of Applied Research*, 7(2), 436-444.
- Bogdanović, S.,** Mitić, B., Ruščić, M., & Dolina, K. (2006). *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae), a new invasive plant in Croatia. *Acta Botanica Croatica*, 65(2), 203-209.

- Castillo, L. E.**, Jiménez, J. J., & Delgado, M. A. (2010). Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 12(3), 445-462.
- Chávez-González, M. L.**, Sepúlveda, L., Verma, D. K., Luna-García, H. A., Rodríguez-Durán, L. V., Iliina, A., & Aguilar, C. N. (2020). Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes*, 8(4), 434.
- Chelghoum, H.**, Hammou, M. A., Miara, M. D., & Fertout-Mouri, N. (2020). *Solanum rostratum* (Solanaceae): une nouvelle xérophyte invasive pour la flore d'Algérie. *Flora Mediterranea*, 30, 81-8.
- Cherif, A.**, Ammar, S., & Boukhchina, S. (2019). Composition and characterization by GC-MS of the essential oil extracted from *Nicotiana glauca* Graham. *Grasas y Aceites*, 70(3), e317-e317.
- Chira, K.**, Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- Chirchir, K. D.**, Cheplogoi, K. P., Omolo, O. J., & Langat, K. M. (2018). Chemical constituents of *Solanum mauense* (Solanaceae) and *Dovyalis abyssinica* (Salicaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(2), 999-1007.
- Chowański, S.**, Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., ... & Bufo, S. A. (2016). A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, 8(3), 60.
- Christen, P.**, Cretton, S., Humam, M., Bieri, S., Muñoz, O., & Joseph-Nathan, P. (2020). Chemistry and biological activity of alkaloids from the genus *Schizanthus*. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 615-641.
- Crooks, P. A.** (1999). Chemical properties of nicotine and other tobacco-related compounds. Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites. JW Gorrod and P. Jacob. *Gorrod, JW, Jacob III, P. Oxford: Elsevier*, 69-147.
- Debnath, B.**, Singh, W. S., Das, M., Goswami, S., Singh, M. K., Maiti, D., & Manna, K. (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials today chemistry*, 9, 56-72.

- De Araújo, F. F.**, de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food chemistry*, 338, 127535.
- Diarra, L.** (2021). Etude phytochimique et activité anti-radicalaire des feuilles de *Nicotiana tabacum L* et de *Cannabis sativa L* (Doctoral dissertation, USTTB).
- Dias, M. C.**, Pinto, D. C., & Silva, A. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
- Furer, V.**, Hersch, M., Silvetzki, N., Breuer, G. S., & Zevin, S. (2011). *Nicotiana glauca* (tree tobacco) intoxication—two cases in one family. *Journal of medical toxicology*, 7(1), 47-51.
- Janakat, S.**, & Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of ethnopharmacology*, 83(1-2), 135-138.
- Jassbi, A. R.**, Zare, S., Asadollahi, M., & Schuman, M. C. (2017). Ecological roles and biological activities of specialized metabolites from the genus *Nicotiana*. *Chemical reviews*, 117(19), 12227-12280.
- Jouzier, E.** (2005). Solanacées médicinales et philatélie. *bulletin-societe de pharmacie de bordeaux*, 144(3/4), 311.
- Hammiche, V.**, Merad, R., & Azzouz, M. (2013). Solanacées. In *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Springer, Paris, 237-263.
- Hassan, H.**, El-Hameed, T. Z. A., & Nasr, E. (2014). Ecological and phytochemical studies on *Nicotiana glauca* from Egypt. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 10, 87-95.
- Helmja, K.**, Vaher, M., Gorbatšova, J., & Kaljurand, M. (2007, December). Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. In *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry*, 56(4), 172-186.
- Ganaie, M. M.**, Raja, V., Reshi, Z. A., & Verma, V. (2018). Family Solanaceae: Taxonomy and modern trends. *Annals of plant science*, 7(9), 2403-2414.
- Ghedira, K.** (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

- Giorgetti, M., & Negri, G.** (2011). Plants from Solanaceae family with possible anxiolytic effect reported on 19th century's Brazilian medical journal. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 772-780.
- Goullé, J. P., Pépin, G., Dumestre-Toulet, V., & Lacroix, C.** (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. In *Annales de toxicologie analytique*, 16(1), 22-35. EDP Sciences.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., López-Martínez, L. X., Contreras-Angulo, L. A., Elizalde-Romero, C. A., & Heredia, J. B.** (2020). Plant alkaloids: structures and bioactive properties. In *Plant-derived Bioactives* (pp. 85-117). Springer, Singapore.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X.** (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol*, 2(7), 377-392.
- Kaminski, K. P., Bovet, L., Laparra, H., Lang, G., De Palo, D., Sierro, N., & Ivanov, N. V.** (2020). Alkaloid chemophenetics and transcriptomics of the *Nicotiana* genus. *Phytochemistry*, 177, 112424.
- Khaled M.Elsherif, Zaid N., Eman K. & Nouha.F.** (2015). Phytochemical Screening and Heavy Metals Contents of *Nicotiana glauca* Plant. *Ijppr.Human*, 4 (3), 82-91.
- Knapp, S.** (2020). Biodiversity of *Nicotiana* (Solanaceae). In *The Tobacco Plant Genome* (pp. 21-41). Springer, Cham.
- Kumar, N., & Goel, N.** (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
- Li, Y., Zhang, T., & Chen, G. Y.** (2018). Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*, 7(12), 187.
- Long, N., Ren, X., Xiang, Z., Wan, W., & Dong, Y.** (2016). Sequencing and characterization of leaf transcriptomes of six diploid *Nicotiana* species. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 23(1), 1-12.
- Lopez, J. G., Kervégant, M., Tichadou, L., Hayek-Lanthois, M., & de Haro, L.** (2013). Intoxication modérée accidentelle par *Nicotiana glauca*. *La Presse Médicale*, 42(11), 1538-1539.

- Marciniak, P.**, Kolińska, A., Spochacz, M., Chowański, S., Adamski, Z., Scrano, L., ... & Rosiński, G. (2019). Differentiated effects of secondary metabolites from Solanaceae and Brassicaceae plant families on the heartbeat of *Tenebrio molitor* Pupae. *Toxins*, 11(5), 287.
- Massadeh, R. K.**, El-Elimat, T., Al-Gharaibeh, M., Tawaha, K., & Alali, F. Q. (2022). UPLC-HRESI-MS and GC-MS analysis of the leaves of *Nicotiana glauca*. *Acta Pharmaceutica*, 72(1), 97-108.
- Massaux, C.** (2012). Polyphénols: des alliés pour la santé. *Abeilles & cie*, 149, 4.
- Mhinana, Z.**, Mayekiso, B., & Magwa, M. L. (2010). Anatomy and morphology of *Nicotiana glauca* with regard to its crystals characterization. *African Journal of Plant Science*, 4(6), 172-178.
- Miara, M. D.**, Bendif, H., Ouabed, A., Rebbas, K., Hammou, M. A., Amirat, M., ... & Teixidor-Toneu, I. (2019). Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe : Exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 244, 112164.
- Mondal, S.**, & Rahaman, S. T. (2020). Flavonoids: A vital resource in healthcare and medicine. *Pharm. Pharmacol. Int. J*, 8, 91-104.
- Musso, F.**, Pronsato, L., Milanese, L., Vasconsuelo, A., & Faraoni, M. B. (2020). Non-polar extracts of *Nicotiana glauca* (Solanaceae) induce apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Rodriguésia*, 71.
- Nattero, J.**, & Cocucci, A. A. (2007). Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90(4), 657-667.
- Nugroho, L. H.**, & Verpoorte, R. (2002). Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(2), 105-125.
- Oeung, S.**, Nov, V., Ung, H., Roum, K., Yin, V., Keo, S., & Chea, S. (2017). Phytochemical analysis of different extracts of leaves of *Nicotiana tabacum* L. of Cambodia. *Asian Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 18-26.
- Panche, A. N.**, Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5,1-15.

- Patel, K.,** Singh, R. B., & Patel, D. K. (2013). Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 92-98.
- Pomilio, A. B.,** Falzoni, E. M., & Vitale, A. A. (2008). Toxic chemical compounds of the Solanaceae. *Natural Product Communications*, 3(4), 593-628.
- Pigatto, A. G. S.,** Mentz, L. A., & Soares, G. L. G. (2015). Chemotaxonomic Characterization and Chemical Similarity of Solanaceae Subfamilies based on Ornithine Derivates. *Cloning and Transgenesis*, 4(1), 1-8.
- Popova, V.,** Ivanova, T., Nikolova, V., Stoyanova, A., Docheva, M., Hristeva, T., ... & Nikolov, N. (2017). Biologically active and volatile compounds in leaves and extracts of *Nicotiana alata* Link & Otto from Bulgaria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(11), 2045-2051.
- Popova, V.,** Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Hristeva, T., Docheva, M., ... & Iliev, I. (2019). Polyphenols and triterpenes in leaves and extracts from three *Nicotiana* species. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 7(05), 45-49.
- Popova, V.,** Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Hristeva, T., & Zheljzkov, V. D. (2020). GC-MS Composition and Olfactory Profile of Concretes from the Flowers of Four *Nicotiana* Species. *Molecules*, 25(11), 2617.
- Rinez, A.,** Ladhari, A., Omezzine, F., Rinez, I., & Haouala, R. (2011, October). Phytotoxicity of *Nicotiana glauca* Graham aqueous extracts, a Tunisian invasive plant. In *3rd International Symposium on Weeds and Invasive Plants, October* (pp. 2-7).
- Sellem, I.,** Kaaniche, F., Chakchouk, A. M., & Mellouli, L. (2016). Anti-oxidant, antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of organic extracts from aerial parts of three Tunisian plants and correlation with polyphenols and flavonoids contents. *Bangladesh Journal of pharmacology*, 11(2), 531-544.
- Shah, V. V.,** Shah, N. D., & Shinde, S. S. (2012). Solanaceae: Historical Aspects. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 1(3), 90-95.
- Shajib, M. S.,** Datta, B. K., Chowdhury, R., & Rashid, M. A. (2018). Antioxidant Flavonoids from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Viv. Leaves. Arch Nat Med Chem: ANMC-117*. DOI, 10, 2577-0195.

- Shajob, M. S.,** Datta, B. K., Sohrab, M. H., Rashid, M. A., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2017). Highly oxygenated flavonoids from the leaves of *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae). *Records of Natural Products*, 568-572.
- Shang, S.,** Shi, J., Tang, J., Jiang, J., Zhao, W., Zheng, X., ... & Miao, M. (2019). New isolates from leaves of *Nicotiana tabacum* and their biological activities. *Natural product research*, 33(11), 1577-1583.
- Silva, K. N.,** de F. Agra, M., Baracho, G. S., & Basílio, I. J. L. D. (2007). Estudo farmacobotânico de folhas de *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(4), 499.
- Soulimane, A.** (2014). Contribution à une étude du cortège floristique de *Nicotiana glauca* G. (solanacées) Dans le littoral de la région de Tlemcen .mémoire d'ingénieur .Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.
- Stenkamp, P. A.,** Van Heerden, F. R., & Van Wyk, B. E. (2002). Accidental fatal poisoning by *Nicotiana glauca*: identification of anabasine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Forensic science international*, 127(3), 208-217.
- Stoclet, J. C.,** & Schini-Kerth, V. (2011, March). Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 69, No. 2, pp. 78-90). Elsevier Masson.
- Tabana, Y. M.,** Dahham, S. S., Ahmed Hassan, L. E., Al-Mansoub, M. A., Taleb-Agha, M., & Abdul Majid, A. M. (2015). In vitro anti-metastatic and antioxidant activity of *Nicotiana glauca* fraction against breast cancer cells. *Adv Biol Res*, 9(2), 95-102.
- Teyeb, H.,** Douki, W., & Padrón, J. M. (2017). Antiproliferative activity of three wild growing species in Tunisia: *Nicotiana glauca*, *Artemisia campestris* and *Astragalus gombo*. *Int. J. Pharmacogn.*, 3, 294-298.
- Weber, S. S.,** Kaminski, K. P., Perret, J. L., Leroy, P., Mazurov, A., Peitsch, M. C., ... & Hoeng, J. (2019). Antiparasitic properties of leaf extracts derived from selected *Nicotiana* species and *Nicotiana tabacum* varieties. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110660.

**Wollenweber, E.,** Dörsam, M., Dörr, M., Roitman, J. N., & Valant-Vetschera, K. M. (2005). Chemodiversity of surface flavonoids in Solanaceae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(9-10), 661-670.

**Yinyang, J.,** Mpondo, E. M., Tchatat, M., Ndjib, R. C., Ottou, P. M., & Dibong, S. D. (2014). Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6600-6619.

**Yuan, X. L.,** Mao, X. X., Du, Y. M., Yan, P. Z., Hou, X. D., & Zhang, Z. F. (2019). Anti-tumor activity of cembranoid-type diterpenes isolated from *Nicotiana tabacum* L. *Biomolecules*, 9(2), 45.

**Yang, C. Y.,** Lin, Y., Yuan, H. X., Yang, W. P., Wei, X., & Huang, Z. L. (2018). Nicotabaflavonoidglycoside, the first example of cembranoid and flavonoid heterodimer from *Nicotiana tabacum*. *Fitoterapia*, 128, 242-246.

**Zou, X.,** Amrit, B. K., Abu-Izneid, T., Aziz, A., Devnath, P., Rauf, A., ... & Suleria, H. A. (2021). Current advances of functional phytochemicals in *Nicotiana* plant and related potential value of tobacco processing waste: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112191.

## **Chapitre II :**

# **Activité antioxydante**

## 1. Introduction

La notion de « radicaux libres », de « stress oxydant » ou d'« antioxydants » est de plus en plus souvent utilisée pour expliquer différentes maladies pathologiques et leur approche thérapeutique (Leverve.,2009). Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants, sans parfois l'esprit critique nécessaire (Defraigne & Pincemail.,2008).

## 2. Les radicaux libres

### 2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante << libre >> en contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une instabilité énergétique et cinétique (une grande réactivité) donc une demi-vie très courte (Goudable & Favier.,1997; Koechlin-Ramonatxo.,2006;Afonso *et al.*,2007). Ce déséquilibre n'est que transitoire, car il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al.*,2007) .

### 2.2. Principaux radicaux libres

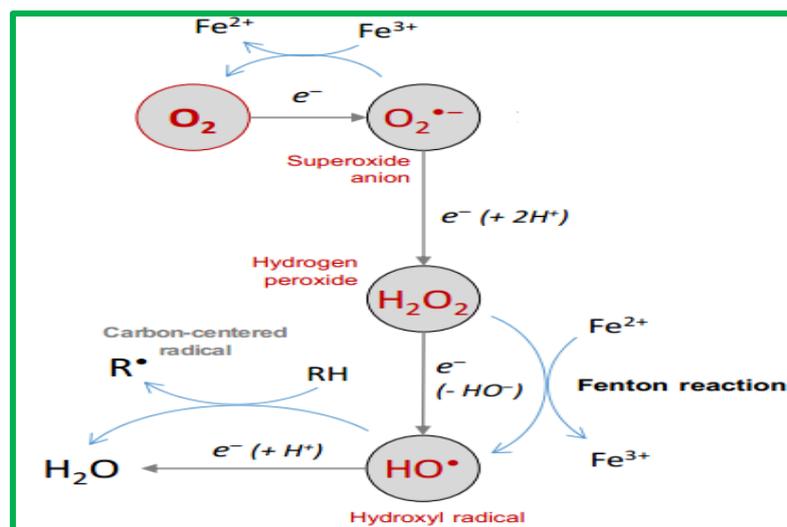
L'oxygène moléculaire ( $O_2$ ), du fait de sa configuration électronique, possède un caractère oxydant qui se manifeste par son avidité vis-à-vis des électrons (Yzydorczyk *et al.*.,2015), générant ainsi la formation d'oxydants radicalaires (radicaux libres) et non radicalaires, parmi lesquelles on retrouve les espèces réactive oxygénées (**ERO**) et de l'azote (**ERN**) (**Tableau II.1.**) (Yzydorczyk *et al.*.,2015; Donaghy *et al.*, 2015) .

**Tableau II.1.** Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote  
(Rigas & Sun.,2008) ; (Phaniendra *et al.*,2015)

<b>Espèce réactives de l'oxygène (ERO)</b>	
Radicaux libres	Formes non radicalaire
Anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ; Hydroxyl ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) ; peroxyl ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ) ; alkoxyl ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) ; hydroperoxyl ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ).	Peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ; Acide hypochlorique ( $\text{HOCl}$ ) ; Ozone ( $\text{O}_3$ ) ; Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) ; peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ).
<b>Espèce réactives de l'azote (ERN)</b>	
Radicaux libres	Formes non radicalaire
Oxyde nitrique ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) ; dioxyde de nitrogène ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ).	Acide nitrique ( $\text{HNO}_2$ ) ; peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) ; alkyl peroxnitrite ( $\text{ROONO}$ ) ; anion nitroxyl ( $\text{NO}^-$ ) ; cation nitrosyl ( $\text{NO}^+$ ).

Les ERO constituent la plus importante classe des espèces à radical libre qui soit formé dans les systèmes vivants (Filaire & Toumi.,2012)

La **figure II.1.** représente la réduction en quatre étapes, étape par étape, de l'oxygène en eau. Les espèces dérivées de l'oxygène formées au cours de cette réduction sont tout d'abord l'oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ), ensuite en anion radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) et à la fin à l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Vamecq *et al.*.,2004).



**Figure II.1.** Les Voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Collin.,2019).

### 3. Le stress oxydatif

#### 3.1. Définition

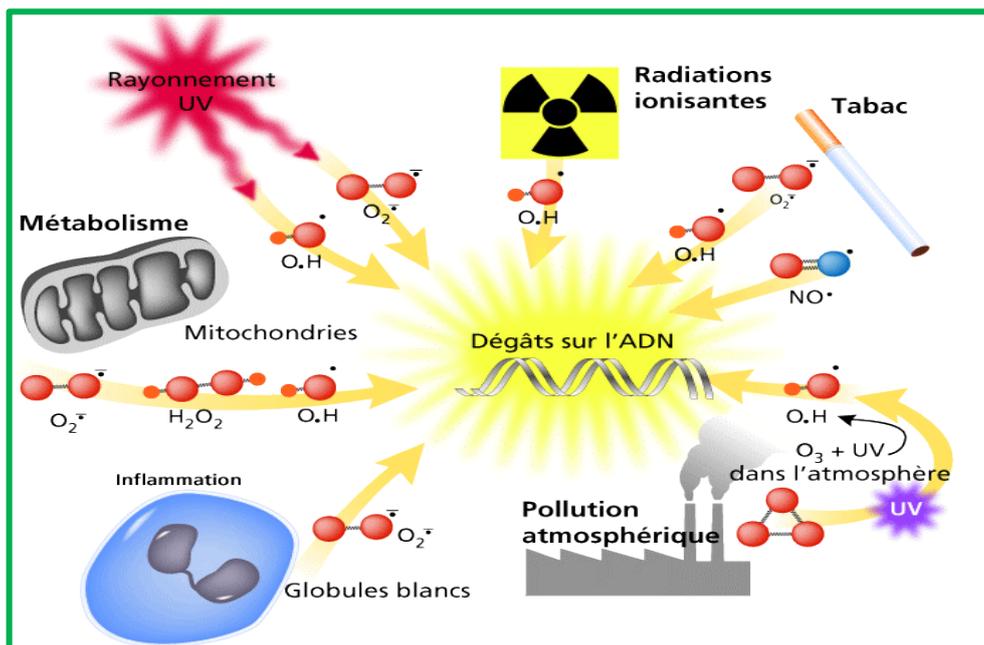
Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre (Pincemail *et al.*,2001) ; (Migdal & Serres.,2011). Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro oxydants en faveur de ces derniers (Pincemail *et al.*,2002).

#### 3.2. Origine du stress oxydant

Classiquement la chaîne respiratoire mitochondriale est considérée comme étant la principale source des ERO intracellulaires (Filaire & Toumi.,2012). Elle joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Les conséquences de cette activité mitochondriale seront doubles et paradoxales (Pincemail *et al.*,2001).

D'une part, la mitochondrie fournira à la cellule une source d'énergie importante (36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène) (Pincemail *et al.*,2001). D'autre part, le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont

transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (Pincemail *et al.*,2002).



**Figure II.2.** Les causes du stress oxydatif

Source : <https://willdiet.wixsite.com/diet/post/le-stress-oxydatif> (31-12-2020)

D'autres éléments physiques ou chimiques comme le montre la **figure II.2** peuvent également déstabiliser les électrons des molécules biologiques. Ainsi, la lumière (surtout certains rayonnements ultraviolets), les radiations ionisantes (rayons X), la pollution atmosphérique, la fumée de tabac et de nombreux composés chimiques peuvent générer des radicaux libres (Leverve.,2009).

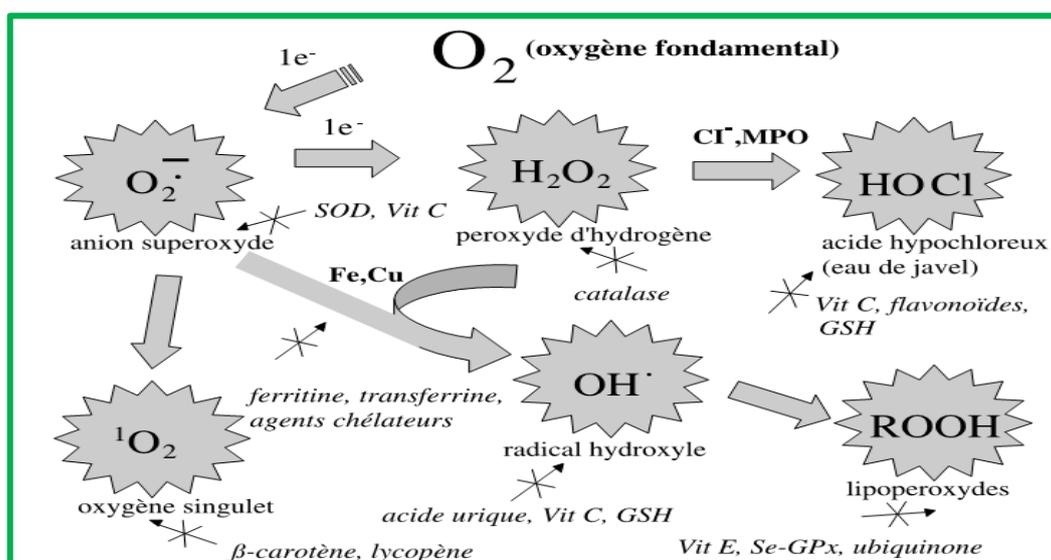
En fin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydatif (Pincemail *et al.*,2002).

### 3.3. Conséquence de stress oxydatif

Le stress oxydatif a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neuro dégénérative (Alzheimer, Parkinson), inflammation, diabète et vieillissement (Gardès-Alber.,2006; Ladoh *et al.*,2014; Ghedadba *et al.*, 2015; Phaniendra *et al.*,2015). Ces dommages oxydatifs sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort des cellules (Pincemail *et al.*,2001 ; Ghedadba *et al.*, 2015).

## 4. Les antioxydants

L'exposition aux radicaux libres a conduit les organismes à développer une série de mécanisme de défense comportant des mécanismes de prévention, de réparation, des défenses physiques et des défenses anti-oxydatives (**Figure II.3.**) (Filaire & Toumi.,2012).



**Figure II.3.** Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail *et al.*,2002)

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types :

Les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Goudable & Favier.,1997).

### 4.1. Les antioxydants enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans les système de défense antioxydants. Les enzymes antioxydantes majeures sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), l'hème oxygénase, les enzymes de biosynthèse et transfert du glutathion, quinone réductase (Dangles,O.,2020). Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces enzymes peuvent être augmentées lors d'un stress oxydant (De Moffarts *et al.*, 2005).

## 4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les défenses antioxydantes non enzymatiques font référence à la neutralisation de l'espèce oxydante par une espèce dite antioxydante. Quand l'espèce oxydante est de nature radicalaire, l'agent antioxydant neutralise le radical en question, mais se transforme lui-même en une espèce radicalaire.

L'activité antioxydante tient dans le fait que l'espèce radicalaire formée à partir de l'agent antioxydant est classiquement beaucoup moins réactive et plus stable que l'espèce oxydante radicalaire avec laquelle l'agent antioxydant réagit initialement (Vamecq *et al.*, 2004).

En plus des substances propres à l'organisme, la synthèse et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants :

### 4.2.1. Source de synthèse

L'utilisation des antioxydants synthétiques comme le BHA, le BHT, le TBHQ et le PG (Figure II.4.) peuvent avoir des effets néfastes sur la santé, de nombreux travaux publiés ont mentionné leurs propriétés toxiques possibles pour la santé humaine et pour l'environnement (Fleuriet *et al.*, 1996 ; Marc *et al.*, 2004 ; Ghedadba *et al.*, 2015). Une grande partie des recherches actuelles porte sur la recherche de nouvelles sources d'antioxydants naturels (Fleuriet *et al.*, 1996 ; Talbi *et al.*, 2015).

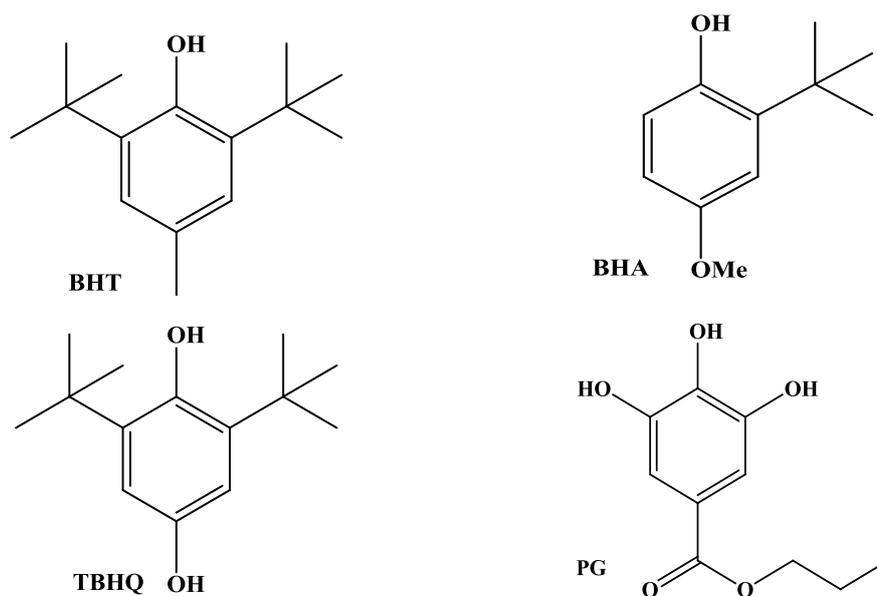


Figure II.4. Antioxydants de synthèse les plus utilisés.

### **4.2.2. Source naturelle**

Les plantes sont des sources naturelles des substances antioxydantes qui permet à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies, ce qui suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (Ojeil *et al.*,2010).

Parmi les antioxydants naturels les plus connus, nous pouvons citer les composés phénoliques et les flavonoïdes (Popovici *et al.*, 2010 ; Filaire & Toumi 2012 ; Sarr *et al.*,2015 ; Yzydorczyk *et al.*,2015).

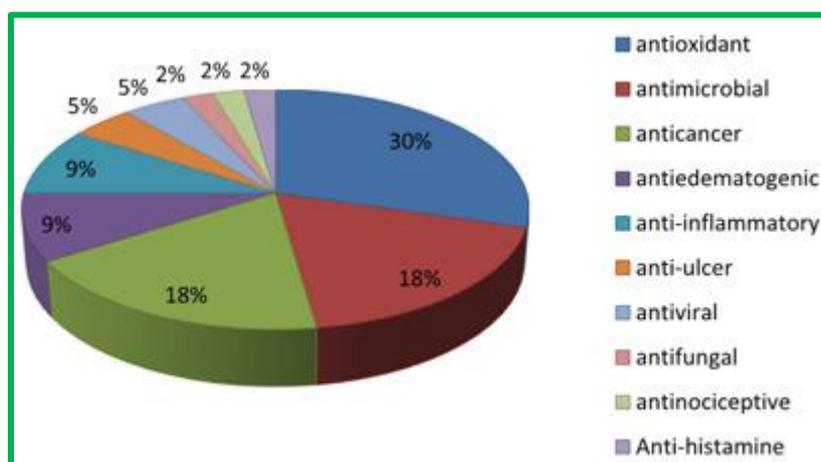
#### **4.2.2.1. Les composés phénoliques**

En plus de leur rôle important dans certaines propriétés sensorielles, plusieurs études ont souligné que beaucoup de composés phénoliques possèdent des activités biologiques liées à leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires (Ojeil *et al.*,2010). Grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de chélater les métaux de transition (Fer et Cuivre), catalyseurs d'oxydation et de piéger les radicaux libres oxygènes en particulier les radicaux peroxydes (ROO•), alkoxydes (RO•), superoxydes (O<sub>2</sub>•-) et les hydroxyles (OH•), générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections)(Amiot *et al.*,2009;Ojeil *et al.*,2010 ;Popovici *et al.*, 2010). En général tous les composés phénoliques naturels ont des propriétés antioxydantes comme les flavonoïdes, les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés (acides caféiques, chlorogénique, rosmarinique, ferulique) , les coumarines... , ils agissent soit en bloquant la formation des radicaux libres soit en fixant directement l'oxygène ou en inhibant l'activité lipoxigénase (Fleuriet *et al.*,1996).

#### **4.2.2.2. Les flavonoïdes**

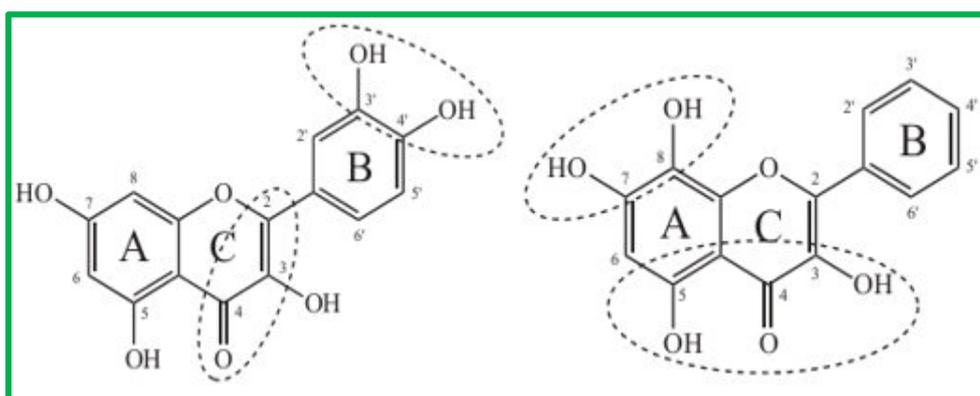
Des études biologiques approfondies effectuées sur les flavonoïdes ont révélé leurs effets bénéfiques sur la santé, en particulier dans la prévention de différentes maladies. Ces molécules présentent des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et des propriétés antivirales, anti-allergiques et anticancérigènes (**Figure II.5.**) (Hernández-Rodríguez *et al.*,2019 ; Ekalu & Habila.,2020 ; peisky *et al.*,2022).

D'après une étude bibliographique effectuée par Ekalu & Habila.,2020 sur les pourcentages des activités pharmacologiques des flavonoïdes issus de 22 familles de plantes sélectionnées a montré que cette classe de composé possède de nombreuses activités présentant un intérêt en thérapeutique dont la capacité antioxydante des flavonoïdes est représentée par 30% permettant la protection de l'organisme contre les radicaux libres (**Figure II.5.**).



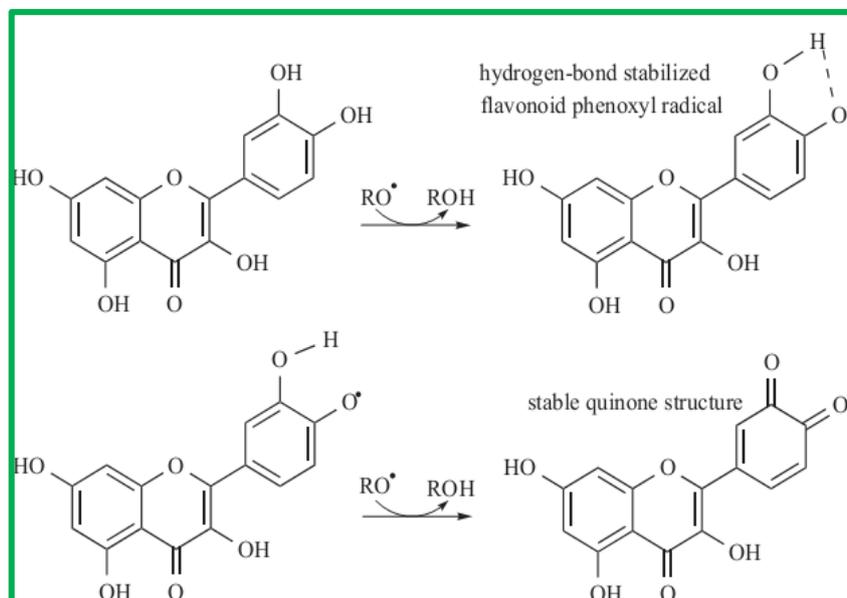
**Figure II.5.** Représentation des pourcentages des différentes activités biologiques des flavonoïdes (Ekalu & Habila.,2020).

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence des éléments structuraux des flavonoïdes nécessaires à l'obtention d'un pouvoir antioxydant qui dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels (Amic *et al.*,2007 ; Procházková *et al.*, 2011 ; Banjarnahor & Artanti .,2014 ; Hernández-Rodríguez *et al.*,2019) (**Figure II.6.** ):



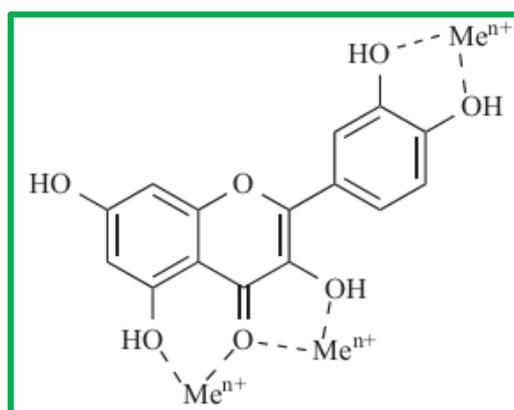
**Figure II.6.** Les éléments structuraux essentiels pour l'obtention d'un pouvoir antioxydant des flavonoïdes (Amic *et al.*,2007)

- La structure O-dihydroxy (3',4'-diOH) sur le cycle B, qui confère une grande stabilité aux radicaux flavonoïdes phénoxyles via une liaison hydrogène ou par délocalisation élargie des électrons (Amic *et al.*,2007 ; Procházková *et al.*,2011 ; Banjarnahor & Artanti.,2014 )



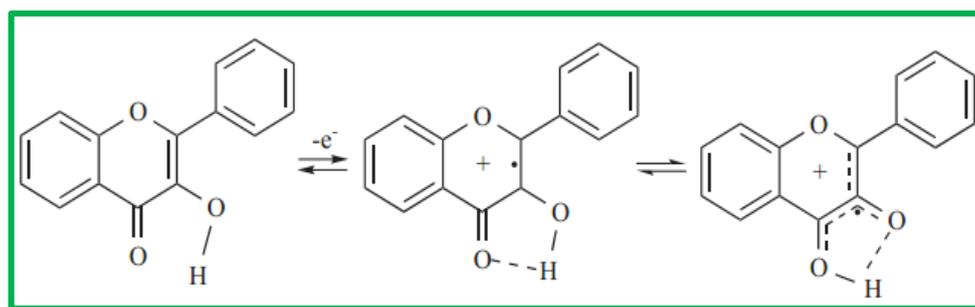
**Figure II.7.** Mécanisme d'action antioxydante des flavonoïdes (3',4'-diOH)

- La double liaison C2-C3(en conjugaison avec le groupe 4-oxo) confère à la molécule une délocalisation électronique stabilisante (Amic *et al.*,2007 ; Procházková, *et al.*, 2011 ; Banjarnahor & Artanti.,2014 )



**Figure II.8.** Sites de chélation des ions métalliques (M) des flavonoïdes

- La présence des groupes 3-OH et 5-OH pour la capacité maximale de piégeage des radicaux et plus forte absorption des radicaux (Amic *et al.*,2007 ; Procházková *et al.*, 2011)



**Figure II.9.** Mécanisme d'action antioxydante des hydroxyflavones C3-OH ou C5-OH

- En l'absence du groupement O-dihydroxy sur le cycle B, les substituants hydroxyle dans une structure catéchol sur le cycle A sont capables de compenser cette absence et assurer une meilleure activité antiradicalaire des flavonoïdes.
- Le blocage du groupe hydroxy en position C-3 ou l'élimination du groupe 3-OH diminue les propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Amic *et al.*, 2007)

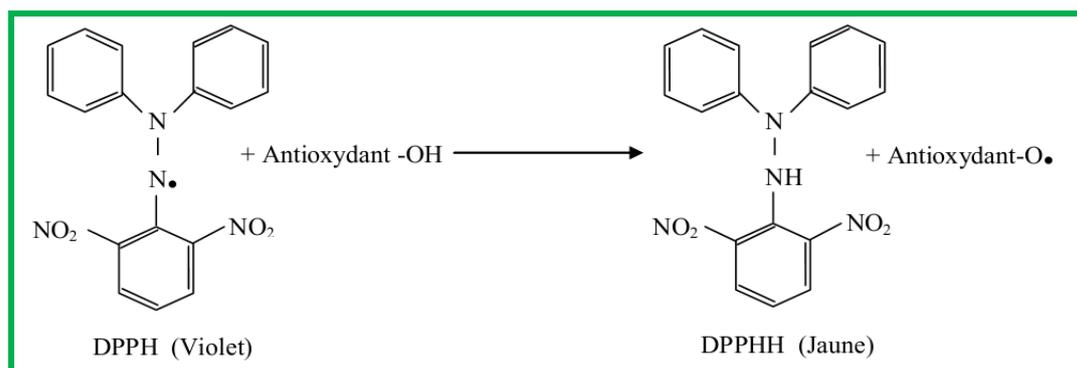
## 5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation du pouvoir antioxydant et anti radicalaire peut se faire par de nombreuses méthodes *in vitro* et *in vivo*. Ces techniques sont différentes les unes des autres par les réactifs utilisés, les conditions d'application, les protocoles utilisés ainsi que le mécanisme d'action par lequel l'extrait ou la molécule testé se manifeste dans le milieu.

Parmi les tests simples les plus fréquemment utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*, nous citons :

### 5.1. Test au DPPH

Le DPPH est un radical libre stable d'une coloration violette, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH\* est réduit en diphényl picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (**Figure II.10**). Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Fadili *et al.*, 2017).

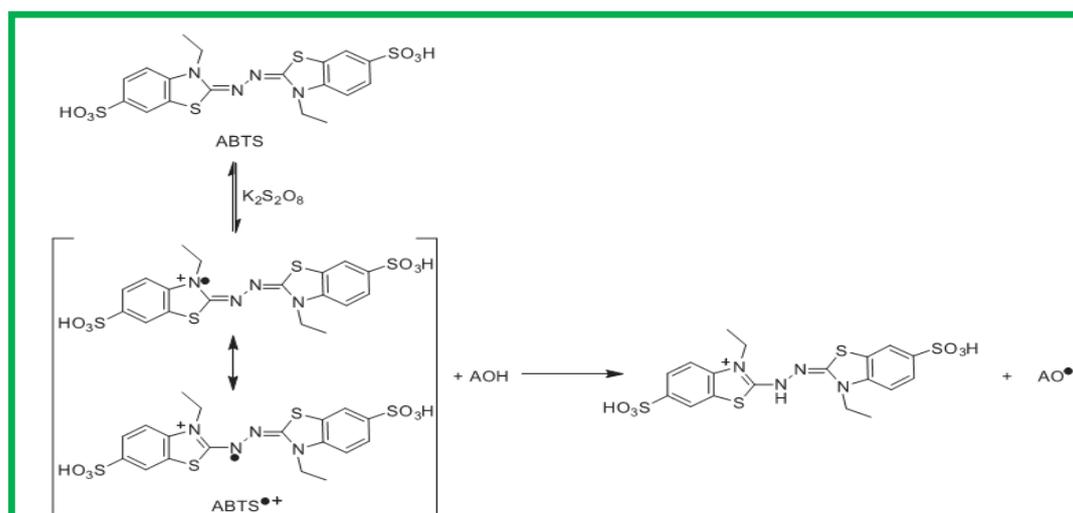


**Figure II.10.** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Talbi *et al.*,2015)

## 5.2. Test d'ABTS

La méthode du radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) pour former le radical cationique ABTS $^{•+}$  de coloration bleu-vert (**Figure II.11.**). L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS $^{•+}$  en ABTS.

L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical ABTS $^{•+}$  présente une bande d'absorption caractéristique. (Marc *et al.*,2004; Sarr *et al.*,2015).

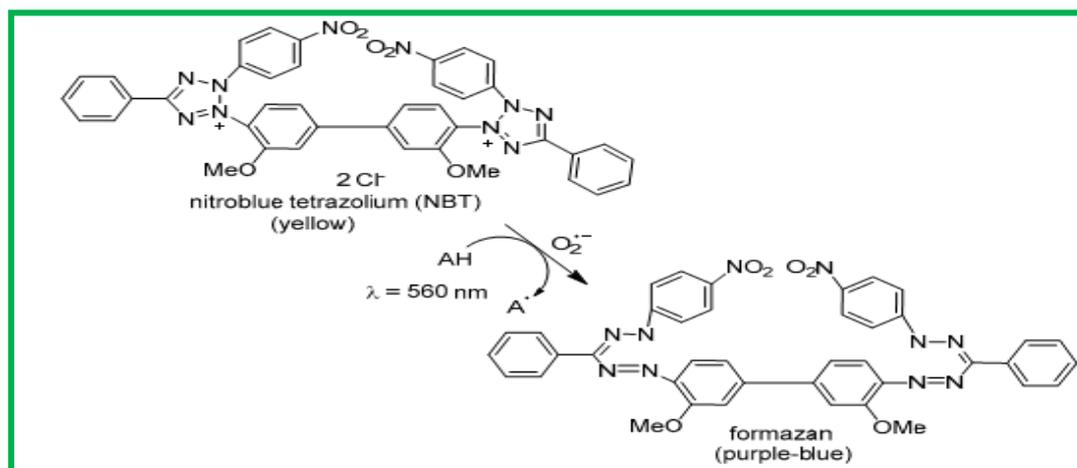


**Figure II.11.** Formation et piégeage du radical ABTS $^{•+}$  par un antioxydant (Oliveira *et al.*,2014)

### 5.3. Test de DMSO alcalin

Ce test permet d'évaluer par spectrophotométrie la capacité de l'extrait antioxydant à capturer l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), ce qui empêchera la réduction du nitro bleu tetrazolium (NBT) en bleu de formazan (**Figure II.12**) (Parejo *et al.*, 2002). En effet, la génération de ce radical anionique stable est favorisée par l'alcalinisation du DMSO. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage de réduction du  $NBT^{2+}$  par rapport à un témoin constitué d'un milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant (Vindhya & Leelavathi .,2015).

Dans cette méthode, la concentration en superoxyde dans le système alcalin DMSO correspond à la concentration en oxygène dissous dans du DMSO. Dans les vaisseaux étroitement bouchés, le radical superoxyde est stable plus de 24 heures ; pourtant dans les vaisseaux ouverts sa concentration diminue rapidement. En bref, le radical superoxyde a été généré dans des systèmes non-enzymatiques (Harput *et al.*, 2011).

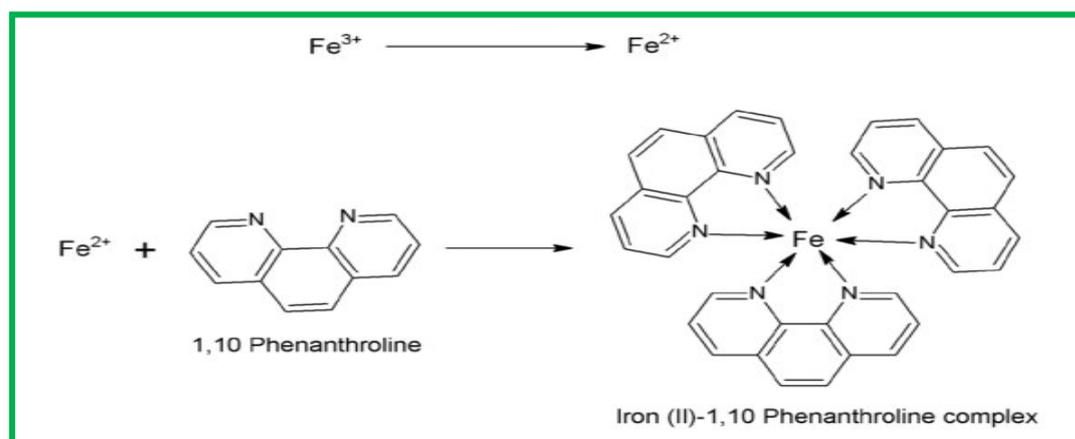


**Figure II.12.** Mécanisme réactionnel de l'activité de piégeage des anions radicalaires superoxyde (Santos & Silva .,2020).

### 5.4. Test de phénanthroline

Le contenu total de non enzymatique antioxydant peut être mesuré par la capacité du composés / échantillons à réduire Fe (III) par plusieurs ligands capables à complexé Fe (II). Dans cette étude, nous avons utilisé 1,10 phénanthroline comme ligand. Le complexe Fe-phénanthroline est stable au pH entre 2-9.

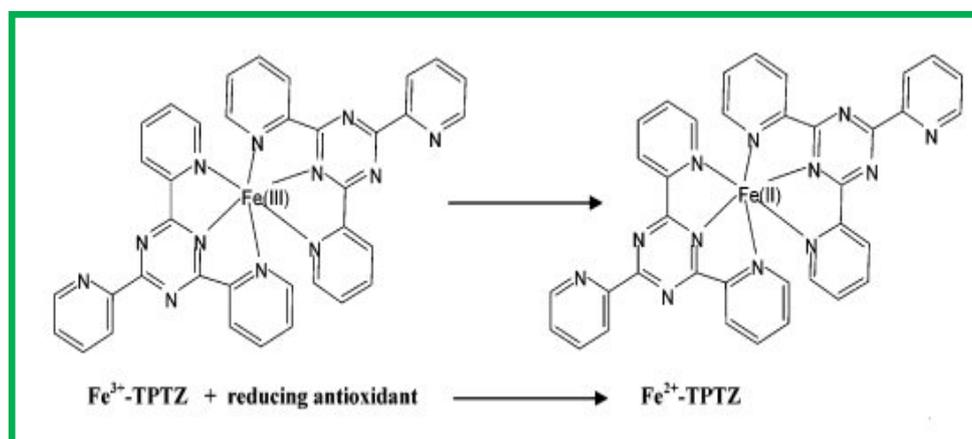
Le réactif formé avec les ions Fe (II) est un complexe de couleur orange très intense, ou rouge avec maximum d'absorption de 510 nm. La réaction de formation du complexe s'écrit comme suit :



**Figure II.13.** Formation du complexe  $Fe^{+2}$ -phénanthroline (Seshamamba & Sekaran.,2017)

## 5.5. Test de FRAP

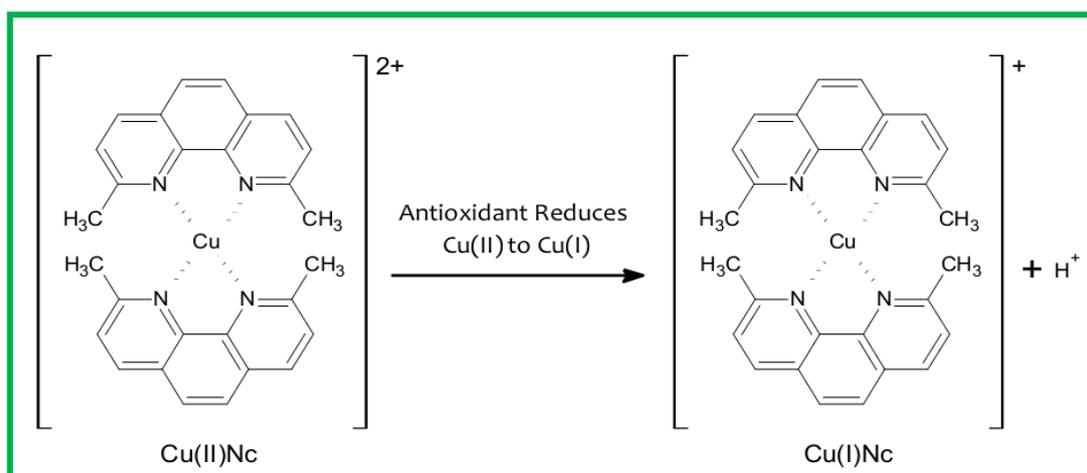
Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti radicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (donne une couleur bleue) qui est l'un des mécanismes antioxydants (**Figure II.14.**). C'est une technique rapide, facile et reproductible. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à une longueur d'onde de 700 nm (Bentabet *et al.*,2014 ; Mbaïhougadobé *et al.*,2017).



**Figure II.14.** Schéma de la réaction du test FRAP (Prior *et al.*,2005)

## 5.6. Test de CUPRAC

La capacité antioxydante réduisant les ions cuivriques (CUPRAC) a été déterminée selon la méthode d'Öztürk (Öztürk M. et al. 2011). Ce test est basé sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [ $\text{Nc}_2\text{-Cu}^{2+}$ ] lorsqu'il est réduit par un antioxydant. Le potentiel de la réduction de l'échantillon ou de l'étalon convertit efficacement  $\text{Cu}^{+2}$  en  $\text{Cu}^{+1}$  (**Figure II.15**). Cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm.



**Figure II.15.** Réduction du complexe neocuproïne/copper(II). (Öztürk *et al.* 2011)

**Références bibliographiques**

**Afonso, V.**, Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.

**Amic, D.**, Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., & Trinajstic, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845.

**Amiot, M. J.**, Riollet, C., & Landrier, J. F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique : Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des maladies métaboliques*, 3(5), 476-482.

**Banjarnahor, S.D., & Artanti, N.** (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 39-44.

**Bentabet, N.**, Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.

**Collin, F.** (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 20, 7-24.

**Dangles, O.** (2020). Le potentiel antioxydant des aliments : mythes et réalités. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(4), 176-183.

**Defraigne, J. O.**, & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.

**De Moffarts, B.**, Kirschvink, N., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149(1), 1-9. Annales Médecine Vétérinaire.

**Donaghy, L.**, Hong, H. K., Jauzein, C., & Choi, K. S. (2015). The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & shellfish immunology*, 42(1), 91-97.

**Ekalu, A., & Habila, J. D.** (2020). Flavonoids : isolation, characterization, and health benefits. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), 1-14.

**Fadili, K.**, Zerkani, H., Amalich, S., & Zair, T (2017). Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante des feuilles et des fruits du *Capparis spinosa* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*,5, 108-118.

**Filaire, E.**, & Toumi, H. (2012). Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice physique sur le métabolisme osseux : amis ou ennemis ? *Revue du rhumatisme*, 79(5), 387-392.

**Fleuriet, A.**, Uhel, C., & Dédaldéchamp, F. (1996). Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme. *Acta botanica gallica*, 143(6), 493-500.

**Harput, Ü. Ş.**, Genç, Y., Khan, N., & Saraçoğlu, İ. (2011). Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec. Nat. Prod*,5(2),100-107.

**Hernández-Rodríguez, P.**, Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019). Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive compounds* (pp. 265-288). Woodhead Publishing.

**Gardès-Albert, M.** (2006). Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. In *Annales pharmaceutiques françaises* ,64(6), 365-372. Elsevier Masson.

**Ghedadba, N.**, Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.

**Goudable, J.**, & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.

**Koechlin-Ramonatxo, C.** (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

**Ladoh, Y. C. F.**, Dibong, S. D., Nyegue, M. A., Djembissi, T. R. P., Lenta, N. B., Mpondo, M. E., ... & Wansi, J. D. (2014). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84, 7636-7643.

**Leverve, X.** (2009). Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.

**Marc, F.**, Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.

**Mbàihougadobé, S.**, Ngakegni-Limbili, A. C., Gouollaly, T., Koane, J. N., Ngaïssona, P., Loumpangou, C. N., & Ouamba, J. M. (2017). Evaluation de l'activité anti-oxydante de trois espèces de plantes utilisées dans le traitement de la goutte au Tchad. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 18(2), 28-35.

**Migdal, C.**, & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.

**Ojeil, A.**, El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P. B., Rizk, T. J., & Maroun, R. G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château KSARA. *Lebanese Science Journal*, 11(2), 117-131.

**Oliveira, S. D.**, Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A. & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37,497-503.

**Öztürk, M.**, Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., & Özler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three Agaricus species with fatty acid compositions and iron contents : A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353-1360.

**Parejo, I.**, Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.

**Phaniendra, A.**, Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals : properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.

**Pincemail, J.**, Heusele, C., Bonté, F., Limet, R., & Defraigne, J. O. (2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act Med Int*, 4, 18-23.

**Pincemail, J.**, Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.

**Popovici, C.,** Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.

**Prior, R. L.,** Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

**Procházková, D.,** Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

**Santos, C. M., & Silva, A.** (2020). The antioxidant activity of prenylflavonoids. *Molecules*, 25(3), 696.

**Sarr, S. O.,** Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., & Diop, Y. M. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263-1269.

**Seshamamba, B. S. V., & Sekaran, C. B.** (2017). Spectrophotometric Analysis for the Quantification of Rivaroxaban in Bulk and Tablet Dosage Form. *Int. J. Med. Pharm. Sci*, 7, 21-34.

**Speisky, H.,** Shahidi, F., Costa de Camargo, A., & Fuentes, J. (2022). Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxidants*, 11(1), 133.

**Talbi, H.,** Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *J Mater Environ Sci*, 6, 1111-1117.

**Vamecq, J.,** Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du pharmacologue (Boulogne)*, 18(1), 16-23.

**Vindhya, K., & Leelavathi, S.** (2015). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of *Gardenia gummifera* Linn. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 32, 255-61.

**Zydorczyk, C.,** Mitanchez, D., Buffat, C., Ligi, I., Grandvullemin, I., Boubred, F., & Simeoni, U. (2015). Stress oxydant chez l'enfant prématuré : causes, biomarqueurs et possibilités thérapeutiques. *Archives de Pédiatrie*, 22(10), 1047-1055.

## **Chapitre III :**

# **Matériel et méthodes**

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Origine du matériel végétal

La plante *N. glauca* Graham a été récoltée au mois d'Avril 2016 de la région de «Hodna» qui situe dans la wilaya de M'sila (Algérie). L'identification a été faite par Dr.Rebbas Khellaf, département de Biologie, Université de M'sila. Les feuilles de la plante ont été séchées dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires.

### 1.2. Extraction

Le matériel végétal de masse 1 Kg a subi une macération dans un mélange (MeOH-H<sub>2</sub>O) dont les proportions (70 : 30; V/V) pendant 72 heures. L'extrait récupéré est filtré et concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 45°C puis dilué dans un volume de 500 ml d'eau distillée. Une décantation pendant une nuit permet le dépôt de la chlorophylle. La solution obtenue subit des extractions liquide-liquide par des solvants de polarité croissante : le dichlorométhane (**DCM**), l'acétate d'éthyle (**AE**) et le *n*-butanol (***n*-BuOH**) successivement. Les trois extraits organiques récupérés sont concentrés et pesés conduisant à 3,09 g de l'extrait dichlorométhane 6,08 g de l'extrait acétate d'éthyle et 33,94 g de l'extrait *n*-BuOH (**Figure.III.1.**)

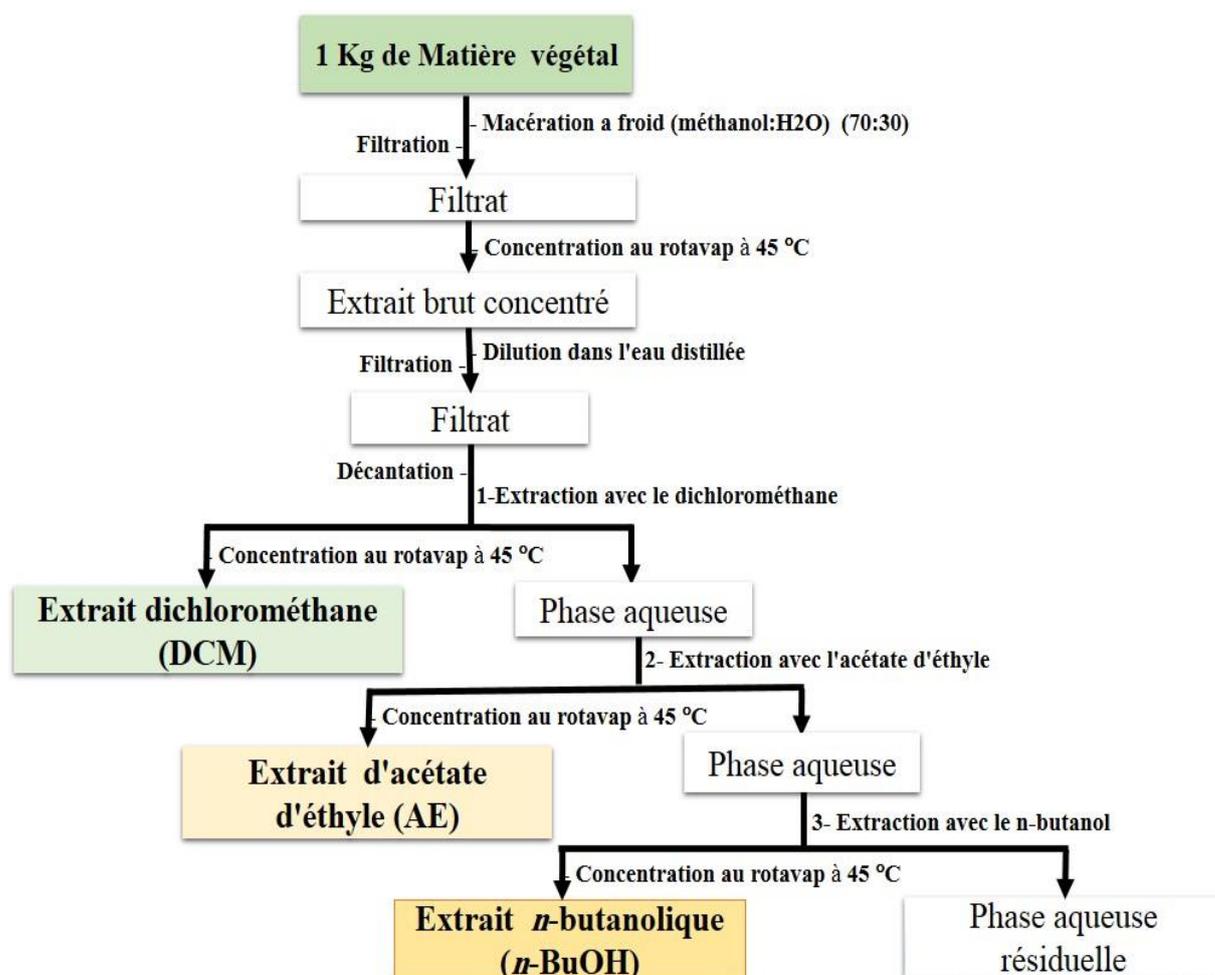


Figure III.1. Les étapes d'extraction des différents extraits de *N.glauca*

### 1.3. Calcul du rendement

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage. En pratique, il est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la poudre de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100. Ceci se traduit par la formule suivante :

$$\text{Rd} = (m \times 100) / M$$

**Rd** : rendement d'extraction en pourcentage,

**m** : masse en gramme de l'extrait sec,

**M** : masse en gramme de la poudre de la matière végétale.

## 2. Analyses qualitative par screening phytochimique

Le screening phytochimique permet de mettre en évidence la présence des groupes des familles chimiques dans une plante donnée. Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit par la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit par la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (EL-Haoud *et al.*,2018). Les résumés des réactions sont reportés dans le **tableau III.1.**

Tableau III.1. Tableau synthétique de groupes chimiques, réactions d'identification et indicateurs utilisés

Groupes chimiques	Réactifs d'identification	Indicateur (réaction positive)	Références
phénols	0,5 mL de la solution d'extrait+ 5 mL de réactif de Folin Ciocalteu + 4mL carbonate de sodium aqueux	apparition d'une coloration bleue.	Prakash <i>et al.</i> ,2015
Flavonoïdes	5 mL d'extrait aqueux + quelques morceaux de magnésium + HCl concentré	apparition d'une coloration rose	Gul,R <i>et al.</i> ,2017; Gnahoué <i>et al.</i> ,2015
Tannins	5 mL de la solution d'extrait +1mL de FeCl <sub>3</sub> à 5%.	formation d'un précipité noir bleuâtre ou noir verdâtre.	Ganatra &Gurubaxani.,2016
Phlobatannins	Bouillir 2ml de la solution d'extrait avec 2 mL de HCl à 1% dans un tube à essai bouillant.	formation d'un précipité rouge	Prakash <i>et al.</i> ,2015; Ganatra&Gurubaxani.,2016
Coumarines	2mL de la solution d'extrait +3mL de NaOH à 10%	apparition d'une coloration jaune	Ganatra &Gurubaxani.,2016
Terpenoides	2mL de la solution d'extrait +2 mL d'acide anhydride + 2à 3 gouttes de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	formation d'un précipité brun rougeâtre à l'interphase	
Steroides	1mL de la solution d'extrait + 10 mL de chloroforme + 10 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré.	apparition d'une couleur rouge de la couche supérieure et la couleur jaune avec une fluorescence verte dans la couche acide.	
Alkaloids	5mL de la solution d'extrait + 3-5 gouttes de réactif de Wagner	apparition d'un précipité brun rouge (ou coloration).	Sushama,Raj.,2017
Saponines	2mL de la solution d'extrait + 20 mL d'eau distillée dans un cylindre gradué + agitation et laisser le mélange au repos pendant 15min.	formation d'une couche de mousse de 1 cm.	
Quinones	2mL de la solution d'extrait + HCl concentré.	formation d'un précipité jaune (ou coloration).	

Les solutions présentant ces indicateurs ont une réaction positive et cela signale la présence de groupes chimiques dans la plante (Gnahoué *et al.*,2015)

### 3. Analyse quantitative par dosage

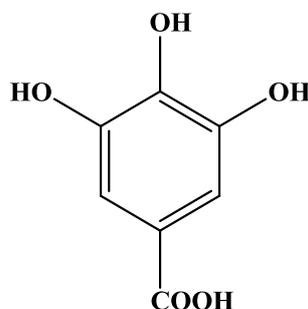
#### 3.1. Dosage des polyphénols

- **Principe**

La méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée pour le dosage des composés phénoliques totaux. L'ensemble de ces composés est oxydé par le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier, de couleur orange, est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue obtenue est proportionnelle au taux de composés phénoliques. L'absorbance est mesurée à 750 nm (Ojeil *et al.*, 2010).

- **Mode opératoire**

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu sur microplaque de 96 puits (Singleton *et al.*, 1965). Un volume de 100  $\mu$ L d'une solution de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10ème) est ajouté à 20  $\mu$ L de chaque extrait (1 mg d'extrait dissout dans 1 mL de méthanol). Puis, 75  $\mu$ L de bicarbonate de sodium à (7.5%) sont ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 740 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Müller *et al.*, 2010). Trois répétitions ont été réalisées. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g).

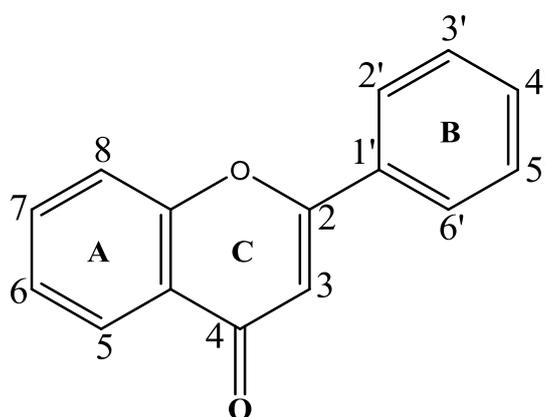


**Figure III.2.** structure de l'acide gallique

### 3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Bag *et al.*,2015; Ali-rachedi *et al.*,2018). La coloration jaunâtre obtenue est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes totaux et possède une absorption maximum à 415 nm (Ali-rachedi *et al.*,2018).



**Figure III.3.** Structure de base des flavonoïdes

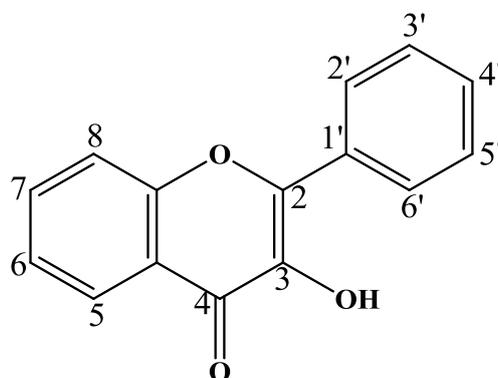
- **Mode opératoire**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium de (Topçu *et al.*,2007) avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits. A un volume de 50µL de chaque extrait, 130 µL de méthanol, 10µL acétate de potassium (1M) et 10µL d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (10% dans le méthanol) ont été ajoutés. L'ensemble est incubé à l'ombre à température ambiante pendant 40 minutes, l'absorbance est lue à 415 nm. Le test est répété trois fois. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine (EQ) par gramme d'extrait (mgEQ/g) (Rafi *et al.*, 2018).

### 3.3. Dosage des flavonols

- **Principe**

Le dosage différentiel des flavonols est basé sur la chélation spécifique des flavonoïdes par les ions  $Al^{3+}$ . Dans la cuve de référence est placée la solution alcoolique convenablement diluée. Dans la cuve de mesure est placée la solution alcoolique amenée à la même dilution mais avec une solution alcoolique d' $AlCl_3$  à 1%. Après 10 mn d'incubation, le spectre est enregistré au spectrophotomètre UV-visible entre 380 et 460 nm pour les aglycones. La présence des flavonols est indiquée par un pic entre 420 et 440 nm. La hauteur du pic différentiel est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques (Alilou *et al.*,2014).



**Figure III.4.** Structure de base des flavonols

- **Mode opératoire**

La méthode de trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  décrite par (Kumaran *et al.*,2007) est utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits sur une microplaque de 96 puits. Une quantité de 50  $\mu$ L de chaque extrait a été mélangée avec 50  $\mu$ L d'une solution d' $AlCl_3$  (20mg/ml dans l'eau distillée) et par la suite avec 150  $\mu$ L d'une solution d'acétate de sodium (50mg/mL dans l'eau distillée). L'ensemble est incubé à l'ombre à température ambiante pendant 2,5 heures. L'absorbance est lue à 440 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Kibiti & Afolayan.,2015). La quantification des flavonols se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g). Le test a été répété trois fois.

## 4. Analyse par spectrométrie de masse et ses couplages

### 4.1. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification (Shelke *et al.*,2012). Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision. Ces ions proviennent de la molécule à analyser qui se fragmentent pour donner des ions fils en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser. Il est donc possible, avec cette méthode d'obtenir des informations structurales dans un graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport  $m/z$  (Menet.,2011 ; Shelke *et al.*, 2012).

Le spectromètre de masse est un détecteur sensible et facile à coupler à des méthodes séparatives telles que la chromatographie liquide à haute performance CLHP (ou HPLC en langue anglaise). L'utilisation croissante des spectromètres de masse en tandem (présence de plusieurs analyseurs) a permis d'augmenter la richesse des informations et donc d'augmenter la spécificité.

### 4.2. La masse couplée à l'HPLC (LC/MS)

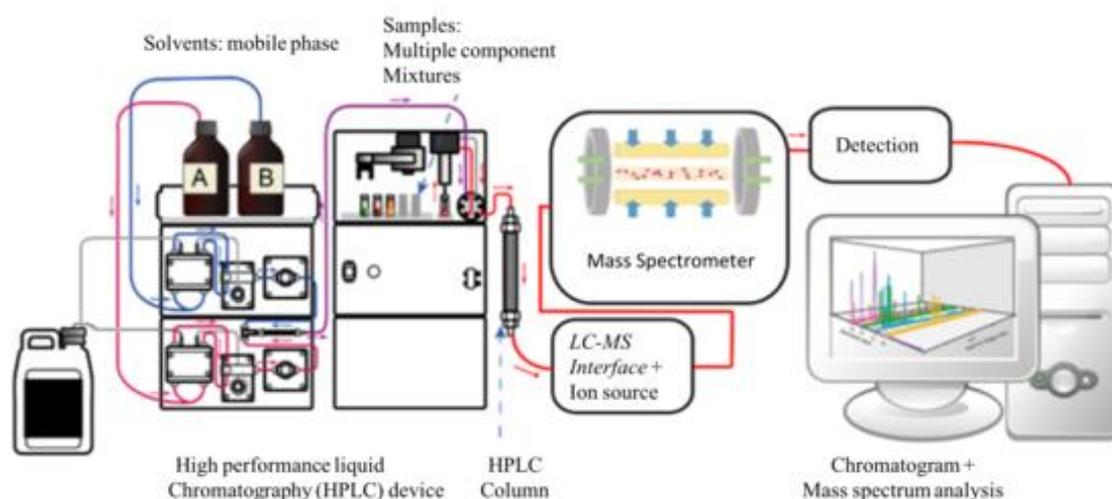
Depuis quelques années, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) s'est imposée dans les laboratoires et est devenue un outil incontournable. Le couplage autorise l'analyse d'une plus grande gamme de molécules, notamment les plus polaires, sans devoir procéder à une étape de dérivation, qu'il est nécessaire d'adapter aux groupements fonctionnels des molécules à identifier (Richeval *et al.*,2011)

Alors que la chromatographie liquide sépare les mélanges contenant plusieurs composants, la spectrométrie de masse fournit une identité structurale des composants individuels avec une spécificité moléculaire et une sensibilité de détection élevées (Kumar & Vijayan .,2014 ; Bhatti & Puri.,2019)

- **Principe LC-MS**

Un spectromètre de masse est composé de trois éléments majeurs : une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur (**Figure III.5**) (Grangeon.,2017).

L'échantillon est séparé par LC et les composés séparés sont pulvérisés dans une source d'ions à pression atmosphérique, ou ils sont transformés en ions en phase gazeuse. L'analyseur de masse ensuite utilisé pour trier les ions en fonction de leur rapport de masse à charge  $m/z$  et le détecteur compte les ions sortant et peut également amplifier le signal généré par chaque ion (Kumar & Vijayan .,2014).

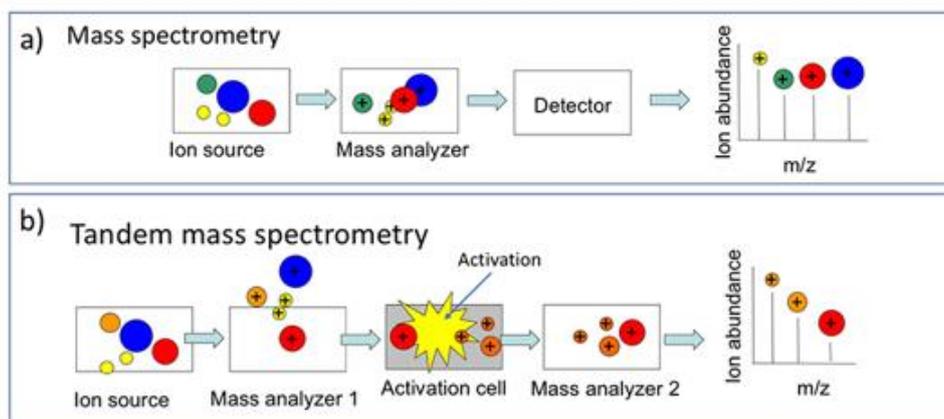


**Figure III.5.** Schéma d'un système LC-MS

### 4.3. Spectrométrie de masse tandem (LC/MS/MS)

La chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS) est une technique analytique puissante qui associe le pouvoir de séparation de la chromatographie en phase liquide à la capacité d'analyse de masse hautement sensible et sélective de la spectrométrie de masse à triple quadripôle (Grebe & Singh, R.,2011).

La force de cette technique réside dans le pouvoir de séparation des LC pour une large gamme de composés, combiné à la capacité de la SM à quantifier les composés avec un degré élevé de sensibilité et de sélectivité, en fonction des transitions uniques masse / charge ( $m/z$ ) de chaque composé d'intérêt (Grangeon.,2017).

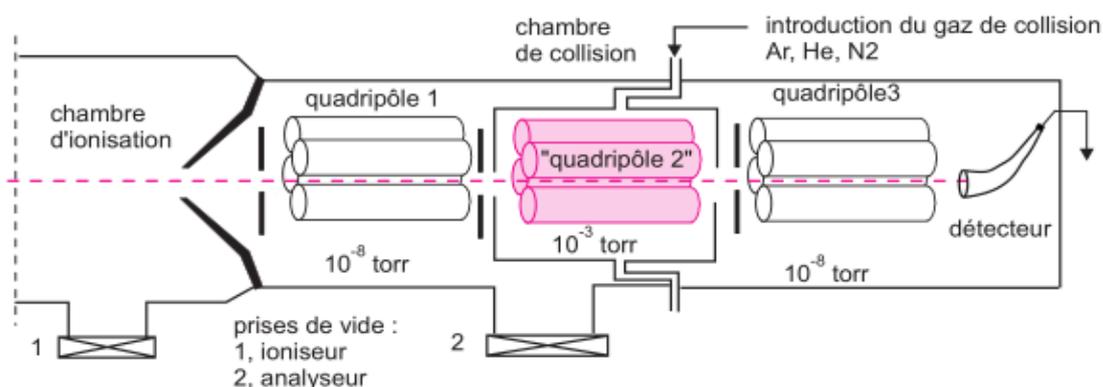


**Figure III.6.** Schémas de principe du fonctionnement des techniques de spectrométrie de masse « simple » (a) et en tandem (b)

Le tandem MS/MS se différencie de la MS par une deuxième spectrométrie de masse pour obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments (**Figure III.6.**)

- **Principe de la spectrométrie de masse en tandem de quadripôles (MS/MS)**

La spectrométrie de masse en tandem utilise une cellule de collision pour fragmenter les ions sélectionnés dans le premier filtre quadripolaire. Dans la cellule de collision, les ions de masse / charge sélectionnés sont ensuite fragmentés en ions de produit (ou ions filles) par collision avec un gaz inerte. Le troisième quadripôle est utilisé pour cibler des fragments d'ions spécifiques. Les ions produits isolés qui en résultent sont ensuite quantifiés avec un multiplicateur d'électrons (**Figure III.7.**) Cette transition des ions du précurseur au produit (appelée aussi  $MS^2$ ) est très spécifique à la structure du composé d'intérêt et offre donc un degré élevé de sélectivité. (Marquet., 2005 ; Grebe & Singh.,2011).



**Figure III.7.** Principe de la LC -MS/MS quadripolaire.

## 5. Evaluation du potentiel antioxydant

Dans ce présent travail, six méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits et du composé isolé ; DPPH, ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline, FRAP et CUPRAC.

- **Préparation des solutions d'extraits végétaux à tester :**

Sept dilutions successives d'un facteur de 2 de chaque extrait et du composé isolé ont été préparées à partir d'une solution mère méthanoliques à 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Pour les tests, la première gamme des concentrations (50 à 0,781 µg.mL<sup>-1</sup>) pour le test DPPH, la deuxième gamme des concentrations (200 à 3,125 µg.mL<sup>-1</sup>) pour les tests : ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline et CUPRAC et la troisième gamme des concentrations (800 à 12,5 µg.mL<sup>-1</sup>) pour le test FRAP ont été préparées dans le méthanol.

### 5.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire par le test DPPH

Les tests ont été réalisés selon le protocole décrit par (Blois.,1958). Dans une microplaque à 96 puits de volume 200 µl pour chaque puits, 40µL de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (ou des antioxydants standards) sont ajoutés à 160 µL de la solution méthanolique de DPPH (0,04mg/mL).

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 40µL de méthanol avec 160 µL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante (Nagmoti *et al.*,2012; Ru *et al.*,2012; Mathangiand & Prabhakaran .,2013)..Trois essais ont été réalisés pour chaque concentration, puis la moyenne des trois mesures a été calculée.

BHA et BHT sont utilisés comme contrôles positifs et ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons.

## 5.2. Détermination de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS

La méthode utilisée a été celle décrite par Re et al., 1999. Une quantité de 19.2 mg (7mM) d'ABTS a été préalablement dissoute dans 5 mL d'eau avant l'ajout de 3.3 mg (2,45mM) de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) dissout dans 5 mL d'eau.

Le mélange obtenu a été conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12- à 16 h avant utilisation. Il a été par la suite dilué avec l'eau afin d'obtenir une absorbance de l'ordre de  $0,700 \pm 0,020$  à 734 nm (Sarr *et al.*, 2015)

Sur une microplaque l'activité antioxydante a été mesurée en additionnant 40 $\mu$ l de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (ou des antioxydants standards) à 160  $\mu$ L de la solution (ABTS<sup>+</sup>) que préparé à partir de l'ABTS et du persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). BHA et BHT, utilisés comme contrôles positifs, ont été testés aux mêmes concentrations. La lecture de l'absorbance a été faite au bout de 10 minutes au spectrophotomètre à 734 nm, en remplaçant les extraits par le méthanol comme contrôle négatif. Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée (Packialakshmi *et al.*, 2015).

## 5.3. Détermination de l'activité antioxydante par Superoxyde DMSO alcalin

L'activité de piégeage des radicaux superoxydes DMSO alcalin des extraits a été déterminée selon la méthode de Kunchandy (Kunchandy *et al.*, 1990). Le mélange réactionnel contenant 40  $\mu$ L de différentes concentrations de chaque extrait et des composés standards ont été dissous dans du DMSO et 130  $\mu$ L de DMSO alcalin (100 mL de DMSO contenant 20mg de NaOH dans 1 mL d'eau), 30  $\mu$ L de NBT (solution à 1 mg / mL dans H<sub>2</sub>O) a été ajouté pour donner un volume final de 200  $\mu$ L et l'absorbance a été mesurée à 560 nm en utilisant un lecteur de microplaques. La diminution de l'absorbance à 560 nm avec des antioxydants a indiqué la consommation de superoxyde généré (Harput *et al.*, 2011; Vindhya & Leelavathi., 2015).

L'activité scavenger de superoxyde des extraits a été déterminée en comparant le degré de réduction du NBT avec de contrôle blanc consistait en pur DMSO au lieu de DMSO alcalin. Trois essais ont été réalisés pour chaque concentration, puis la moyenne des trois mesures a été calculée. Acide tannique et  $\alpha$ -Tocophérol pris comme contrôles positifs ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons.

#### 5.4. Détermination de l'activité antioxydante par le test Phénantroline

Le test de phénantroline a été utilisé pour déterminer le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les extraits selon la méthode décrite par (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008). Dans une microplaque, 10  $\mu\text{L}$  extrait à différentes concentrations (ou des antioxydants standards), 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer (0,2%) et 30  $\mu\text{L}$  d'une solution de 1, 10-phénanthroline (0,5%) ont été mélangés et le volume final a été portée à 200  $\mu\text{L}$  par l'ajoute de méthanol (110  $\mu\text{L}$ ). Le mélange réactionnel ensuite a été incubé à 30°C dans l'obscurité pendant 20 minutes. L'absorbance des échantillons a été lue à 510 nm contre un réactif à blanc (en remplaçant les extraits par le méthanol) (Re *et al.*, 1999; Sushama., 2017). Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée et pour BHA et BHT qui sont utilisés comme standard.

#### 5.5. Détermination de l'activité antioxydante par le test FRAP

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu., 1986). Dans une microplaque, 10  $\mu\text{L}$  extrait à différentes concentrations (ou des antioxydants standards) est mélangé avec 40  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH : 6, 6) et avec 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1 %, puis l'incubation des tubes à été réalisée à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 50  $\mu\text{L}$  d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction. La microplaque centrifugée à 3 000 tours/minute pendant dix minutes. Nous ajoutons ensuite au mélange 40  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 0,1 % fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm, en remplaçant les extraits par le méthanol comme contrôle négatif. Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Dudonne *et al.*, 2009; Stanojević *et al.*, 2009 ; Bentabet *et al.*, 2014).

L'acide ascorbique, acide tannique et  $\alpha$ -tocophérol sont utilisés comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.

## 5.6. Détermination de l'activité antioxydante par le test CUPRAC

Le test CUPRAC est effectué dans une microplaque de 96 puits. 40  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations (ou des antioxydants standards) ont été mélangés avec 60  $\mu\text{L}$  d'Acétate d'ammonium (1M, pH= 7) ,50  $\mu\text{L}$  de néocuproïne (7,5 mM) et 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuCl}_2$  (10mM). Les solutions sont ensuite incubées pendant 60 minutes. L'absorbance est mesurée à 450 nm contre un réactif à blanc (en remplaçant les extraits par le méthanol). Trois répétitions ont été faits pour chaque concentration et les résultats ont été exprimés par la valeur moyenne de l'absorbance  $\pm$  écarts-types et comparés avec ceux des standards  $\alpha$ -Tocophérol, BHA (Öztürk *et al.*,2011 ;Rafi *et al.*,2018; Ru *et al.*,2012)

## 6. Expression des résultats

### 6.1. Pourcentage d'inhibition

- Pour l'activité de DPPH, ABTS et scavenger de superoxyde, l'inhibition a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec :

$A_0$  = Absorbance du contrôle négatif,

$A_1$  = Absorbance de l'extrait à une concentration donnée.

- Pour l'activité de phénantroline, FRAP et CUPRAC, les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,5 d'absorbance

### 6.2. Calcul des concentrations inhibitrice 50% " IC<sub>50</sub>"

La concentration inhibitrice 50% (IC<sub>50</sub>) est la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Elle a été déterminée graphiquement par la régression linéaire. Une faible valeur d'IC<sub>50</sub> d'un extrait indique la présence d'une activité antioxydante importante. (Bentabet *et al.*,2014 ;Kibiti & Afolayan.,2015; Awa *et al.*, 2018).

## **7. Analyse Statistique**

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type, en trois répétitions. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

**Références bibliographiques**

**Alilou, H.**, Bencharki, B., Hassani, L. I., & Barka, N. (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraveolens* subsp. *odorus*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(3), 316-328.

**Ali-Rachedi, F.**, Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 87, 13-21.

**Awa, D.**, Konan, Y., Youssouf, S., Honora, T., Adama, B., & Witabouna, K. (2018). Pouvoir antioxydant et teneurs en composés phénoliques de deux espèces du genre *Albertisia*: *Albertisia cordifolia* (Mangenot & J. Miège) Forman et *Albertisia scandens* (Mangenot & J. Miège) Forman (Menispermaceae). *European Scientific Journal*, 14(30), 128.

**Bag, G. C.**, Devi, P. G., & Bhaigyabati, T. H. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154-159.

**Bhatti, M., & Puri, R.** (2019). An overview on basic and advanced chromatographic techniques. *Journal of biomedical and pharmaceutical research*, 8(3), 29-33.

**Bentabet, N.**, Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.

**Blois, M. S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

**Dudonne, S.**, Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.

**EL-Haoud, H.**, Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., & Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique d'une plante medicinale: *Mentha spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7(4), 226-233.

**Ganatra, S.**, & Gurubaxani, S. (2016). Preliminary Ppytochemical and TLC profiling of *Lantana camara* leaf extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(15), 614-617.

**Gnahoué, G.**, Béné, K., & Coulibaly, K. (2015). Etude botanique, screening phytochimique et activité anticandidosique in vitro de *pycnanthus angolensis* (welw.) warb.(myristicaceae). *European Scientific Journal*, 11(36),241-252.

**Grangeon, A.** (2017). Développement de méthodes analytiques par LC-MS/MS pour la caractérisation de l'activité et de l'expression des CYP450s chez l'humain. Mémoire en pharmacologie.p42.

**Grebe, S. K.**, & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here?. *The Clinical biochemist reviews*, 32(1), 5-31

**Gul, R.**, Jan, S. U., Faridullah, S., Sherani, S., & Jahan, N. (2017). Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, 2017.

**Harput, Ü. Ş.**, Genç, Y., Khan, N., & Saraçoğlu, İ. (2011). Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec. Nat. Prod*,5(2),100-107.

**Kibiti, C. M.**, & Afolayan, A. J. (2015). Preliminary phytochemical screening and biological activities of *Bulbine abyssinica* used in the folk medicine in the Eastern Cape Province, South Africa. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

**Kumaran, A.**, & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344-352.

**Kumar, K. J.**, & Vijayan, V. (2014). An overview of liquid chromatography-mass spectroscopy instrumentation. *Pharmaceutical Methods*.Vol 5. Issue 2. 47-55.

- Kunchandy, E., & Rao, M. N. A.** (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International journal of pharmaceutics*, 58(3), 237-240.
- Marquet, P.** (2005). Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à la toxicologie. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 17, No. 1, pp. 5-12). EDP Sciences.
- Mathangiand, T., & Prabhakaran, P.** (2013). DPPH free radical scavenging activity of the extracts of the aquatic fern Marsilea quadrifolia Linn. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(10), 534-536.
- Menet, M. C.** (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires*, 2011(437), 41-53.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V.** (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- Nagmoti, D. M., Khatri, D. K., Juvekar, P. R., & Juvekar, A. R.** (2012). Antioxidant activity free radical-scavenging potential of Pithecellobium dulce Benth seed extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(2), 37-43.
- Ojeil, A., El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P. B., Rizk, T. J., & Maroun, R. G.** (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château KSARA. *Lebanese Science Journal*, 11(2), 117-131.
- Oyaizu, M.** (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., & Özler, M. A.** (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three Agaricus species with fatty acid compositions and iron contents : A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353-1360.
- Packialakshmi, B., Sudha, G., & Charumathy, M.** (2015). Total phenol, flavonoid and antioxidant properties of Auricularia Auricula-Judae. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(12), 233-237.

- Prakash, V.**, Saxena, S., Gupta, S., Saxena, A. K., Yadav, R., & Singh, S. K. (2015). Preliminary phytochemical screening and biological activities of *Adina cardifolia*. *J Microb Biochem Technol*, 7, 33-38.
- Rafi, M.**, Febriany, S., Wulandari, P., Suparto, I. H., Ridwan, T., Rahayu, S., & Siswoyo, D. M. (2018). Total phenolics, flavonoids, and anthocyanin contents of six *Vireya Rhododendron* from Indonesia and evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(09), 049-054.
- Re, R.**, Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Richeval, C.**, Wiart, J. F., Humbert, L., Orkil, A. M., Legeleux, O., & Lhermitte, M. (2011). Dosage des opiacés, de la cocaïne, des dérivés amphétaminiques et de leurs métabolites dans le sang total par SPE-UPLC/MS/MS. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 23, No. 4, pp. 175-182). EDP Sciences.
- Ru, Q. M.**, Wang, L. J., Li, W. M., Wang, J. L., & Ding, Y. T. (2012). In vitro antioxidant properties of flavonoids and polysaccharides extract from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Molecules*, 17(9), 11281-11291.
- Sarr, S. O.**, Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., ... & Diop, Y. M. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263-1269.
- Shelke, P. G.**, Tripathi, A. S., Dewani, A. P., Bakal, R. L., Mohale, D. S., & Chandewar, A. V. (2012). Liquid Chromatography in conjunction with Mass Spectrometry (LC-MS). *International journal of pharmaceutical and chemical sciences*, 1(3).1183-1189.
- Singleton, V. L.**, & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Stanojević, L.**, Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Čanadanovic-Brunet, J., & Tumbas, V. (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors*, 9(7), 5702-5714.

**Sushama Raj R.V.** (2017). Preliminary phytochemical screening of *Lantana camara*, L., a major invasive species of Kerala, using different solvents, *Annals of Plant Sciences*, 6(11), 1794-1798.

**Szydłowska-Czerniak, A.**, Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.

**Topçu, G.**, Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, 103(3), 816-822.

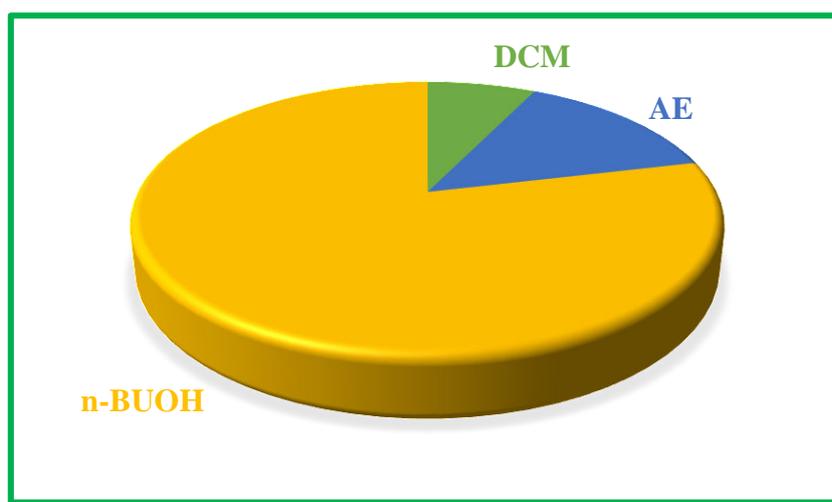
**Vindhya, K.**, & Leelavathi, S. (2015). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of *Gardenia gummifera* Linn. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 32, 255-61.

## **Chapitre IV :**

# **Résultats et discussion**

## 1. Rendement d'extraction

Afin d'obtenir l'extrait hydro alcoolique des feuilles de *N.glauca*, nous avons réalisés la méthode de partage liquide-liquide par des solvants organiques à polarité croissante. Cette méthode a permis d'obtenir trois extraits bruts : l'extrait dichlorométhane (DCM), l'extrait acétate d'éthyle (AE) et l'extrait butanolique (*n*-BuOH).



**Figure IV.1.** Rendement des extraits des feuilles de *N. glauca*

La **figure IV.1.** présente les résultats des rendements d'extraction qui varient de 0,309% à 3,394%. Pour cette espèce, l'extrait *n*-BuOH représente un rendement élevé (3,394%) suivi par l'extrait AE (0,608%) tandis que le plus faible est celui de l'extrait DCM, soit 0,309%. Donc, le rendement augmente avec la polarité du solvant d'extraction.

## 2. Composition qualitative des extraits

Les tests phytochimiques consistent à détecter les familles des métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Dans ces tests, l'intensité du précipité et de la coloration est proportionnelle à la quantité du composant recherché. Les résultats obtenus du screening phytochimique des différents extraits de *N.glauca* sont regroupés dans le **tableau IV.1.**

Tableau IV.1. Résultats du screening phytochimique des extraits de *N.glauca*.

Familles chimiques	Extraits de <i>N.glauca</i>		
	DCM	AE	<i>n</i> -BuOH
Polyphénols	++	++	+++
Flavonoïdes	-	++	+++
Tannins	-	++	++
Phlobatannins	-	-	-
Coumarines	+++	+	++
Terpènes	+++	-	-
Stéroïdes	-	++	++
Alcaloïdes	+++	-	-
Saponosides	-	-	-
Quinones	-	++	+++
+++ : Réaction très positive ; ++ : Réaction moyennement positive ; + : Réaction faiblement positive ; - : Réaction négative ;			

L'analyse qualitative des extraits issus de l'espèce *N.glauca* a révélé la présence de divers métabolites secondaires (polyphénols, tanins, flavonoïdes, coumarines, stéroïdes et quinones) dans les extraits AE et *n*-BuOH. Tandis que les alcaloïdes, les terpènes et les coumarines sont présents à une concentration élevée dans l'extrait DCM.

La faible quantité de coumarines était observée dans l'extrait AE et *n*-BuOH, tandis que les polyphénols présentent presque la même quantité dans les trois extraits.

L'analyse de l'extrait DCM montre l'absence des tannins et des stéroïdes mais une quantité plus au moins importante dans les autres extraits.

Une présence modeste des flavonoïdes et quinones ont été rapportées dans les extraits d'AE et de *n*-BuOH.

L'absence totale des phlobatannins et des saponosides dans les trois extraits.

Nos résultats concernant les groupes chimiques détectés dans les extraits de l'espèce *N.glauca* sont en accord avec ceux de Alghamdi et al qui a révélé une forte présence des alcaloïdes ,flavonoïdes, stéroïdes et tannins dans les extraits des feuilles, des tiges, des fleurs que dans les racines (Alghamdi.,2021).

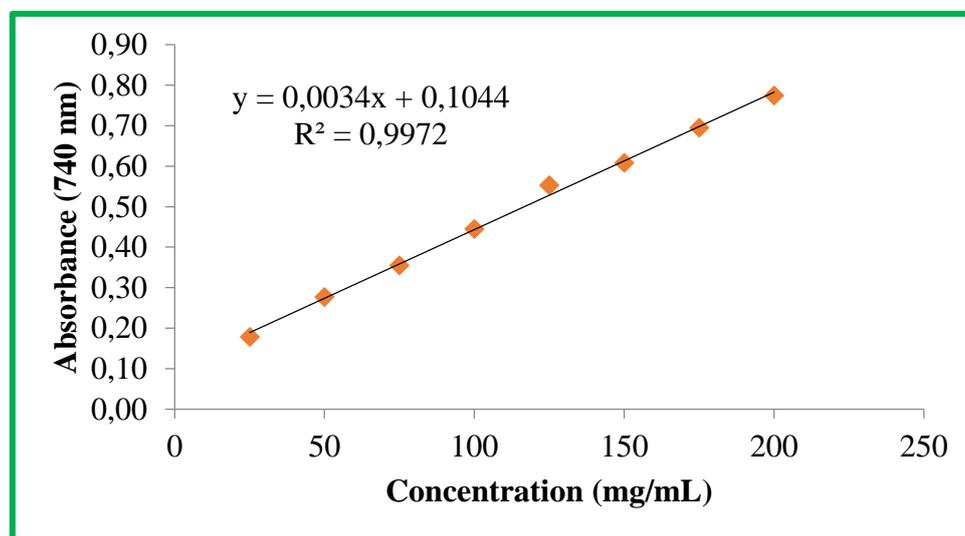
### 3. Composition quantitative des extraits

#### 3.1. Dosage des polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux

Les résultats de l'étude quantitative des extraits préparés à partir des feuilles de *N.glauca* en utilisant le dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols sont illustré dans le **tableau IV.2**.

##### 3.1.1. Teneur en phénols totaux

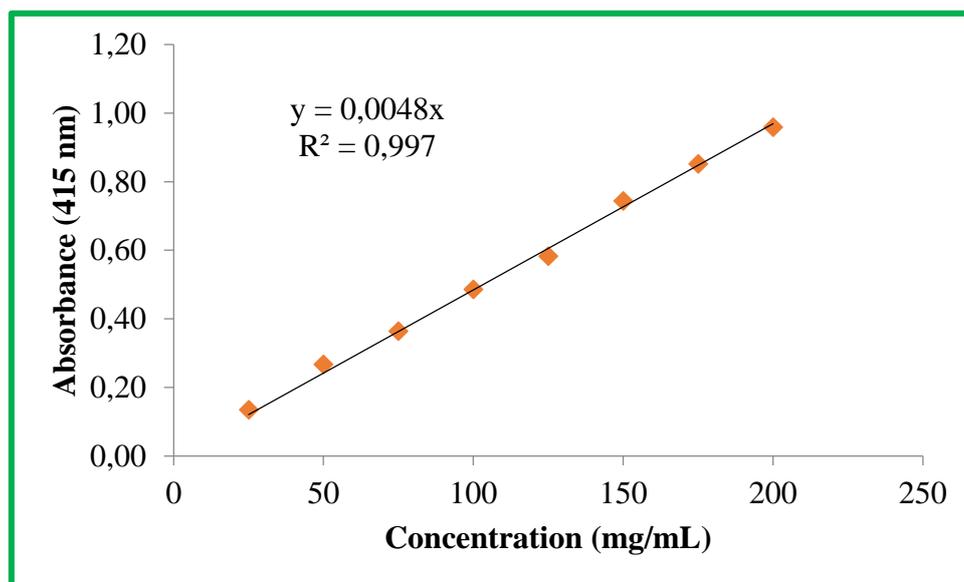
L'estimation quantitative des polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (**Figure IV.2**). Les quantités des polyphénols correspondantes à chaque extrait ont été exprimées en équivalent milligramme d'acide gallique (AG).



**Figure IV.2.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

### 3.1.2. Teneur en flavonoïdes totaux

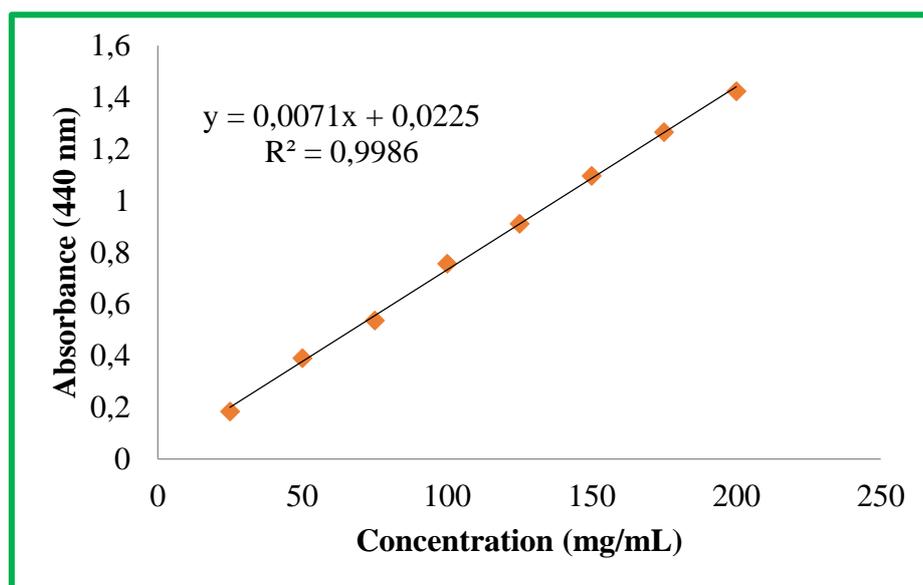
La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été réalisée selon le protocole colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et l'étalon était la quercétine (**Figure IV.3.**). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).



**Figure IV.3.** Courbe étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

### 3.1.3. Teneur en flavonols totaux

L'évaluation des contenus en flavonols dans les différents extraits de *N.glauca* a été réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et par rapport à la quercétine. La teneur en flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).



**Figure IV.4.** Courbe étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, et des flavonols dans les différents extraits de *N.glauca* sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.2.** La Quantité des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des flavonols dans les extraits de *N.glauca*.

Extrait	Polyphénols totaux * (mg GAE/g d'extrait)	Flavonoïdes * (mg QE/g d'extrait)	Flavonols * (mg QE/g d'extrait)
DCM	133,8±0,06	1,18±0,005	-
AE	351,55± 0,07	105,97±0,04	22,41±0,24
<i>n</i> -BuOH	284,98±0,08	164,44±0,07	18,75±0,46

\*: valeurs exprimées en moyennes ± Ecartype (n=3).

Les extraits ont montré des différences dans leurs teneurs totales en fonction des polarités des solvants utilisés pour l'extraction. D'après les résultats le taux des composés phénoliques le plus élevé est détecté dans l'extrait AE (351,55± 0,07mg EAG/g d'extrait), suivi par l'extrait *n*-BuOH (284,98±0,08 mg EAG/g d'extrait). Tandis que l'extrait DCM présente la plus faible teneur (133,8±0,06 mg EAG/g d'extrait).

D'une manière générale, l'estimation de la teneur en polyphénols totaux, en utilisant le réactif du Folin Ciocalteu, indique que cette plante est riche en ces composés.

On remarque d'après les résultats aussi que la quantité des flavonoïdes varie entre  $1,18 \pm 0,005$  à  $164,44 \pm 0,07$  mg/g. Le taux des flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans les extraits *n*-BuOH et AE avec des taux de  $164,44 \pm 0,07$  mg/g et de  $105,97 \pm 0,04$  mg/g, respectivement. En revanche, la quantité enregistrée pour l'extrait DCM ( $1,18 \pm 0,005$  mg/g) reste la plus faible par rapport aux autres extraits

La teneur la plus élevée en flavonols a été obtenue dans l'extrait AE avec une valeur de  $22,41 \pm 0,24$  mg/g suivi par l'extrait *n*-BuOH ( $18,75 \pm 0,46$  mg/g), tandis que l'absence de ces composés a été détectée dans l'extrait DCM.

#### 4. Identification des composés chimiques par LC-ESI-MS/MS des extraits

L'objectif de cette étude est de caractériser les composés majoritaires dans les extraits de la plante *N.glauca* par chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Les trois extraits étudiés ont été obtenus à l'aide de trois solvants organiques différents : l'acétate d'éthyle (AE), *n*-butanol (*n*-BuOH) et dichlorométhane (DCM). Ces trois extraits secs ont été solubilisés dans du méthanol à une concentration de 5 mg/mL, afin d'être analysés par UHPLC-ESI-Q-TOF-HRMS/MS. Un blanc analytique de méthanol a été préparé dans les mêmes conditions afin d'exclure les polluants et les impuretés provenant du solvant dans les analyses.

Les métabolites ont été séparés par UHPLC sur une chaîne Dionex Vanquish (de Thermo Fisher Scientific), puis analysés via la spectrométrie de masse en tandem sur un SYNAPT G2 HDMS (de Waters) équipé d'une source d'ionisation *electrospray* opérant en mode positif et négatif et séparant les ions selon leurs rapports masse sur charge ( $m/z$ ) à l'aide d'un analyseur hybride quadropôle-temps de vol (Q-TOF).

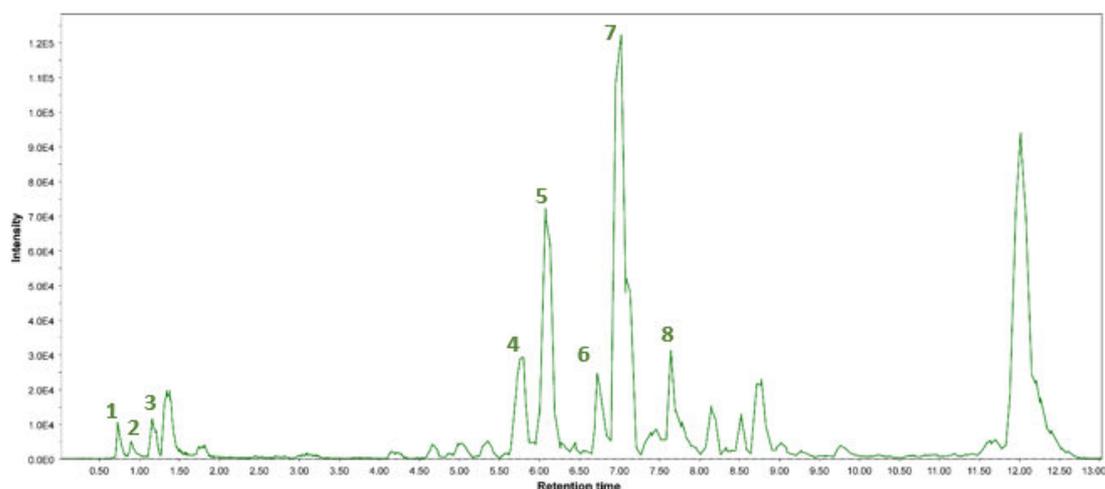
L'ensemble des analyses a été traité manuellement grâce aux logiciels MassLynx, MZMine2, grâce à des recherches en bases de données (HMDB, MassBank, GNPS) ainsi que l'étude de la fragmentation MS/MS afin d'identifier les composés d'intérêts de l'étude.

Les chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus suite à l'analyse des échantillons de *N.glauca* en mode d'ionisation *electrospray* positif sur une gamme de masse  $m/z$  50-1200 (Vert : extrait DCM ; Bleu : extrait AE ; Rouge : extrait *n*-BuOH).

Les analyses en mode d'ionisation négatif ont également été réalisées, mais les chromatogrammes n'apportent aucune information supplémentaire par rapport aux résultats de l'ionisation positive.

### 4.1. Composés majoritaires de l'extrait DCM

Le chromatogramme LC-ESI-MS/MS obtenu de l'extrait DCM des feuilles de *N.glauca* précédemment développé a montré l'identification de 8 composés (D<sub>1</sub>- D<sub>8</sub>) (**Figure.IV.5.**) qui sont classés en quatre groupes : alcaloïdes, coumarines, monoterpènes et dérivés de l'acide hydroxy cinnamique.



**Figure.IV.5.** Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait DCM des feuilles de *N.glauca* en mode positif

Les composés identifiés de l'extrait DCM en interprétant leurs spectres LC-ESI-MS/MS sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.3.** Composés de l'extrait DCM identifiés par LC-MS/MS

N° du pik	TR (min)	Composés	Formule moléculaire	CAS	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragments majoritaires (m/z)
D1	0,75	Nicotine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	54-11-5	163,1245	146,0923 ;130,0538
D2	0,90	Anabasine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	13078-0	163,1245	146,0923 ;130,0538
D3	1,20	β-Damascenone	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O	23726-93-4	191,1156	173,1069
D4	5,75	Scopolétine	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	92-61-5	193,0487	178,0255 ;133,0275
D5	6,10	Loliolide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	06-02-5989	179,1064	161,0981;133,0981.
D6	6,75	N-trans-Feruloyltyramine	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	66648-43-9	314,1398	177,0525 ;145,0267
D7	7,05	N-cis-Feruloyltyramine	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	80510-09-4	314,1398	177,0583 ;145,0267
D8	7,65	Octanoyl-Nornicotine	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O	-	275,2137	149,1095

- Identification du composé D1

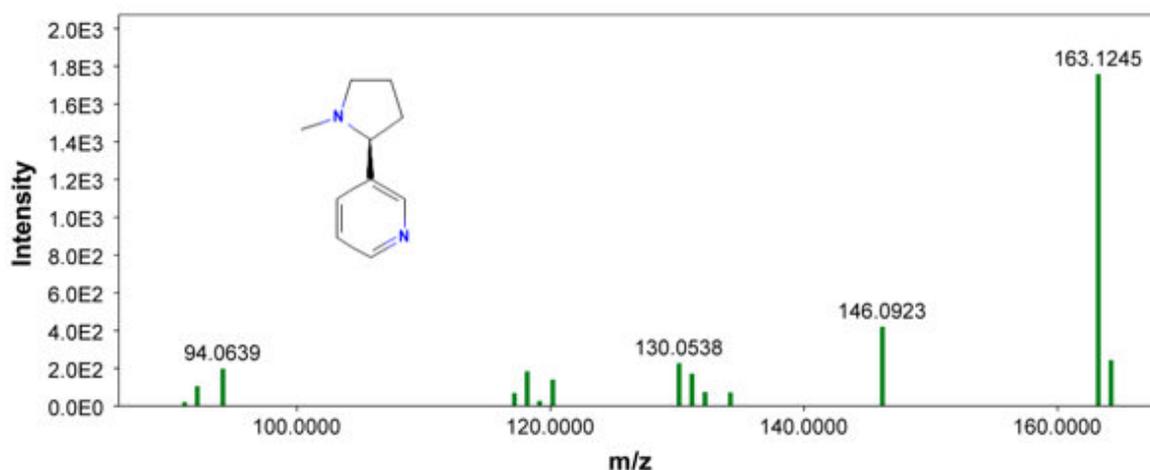


Figure IV.6. Spectre de masse du composé D1

Le composé D1 (temps de rétention 0,75) est la nicotine (isomère 1), son spectre de masse montre que le fragment le plus abondant est l'ion  $C_{10}H_{15}N_2^+$  formé par la molécule entière de masse  $m/z = 163,1245$  (Figure IV.6.) caractéristique des amines cycliques (Zbancioc *et al.*,2012), suivi par le fragment de masse  $m/z = 146,093$  qui découle du départ d'un groupement méthyle suivi par  $H_2$  (Figure IV.7.) . Le fragment de masse  $130,0538 m/z$  provient du départ d'un groupement ( $NH_3$ ) du fragment de masse  $m/z = 146,0923$ , alors que le fragment de masse  $m/z = 94,0639$  résulte du départ d'un groupement amine cyclique ( $C_4H_9N$ ) selon la (Medana *et al.*,2016). Ce composé est de la famille des alcaloïdes.

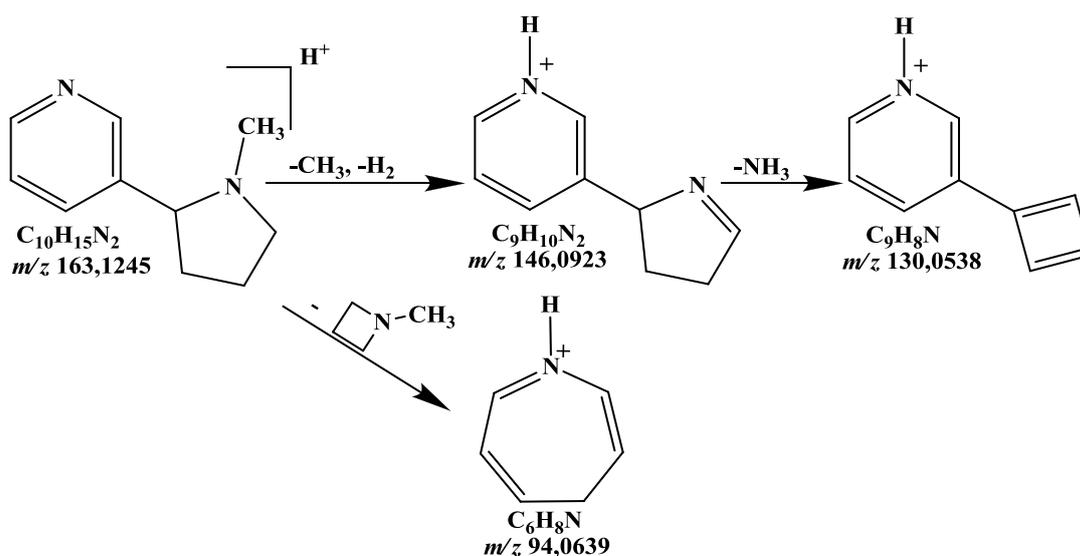
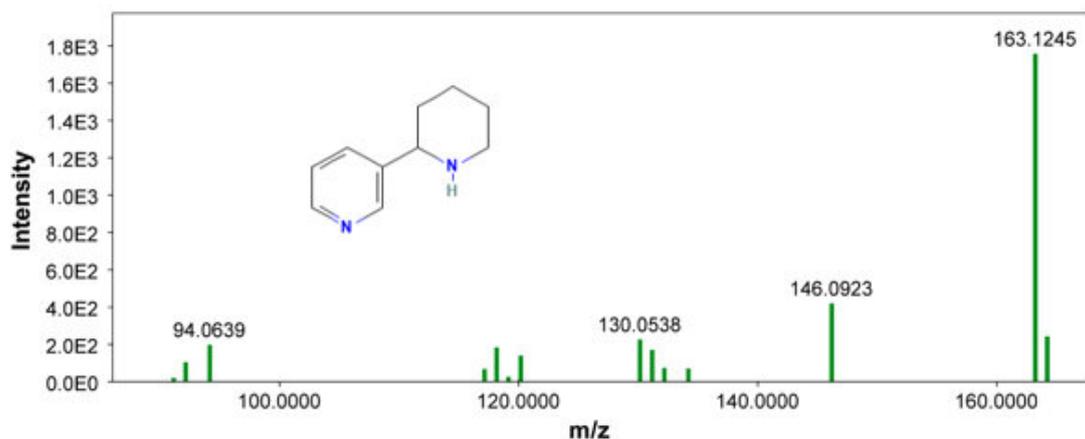


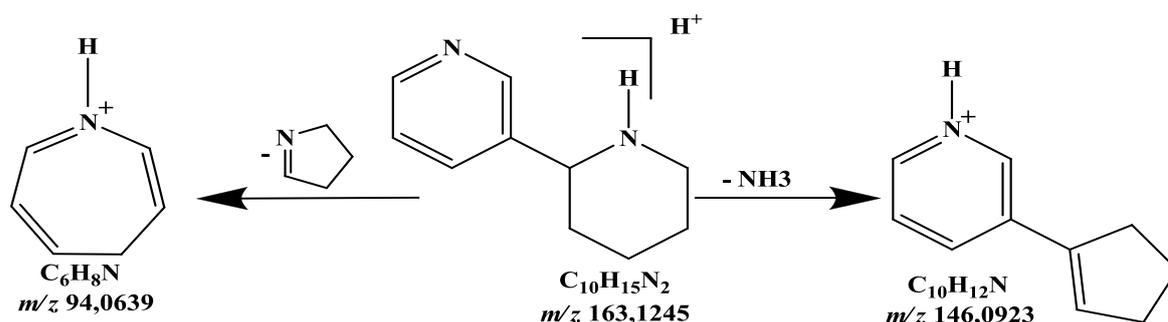
Figure IV.7. Schéma de fragmentation de Nicotine

- Identification du composé D2



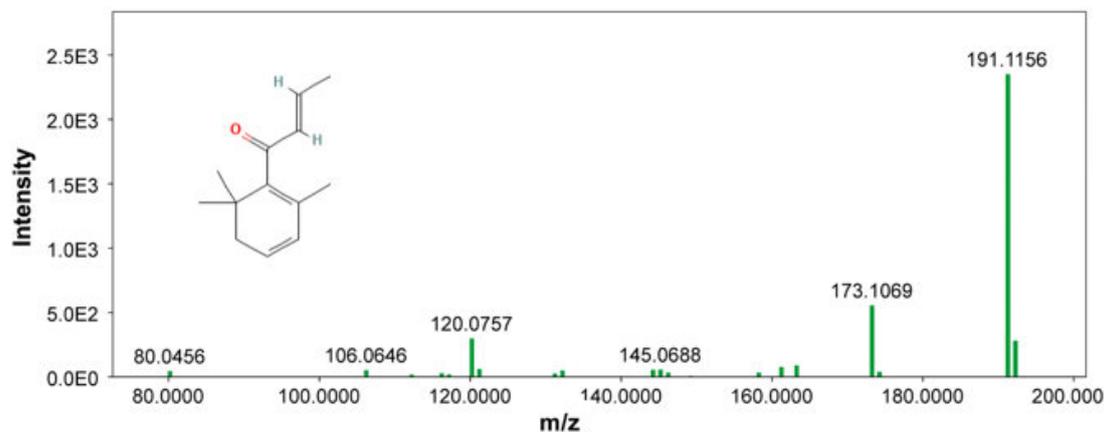
**Figure IV.8.** Spectre de masse du composé D2

Le composé D2 (temps de rétention 0,9) est l'anabasine (isomère 2). Le spectre de masse de ce composé montre que le fragment le plus abondant est l'ion  $C_{10}H_{15}N_2^+$  formé par la molécule entière avec une masse  $m/z = 163,1245$  (**Figure IV.8.**) caractéristique des amines cycliques (Zbancioc *et al.*,2012) , suivi par le fragment de masse  $m/z = 146,0923$  qui résulte du départ d'un groupement ( $NH_3$ ), alors que le fragment de masse  $m/z = 94,0639$  résulte du départ d'un groupement imine cyclique ( $C_4H_7N$ ) selon la **Figure IV.9.** (Medana *et al.*,2016). Ce composé est de la famille des alcaloïdes.



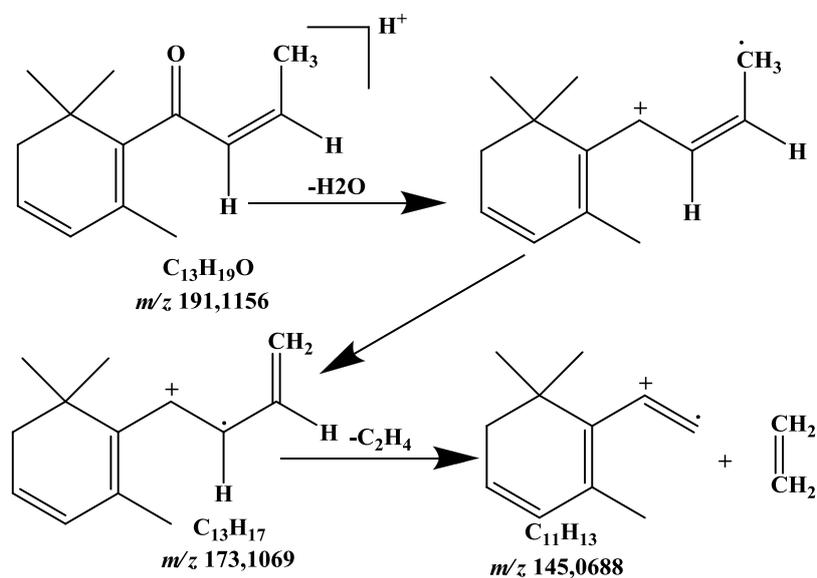
**Figure IV.9.** Schéma de fragmentation de l'Anabasine

- Identification du composé D3



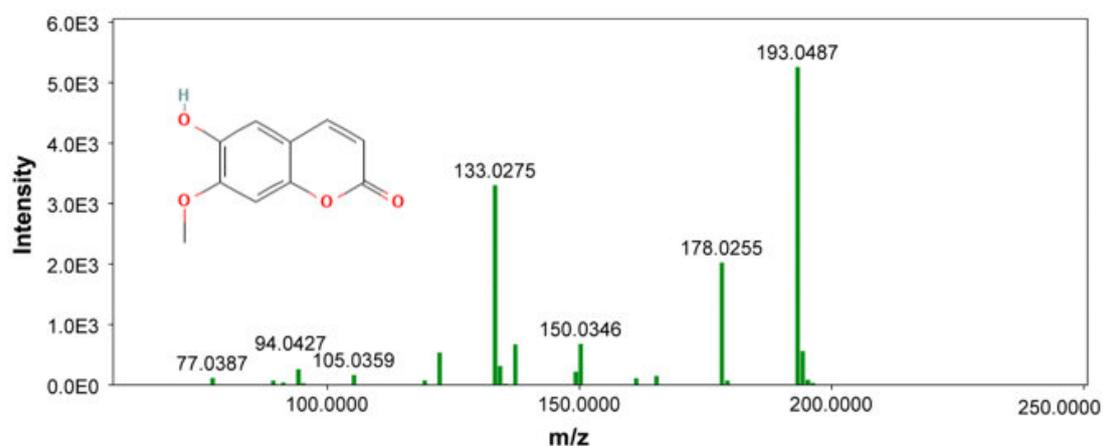
**Figure IV.10.** Spectre de masse de composé D3

Le composé D3 (temps de rétention 1,20) est le  $\beta$ -Damascénone ((*Z*)-1-(2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one), son fragment le plus abondant dans le spectre est l'ion  $C_{13}H_{19}O^+$  formé par la molécule entière d'une masse  $m/z=191,1156$  (**Figure IV.10.**) suivi par la perte successive d'une molécule d'eau qui donne le fragment  $m/z=173,1069$  et une perte de la molécule  $CH_2=CH_2$  pour donner le fragment  $m/z=145,0688$  selon le schéma présenté dans la **Figure IV.11.** Ce composé est de la famille des monoterpènes cétones.



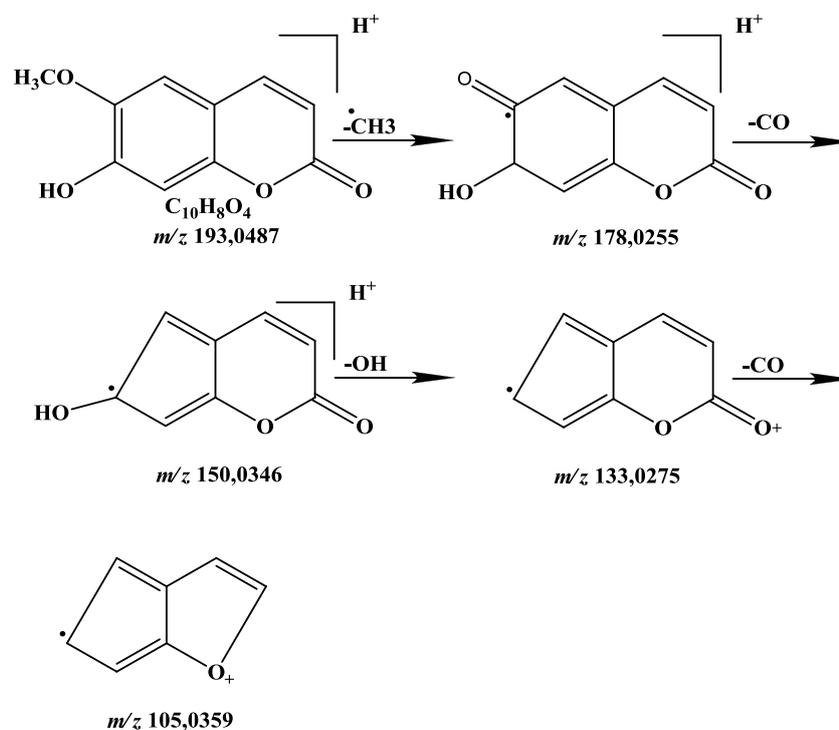
**Figure IV.11.** Schéma de fragmentation de  $\beta$ -Damascénone

- Identification du composé D4



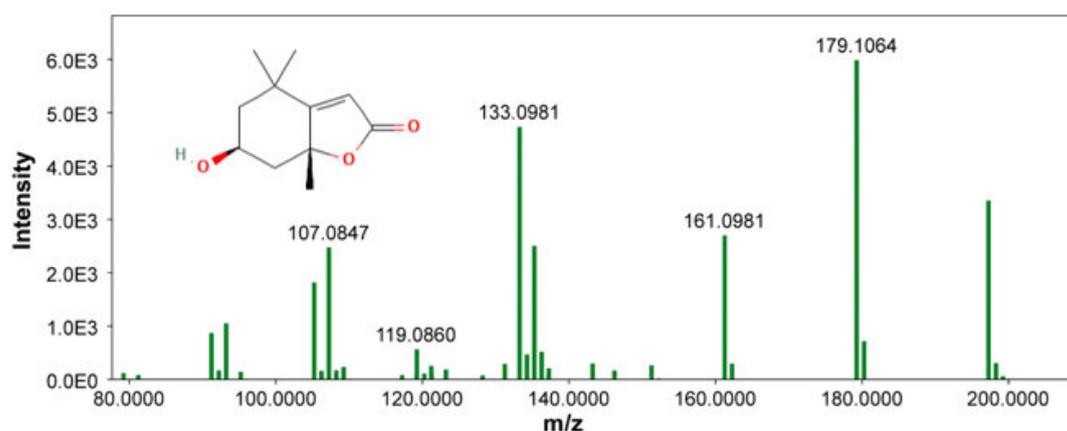
**Figure IV.12.** Spectre de masse du composé D4

Le composé D4 (temps de rétention 5,75) est le Scopolétine, son spectre de masse (**Figure IV.12.**) montre que le fragment le plus abondant est l'ion  $C_{10}H_9O_4^+$  formé par la molécule entière avec  $m/z=193,0487$ , alors que les fragments de masse  $m/z=178,0255$ ,  $150,0346$  et  $133,0275$  résultent du départ successive des groupements méthyl, carbonyl et hydroxyl respectivement (Yu *et al.*,2020) (Zhang *et al.*,2020) selon le schéma de fragmentation illustré dans la **Figure IV.13**. Ce composé est de la famille des coumarines.



**Figure IV.13.** Schéma de fragmentation de Scopolétine.

- **Identification du composé D5**

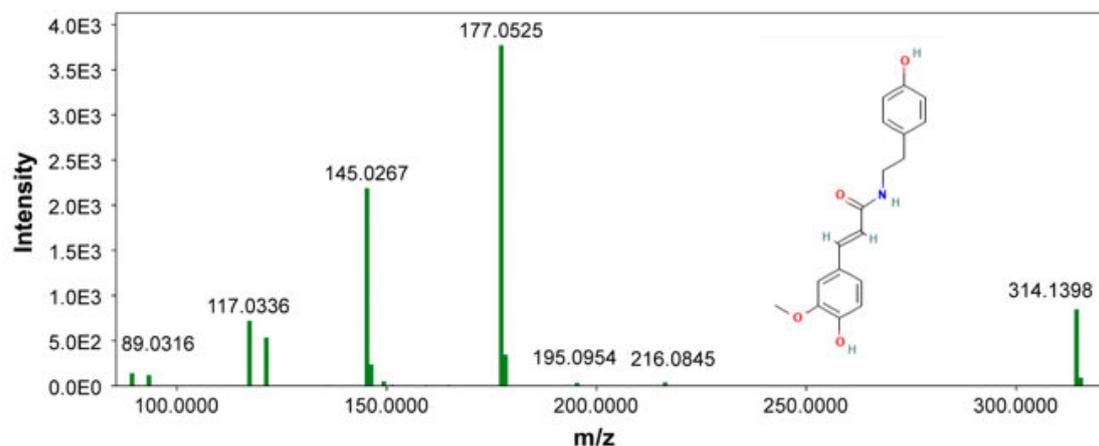


**Figure IV.14.** Spectre de masse du composé D5

Le composé D5 (temps de rétention 6,1) est loliolide. Il est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_{11}H_{17}O_3^+$  et  $m/z=197,1169$ , son spectre de masse montre un fragment majoritaire de masse  $m/z=179,1064$  (**Figure IV.14.**) qui correspond au départ d'une molécule d'eau pour donner l'ion de formule  $C_{11}H_{15}O_2^+$  (Haq *et al.*,2020). Les fragments de masse  $m/z=161,0981$  et  $m/z=133,0981$  résultent respectivement du départ successif d'une autre molécule d'eau et une molécule CO (Crotti *et al.*,2004). Ce composé est de la famille des monoterpènes lactones.

- **Identification des composés D6 et D7**

Les composés D6 (temps de rétention 6,75) et D7 (temps de rétention 7,05) sont les isomères : N-trans-feruloyltyramine ou moupinamide (isomère1) et N-cis-feruloyltyramine (isomère 2) de même ion protoné de formule  $C_{18}H_{20}NO_4^+$  et  $m/z=314,1398$ .



**Figure IV.15.** Spectres de masse du composé D6

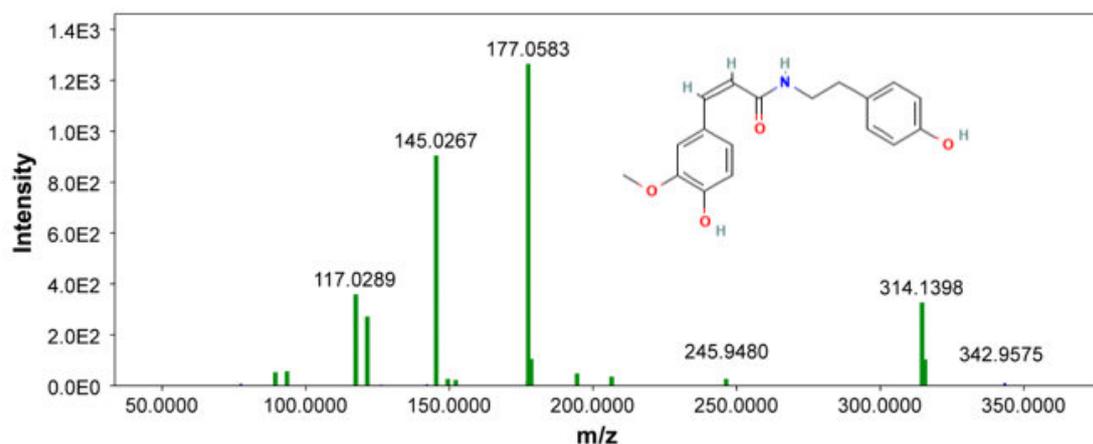


Figure IV.16. Spectre de masse du composé D7

Les spectres de masse (Figure IV.15. et Figure IV.16.) montrent les fragmentations majoritaires caractéristiques  $m/z=177,0525$  et  $m/z=145,0267$  des amides d'acide hydroxycinnamique comme présenté dans la figure suivantes :

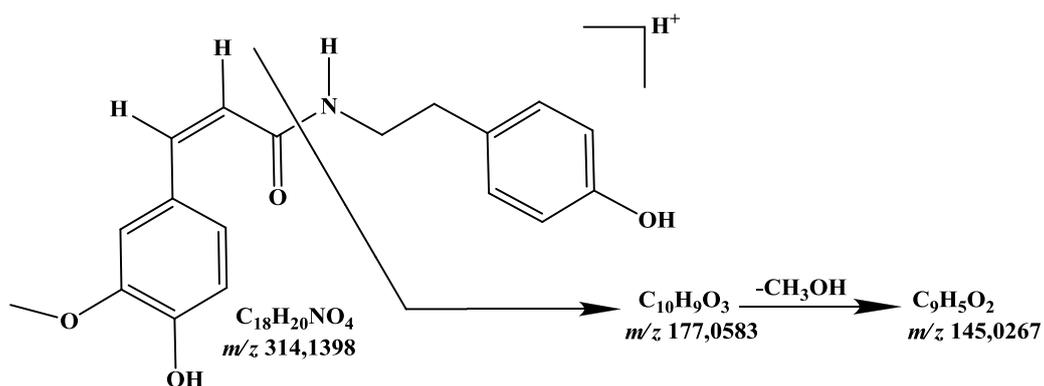


Figure IV.17. Schéma de fragmentation de N-cis-Feruloyltyramine

- Identification du composé D8

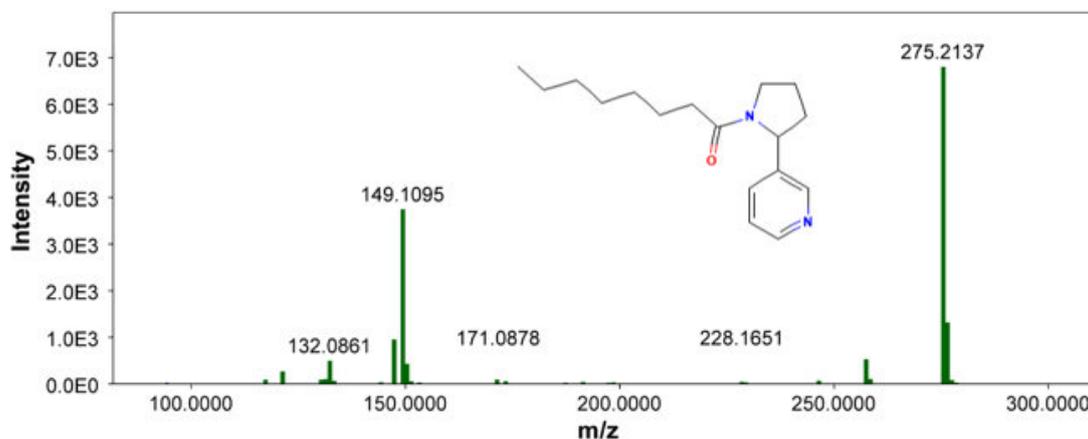
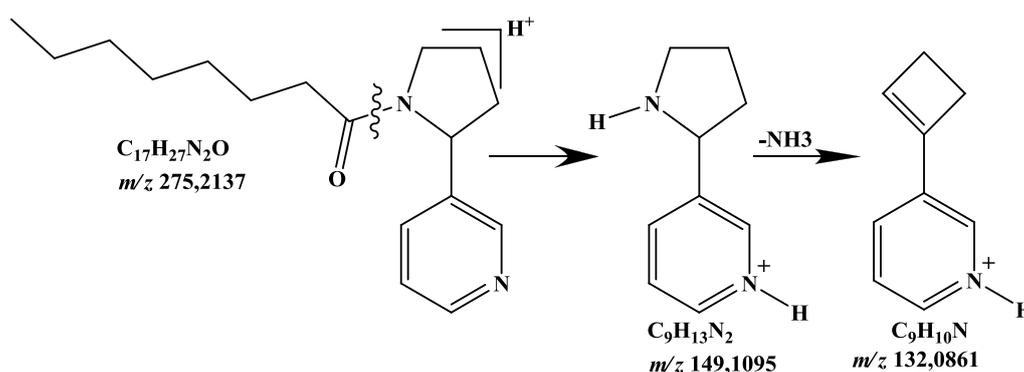


Figure IV.18. Spectre de masse du composé D8

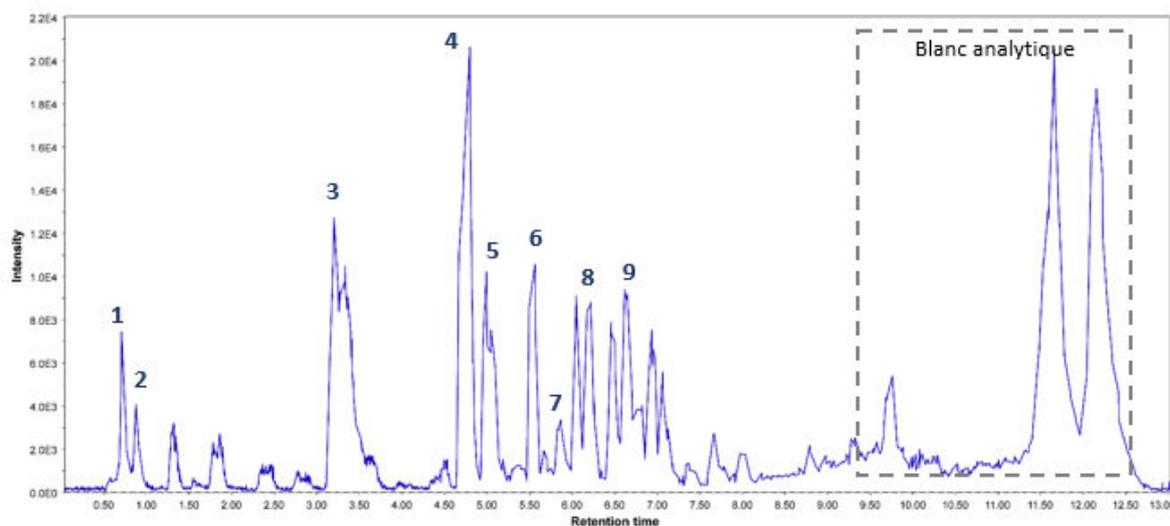
Le composé D8 (temps de rétention 7,65) est l'Octanoyl-Nornicotine, Son spectre de masse montre que le fragment le plus abondant est l'ion  $C_{17}H_{27}N_2O^+$  formé par la molécule entière avec  $m/z = 275,2137$  suivi par un autre fragment de  $m/z = 149,1095$  (**Figure IV.18**) caractéristique des amines cycliques (Zbancioc *et al.*,2012), qui se forme par le départ d'un groupe octanyle selon la **Figure.19**. Ce composé est de la famille des alcaloïdes.



**Figure IV.19.** Schéma de fragmentation d'Octanoyl-Nornicotine

## 4.2. Composés majoritaires de l'extrait AE

Le chromatogramme LC-ESI-MS/MS obtenu de l'extrait AE des feuilles de *N.glauca* précédemment développé a montré l'identification de 9 composés (A<sub>1</sub>- A<sub>9</sub>) (**Figure.IV.20.**) dont 7 sont caractérisés et classés en quatre groupes : alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et dérivés de l'acide hydroxy cinnamique.



**Figure.IV.20.** Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait AE des feuilles de *N.glauca* en mode positif

Les composés identifiés de l'extrait AE en interprétant leurs spectres LC-ESI-MS/MS sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.4.** Composés de l'extrait AE identifiés par LC-ESI-MS/MS

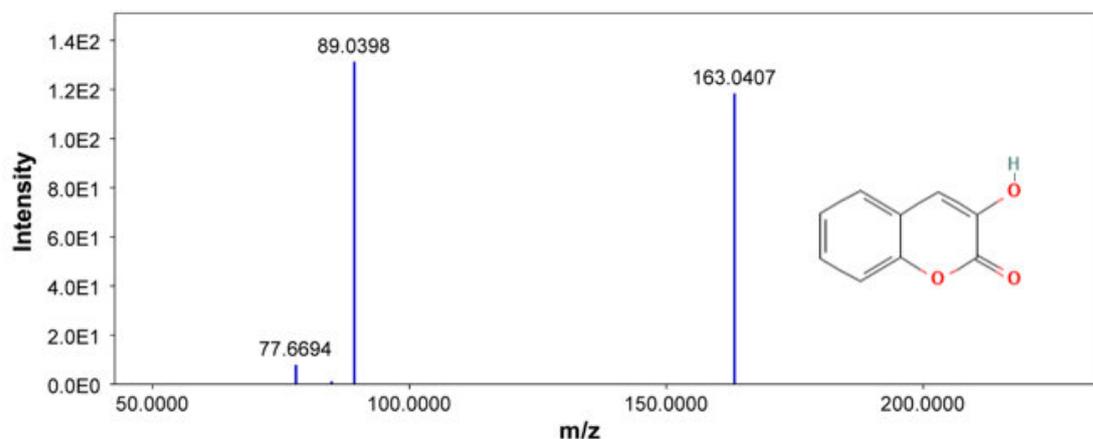
N°du pik	TR (min)	Composés	Formule moléculaire	CAS	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragments majoritaires (m/z)
A1	0,75	Nicotine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	54-11-5	163,1245	146,0923;134,0937 ;120,0805 ; 94,0639
A2	0,9	Anabasine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	13078-0	163,1245	146,0923;134,0937 ;120,0805; 94,0639.
A3	3,25	3-Hydroxycoumarine	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1076-38-6	163,0407	89,0398
A4	4,80	Puromycine	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	53-79-2	472,2303	222,0903 ;163,0407
A5	5,10	NI	-	-	-	-
6	5,51	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	153-18-4	-	303,0413
A7	5,85	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	17650-84-9	-	287,0530
A8	6,20	3,4-Dicaffeoyl-1,5-quinolactone	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-	-	163,0407
A9	6,70	NI	-	-	-	-

NI: Non identifié

- **Identification des composés A1 et A2**

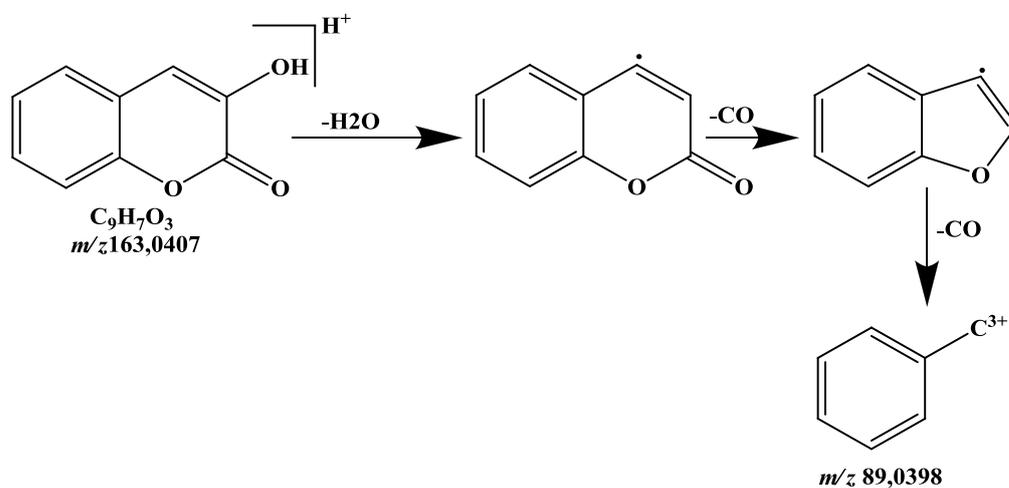
Les composés A1 (temps de rétention 0,75 minutes) et A2 (temps de rétention 0,9 minutes) avec les mêmes fragments majoritaires qui ont été précédemment étudiés dans l'extrait DCM, sont identique à ceux de la Nicotine et l'Anabasine respectivement.

- Identification du composé A3



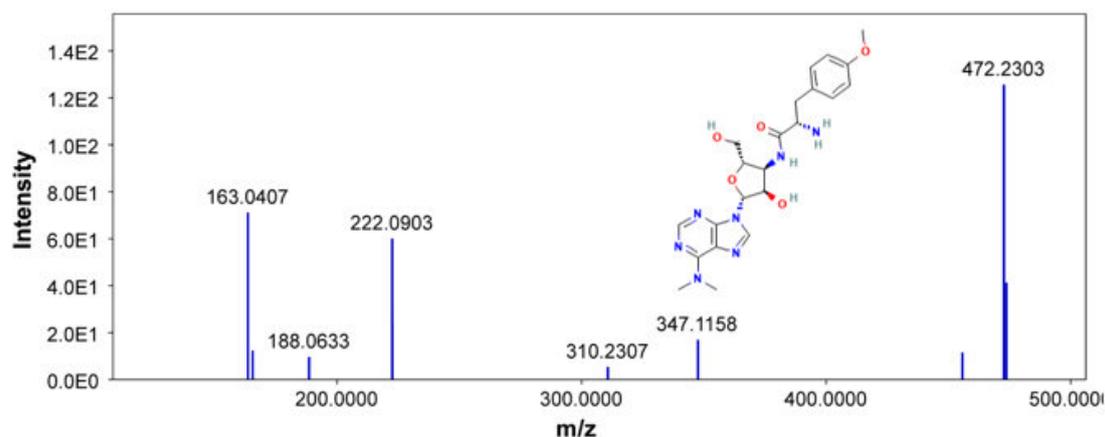
**Figure IV.21.** Spectre de masse du composé A3

Le composé A3 (temps de rétention 3,25) est le 3-Hydroxycoumarine. Il est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_9H_7O_3^+$  et  $m/z=163,0407$ , son spectre de masse montre un fragment majoritaire de masse  $m/z=89,0398$  (**Figure IV.21.**) qui correspond au départ d'une molécule d'eau suivi par la perte successive de deux molécules CO selon la **Figure IV.22.** (Majnooni *et al.*,2020). Ce composé est de la famille des coumarines.



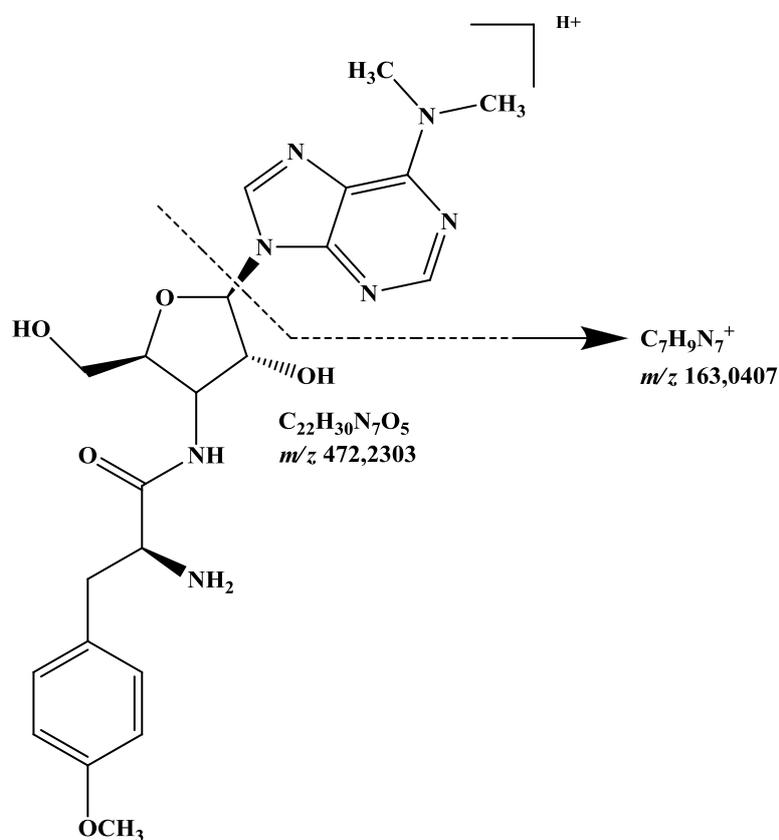
**Figure IV.22.** Schéma de fragmentation du 3-Hydroxycoumarine

- Identification du composé A4



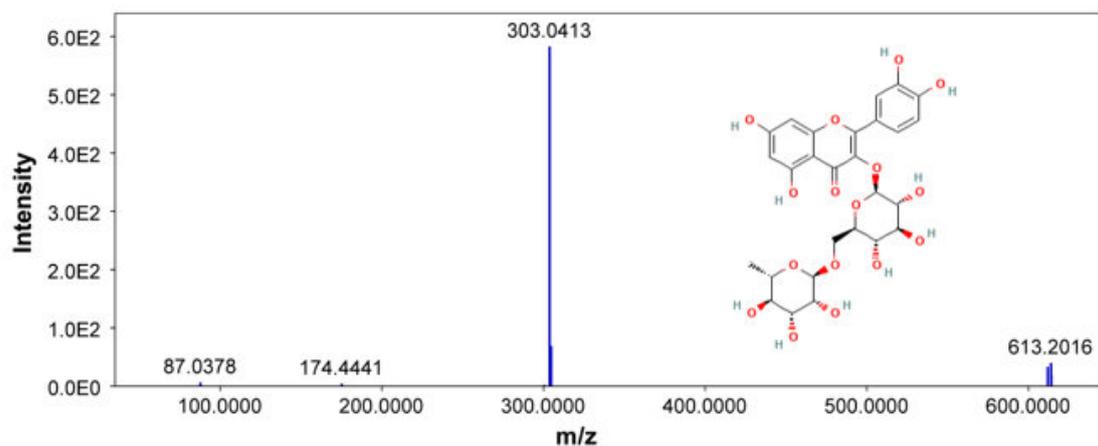
**Figure IV.23.** Spectre de masse du composé A4

Le composé A4 (temps de rétention 4,8) est le Puromycine (3'-désoxy-*N,N*-diméthyl-3'-(*O*-méthyl-*L*-tyrosinamido)adénosine), son fragment le plus abondant dans le spectre est l'ion  $C_{22}H_{30}N_7O_5^+$  formé par la molécule entière avec pour masse  $m/z = 472,2303$  (**Figure IV.23.**), suivi par un fragment caractéristique de masse  $m/z = 163,0407$  selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure.24.** Ce composé est de la famille des alcaloïdes.



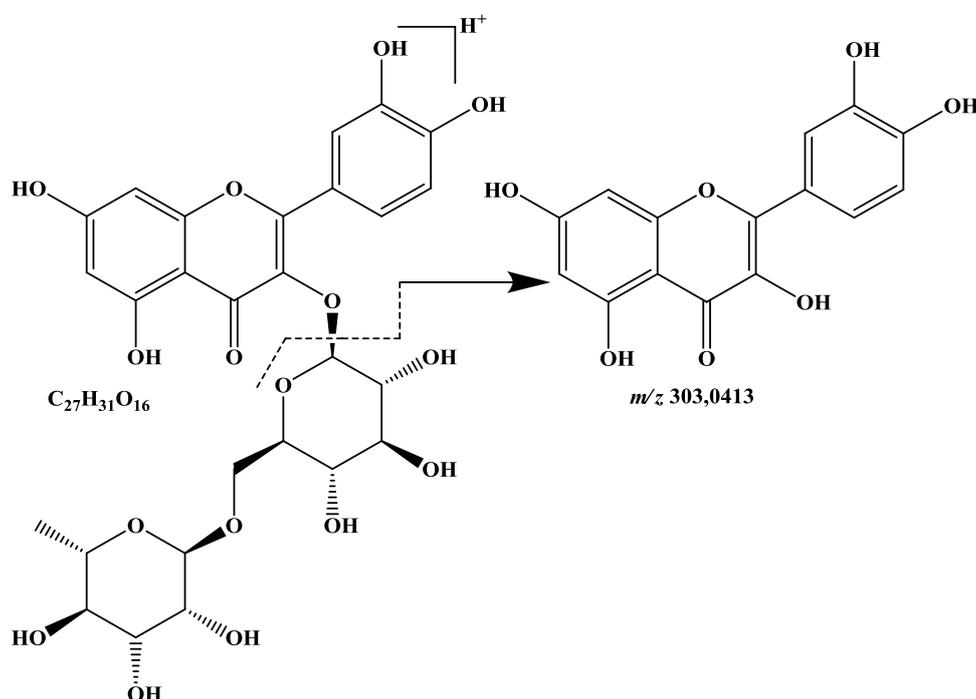
**Figure IV.24.** Schéma de fragmentation de Puromycine

- Identification du composé A6



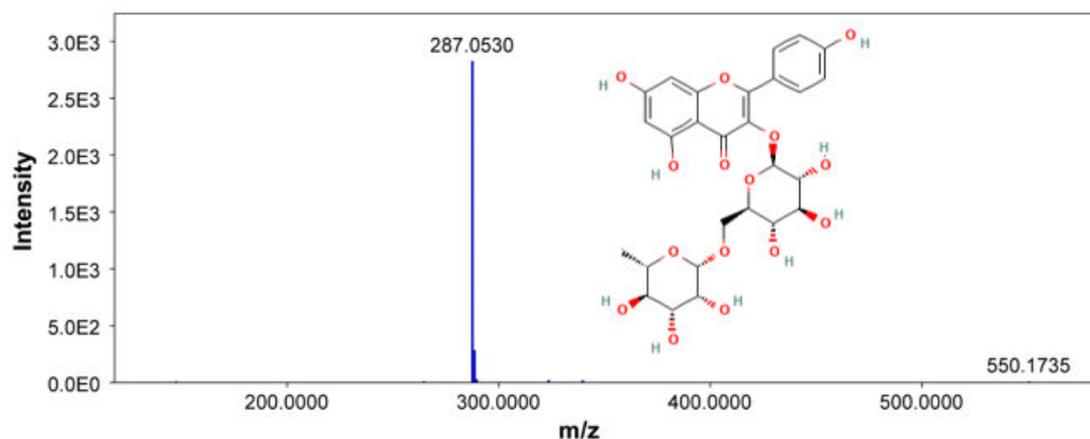
**Figure IV.25.** Spectre de masse du composé A6

Le composé A6 (temps de rétention 5,51) est quercétine-3-*O*-rutinoside (Rutine), son spectre de masse a révélé un fragment majeur caractéristique à  $m/z = 303,0413$  (**Figure IV.25.**), qui correspond à l'aglycone après la perte du rutinoside (Scigelova *et al.*, 2011 ; Farias & Mendez., 2014 ; Kumar *et al.*, 2017) selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure.26**. Ce composé est de la famille des flavonoïdes.



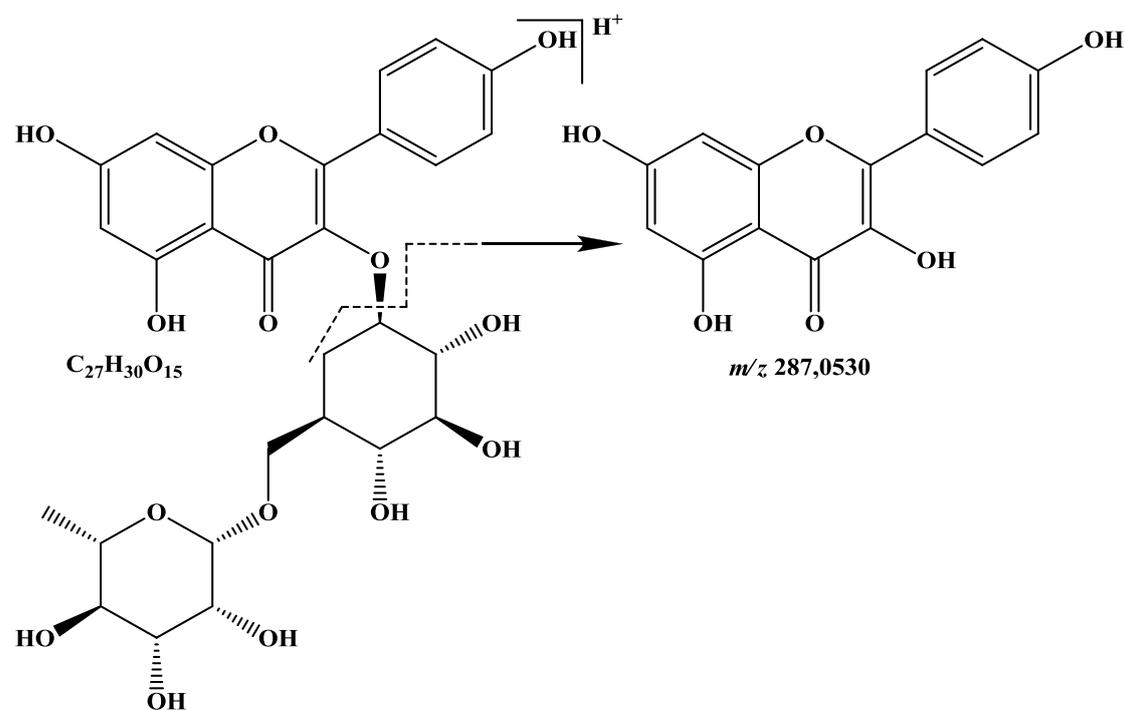
**Figure IV.26.** Schéma de fragmentation de Quercétine-3-*O*-rutinoside (Rutine)

- Identification du composé A7



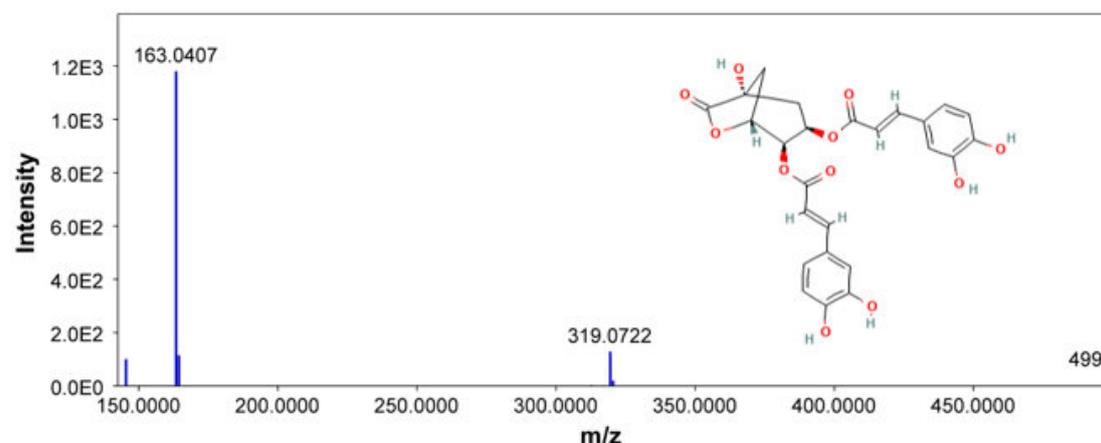
**Figure IV.27.** Spectre de masse du composé A7

Le composé A7 (temps de rétention 5,85) est le Kaempferol-3-*O*-rutinoside, son spectre de masse a révélé un fragment majeur caractéristique à  $m/z= 287,0530$  (**Figure IV.27.**) correspondant à l'aglycone (kaempferol) après la perte du rutinoside (Farias & Mendez.,2014 ; Kumar *et al.*,2017) selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure.28**. Ce composé est de la famille des flavonoïdes.



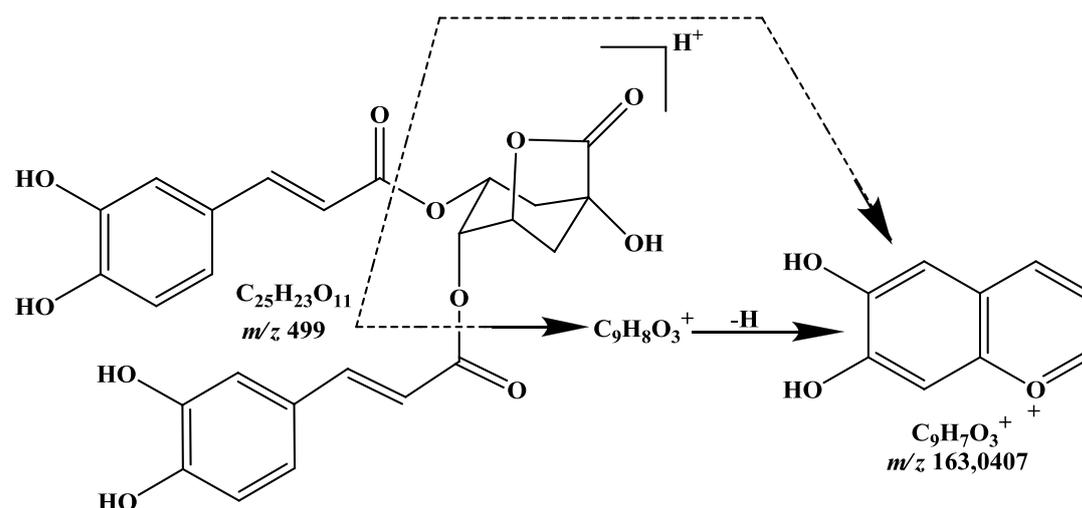
**Figure IV.28.** Schéma de fragmentation de Kaempferol-3-*O*-rutinoside

- Identification du composé A8



**Figure IV.29.** Spectre de masse du composé A8

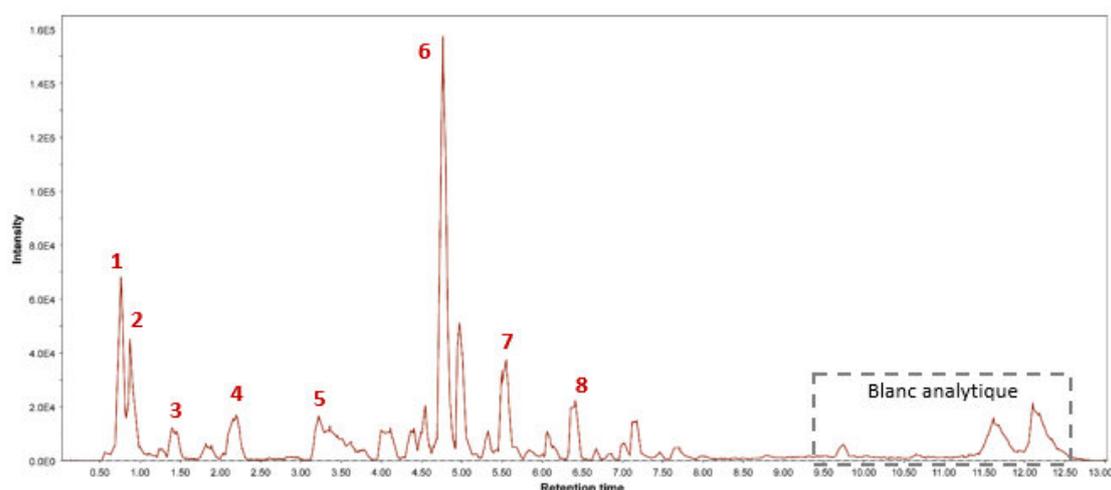
Le composé A8 (temps de rétention 6,2) est 3,4-Dicaffeoyl-1,5-quinolactone. Il est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_{25}H_{23}O_{11}^+$  et  $m/z=499$ , son spectre de masse montre un fragment majoritaire de masse  $m/z=163,0407$  (**Figure IV.29.**) correspondant à l'ion de formule  $C_9H_7O_3^+$  (Hoai *et al.*,2018), selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure IV.30.** Ce composé est de la famille des acides phénoliques dérivé d'acide hydroxycinnamique.



**Figure IV.30.** Schéma de fragmentation de 3,4-Dicaffeoyl-1,5-quinolactone

### 4.3. Composés majoritaires de l'extrait *n*-BuOH

Le chromatogramme LC-ESI-MS/MS obtenu de l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *N.glauca* précédemment développé a montré l'identification de 8 composés (B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub>) (**Figure.IV.31.**) qui sont classés en cinq groupes : alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, dérivés de l'acide hydroxy cinnamique et homosérines lactones.



**Figure.IV.31.** Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS obtenus de l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *N.glauca* en mode positif

Les composés identifiés de l'extrait *n*-BuOH en interprétant leurs spectres LC-ESI-MS/MS sont présentés dans le tableau suivant :

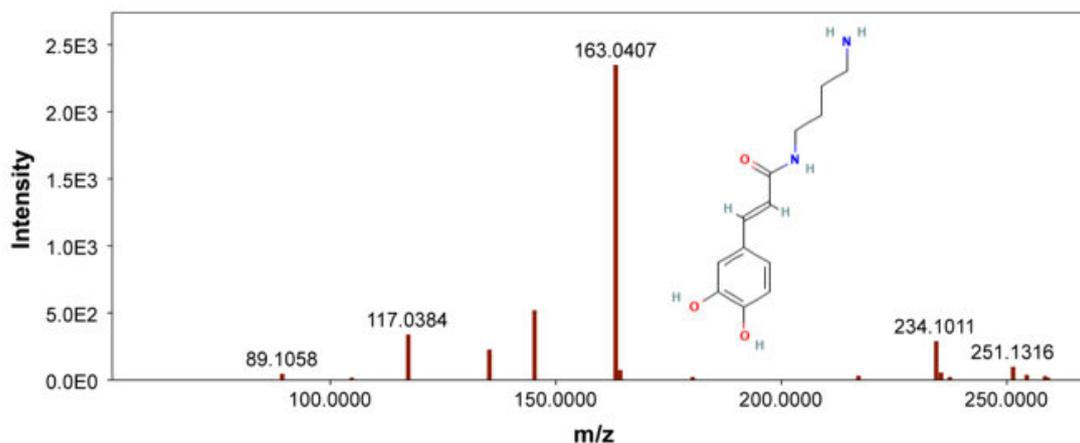
**Tableau IV.5.** Composés de l'extrait *n*-BuOH identifiés par LC-ESI-MS/MS

N°du pik	TR (min)	Composé	Formule moléculaire	CAS	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragments majoritaires (m/z)
B1	0,75	Nicotine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	54-11-5	163,1189	146,0923 ; 118,0623 ; 94,0681
B2	0,9	Anabasine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	13078-0	163,1245	146,0923 ; 134,0937 ; 120,0805
B3	1,40	Caffeoyl putrescine	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1400-81-3	251,1316	163,0407
B4	2,20	Acide indole acrylique	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	1204-06-4	188,0753	146,0605 ; 118,0623
B5	3,25	3-Hydroxycoumarine	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1076-38-6	163,0351	117,0289 ; 89,0389
B6	4,8	Puromycine	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	53-79-2	472,2399	222,1098
B7	5,51	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	153-18-4	-	303,0489
B8	6,45	3-oxo-C4-homoserine lactone	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	-	-	187,1231 ; 84,0454

- **Identification des produits B1 et B2**

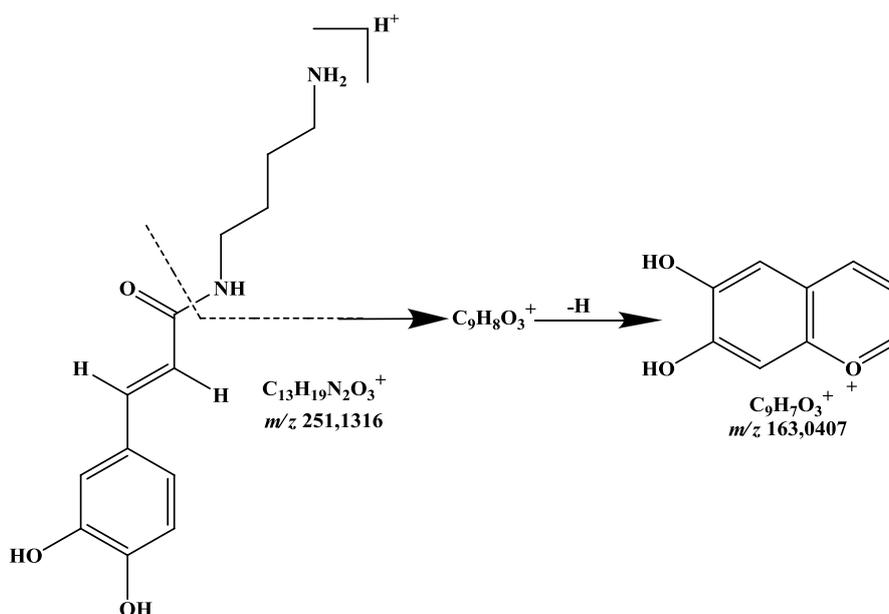
Les composés B1 (temps de rétention 0,75 minutes) et B2 (temps de rétention 0,9 minutes) avec les mêmes fragements majoritaires ont été détectés précédemment dans l'extrait DCM, sont identique à ceux de la Nicotine et l'Anabasine respectivement.

- **Identification du composé B3**



**Figure IV.32.** Spectre de masse du composé B3

Le composé B3 (temps de rétention 1,40) est le Cafféoyl putrescine. Il est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_{13}H_{19}N_2O_3^+$  et  $m/z=251,1316$ , son spectre de masse de montre un fragment majoritaire de masse  $m/z=163,0407$  (**Figure IV.32.**) correspondant à l'ion de formule  $C_9H_7O_3^+$  (Hoai *et al.*,2018), selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure IV.33**. Ce composé est de la famille des amides d'acide hydroxycinnamique.



**Figure IV.33.**Schéma de fragmentation Cafféoyl putrescine

- Identification du composé B4

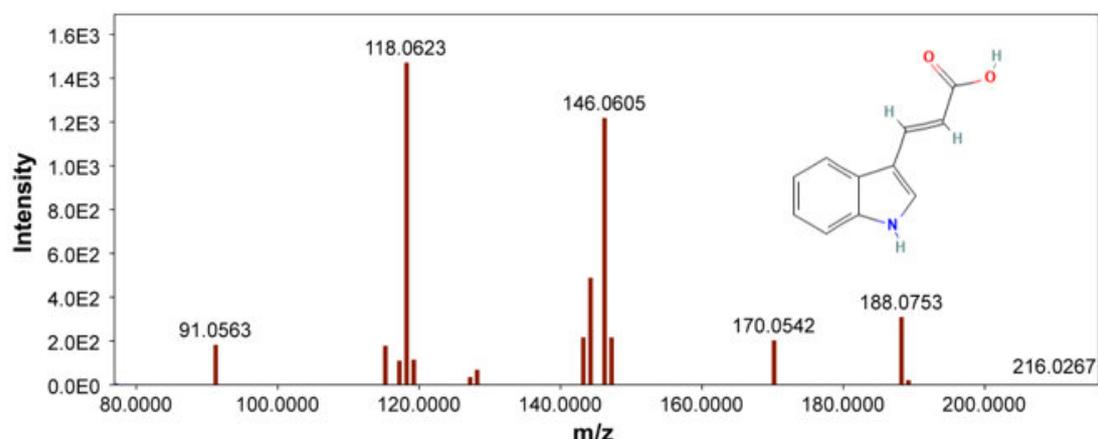


Figure IV.34. Spectre de masse du composé B4

Le composé B4 (temps de rétention 2,2) est l'acide indole acrylique. Il est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_{11}H_{10}NO_2^+$  et  $m/z = 188,0763$ , son spectre de masse de montre deux fragments majoritaires de masse  $m/z = 146,0605$  et  $118,0623$  (Figure IV.34.) résultent respectivement du départ successive d'une autre molécule ( $-CH_2CO$ ) et une molécule CO (Zhang *et al.*, 2019) selon le schéma de fragmentation présenté dans la Figure IV.35. Ce composé est de la famille des alcaloïdes.

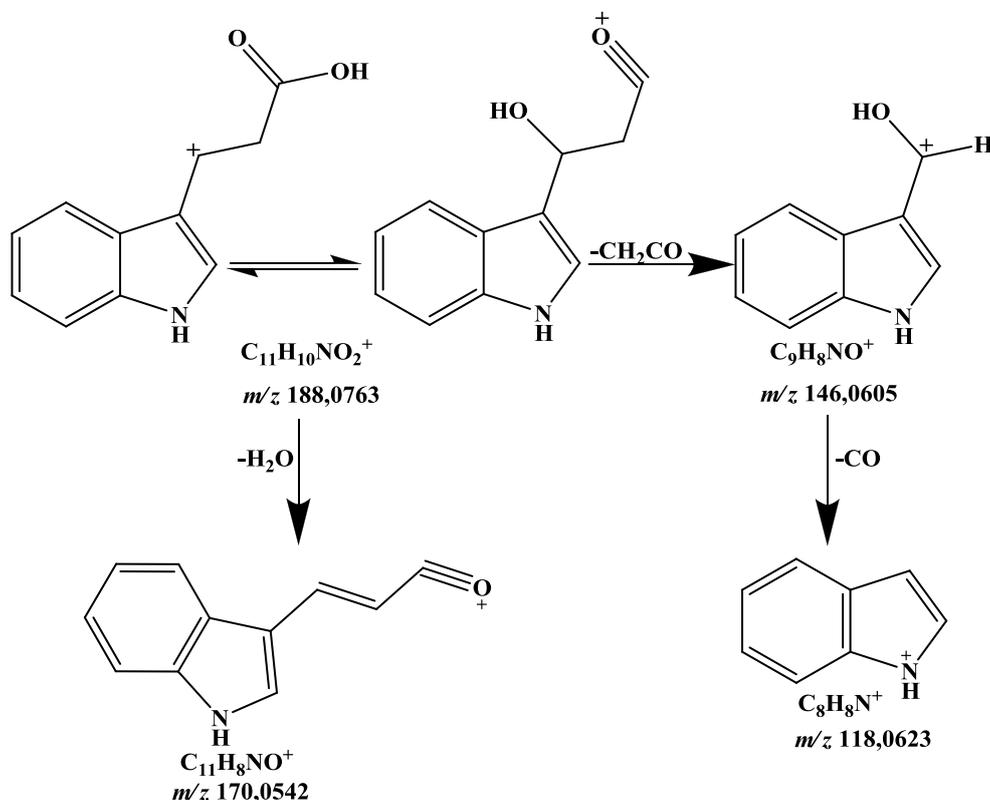
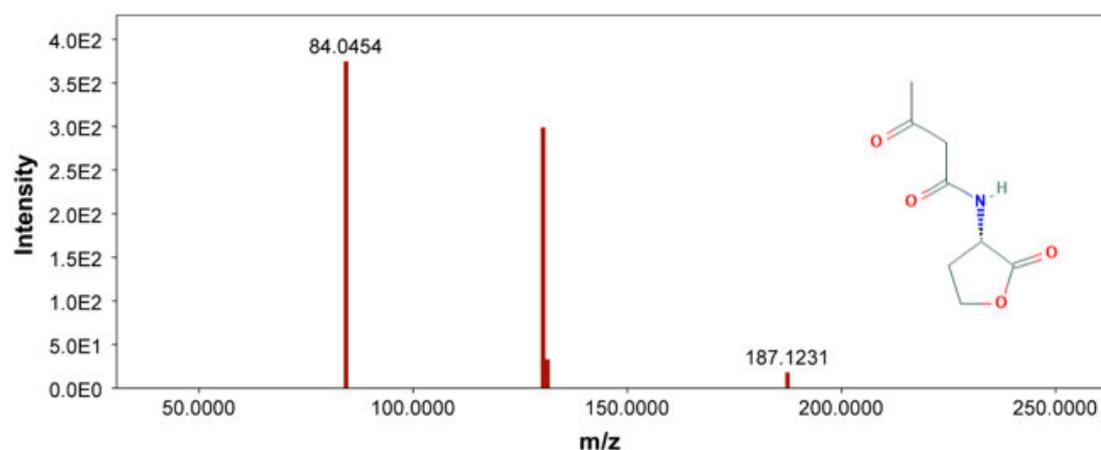


Figure IV.35. Schéma de fragmentation d'Acide indole acrylique.

- **Identification des composés B5, B6 et B7**

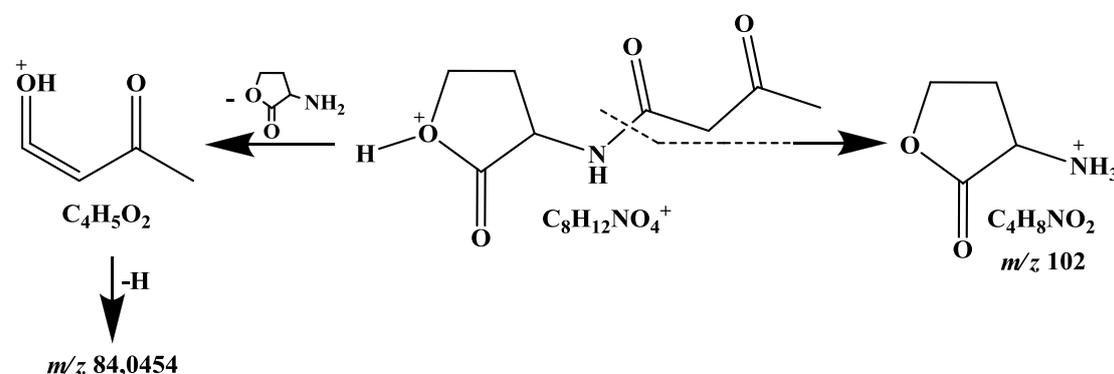
Les composés B5 (temps de rétention 3,25), B6 (temps de rétention 4,8) et B7 (temps de rétention 5,51) avec les mêmes fragmentations majoritaires ont été détectés précédemment dans l'extrait AE, sont identiques à ceux de 3-Hydroxycoumarine, le Puromycine et la Rutine respectivement.

- **Identification du composé B8**



**Figure IV.36.** Spectre de masse du composé B8

Le composé B8 (temps de rétention 6,45) est la 3-oxo-C4-homosérine lactone qui est apparu en mode d'ionisation positive sous la forme d'un ion protoné de formule  $C_8H_{12}NO_4^+$  et  $m/z = 187,1231$ , son spectre de masse montre un fragment majoritaires de masse  $m/z = 84,0454$  (**Figure IV.36.**) correspondant à l'ion de formule  $C_4H_5O_2^+$  (Dal Bell *et al.*, 2021) selon le schéma de fragmentation proposé dans la **Figure IV.37.** Ce composé est un dérivé des homosérines lactones.



**Figure IV.37.** Schéma de fragmentation de 3-oxo-C4-homosérine lactone

- **Discussion sur les composés identifiés**

L'ensemble d'analyse LC-ESI-MS/MS des trois extraits: DCM, AE et *n*-BuOH a montré l'identification de 16 composés dont la majorité a été détectée pour la première fois dans le présent travail. Les composés majoritaires identifiés dans les extraits des feuilles de *N.glauca* sont présentés dans le tableau suivant:

**Tableaux IV.6.** Les composés majoritaires identifiés par LC-ESI-MS/MS. dans les extraits des feuilles de *N.glauca*

Type des composés	Noms des composés identifiés	Extraits de <i>N.glauca</i>		
		DCM	AE	<i>n</i> -BuOH
Alcaloïdes	Nicotine	+	+	+
	Anabasine	+	+	+
	Octanoyl-nornicotine	+	-	-
	Acide indole acrylique	-	-	+
	Puromycine	-	+	+
Coumarines	Scopolétine	+	-	-
	3-Hydroxycoumarine	-	+	+
Flavonoïdes	Rutine	-	+	+
	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	-	+	-
Monoterpènes	$\beta$ -Damascénone	+	-	-
	Loliolide	+	-	-
Dérivés de l'acide hydroxy cinnamique	N-Trans-Feruloyltyramine	+	-	-
	N-Cis-Feruloyltyramine	+	-	-
	Caffeoyl putrescine	-	-	+
	3,4-Dicaffeoyl-1,5-quinolactone	-	+	-
Homosérine lactone	3-oxo-C4-homosérine lactone	-	-	+

Tous les composés ont été détectés dans les trois extraits grâce à leurs pics obtenus durant les premiers 8 min d'analyse.

- **Pour les alcaloïdes;**

Ce type de composés constitue le premier groupe principal après la détection de cinq alcaloïdes. Les deux premiers pics détectés dans les trois extraits correspondent à la nicotine et l'anabasine (déjà isolés dans cette espèce (Cherif *et al.*, 2019)) avec un temps de rétention de 0,75 et de 0,9 min, respectivement. Ces deux alcaloïdes ont montré un rendement plus élevé dans les extraits AE et *n*-BuOH par rapport à l'extrait DCM.

Alors que le dernier pic détecté dans l'extrait DCM avec un temps de rétention de 7,65min correspond à un dérivé de nornicotine (Octanoyl-nornicotine), le pic avec un temps de rétention de 2,2 min dans l'extrait *n*-BuOH correspond à l'acide indol eacrylique. Ces deux derniers alcaloïdes ont été identifiés pour la première fois dans l'espèce *N.glauca*

Le pic le plus abondant dans les extraits AE et *n*-BuOH avec un temps de rétention de 4,8 min a été identifié pour la première fois dans le genre *Nicotiana* comme un alcaloïde purinique : le puromycine.

- **Pour les coumarines;**

La comparaison des différents extraits nous a permis d'identifier deux coumarines: l'un dans l'extrait DCM, avec un temps de rétention de 5,75 min correspond au scopolétine (déjà détecté dans cette espèce par LC-MS/MS (Massadeh *et al.*,2022)) et l'autre a été détecté pour la première fois dans les extraits AE et *n*-BuOH de cette espèce en tant que 3-hydroxycoumarine avec un temps de rétention de 3,25 min. Le rendement de ce dernier dans l'extrait AE est plus élevé que dans l'extrait *n*-BuOH.

- **Pour les flavonoïdes;**

Parmi les composés phénoliques, deux flavonoïdes ont été détectés dans les extraits AE et *n*-BuOH. Le premier pic de temps de rétention de 5,51min correspond à la rutine (déjà détecté par LC-MS/MS (Massadeh *et al.*, 2022)) avec un rendement plus élevé dans les extraits AE par rapport à l'extrait *n*-BuOH. Le deuxième flavonoïde a un temps de rétention = 5,85 min a été identifié dans l'extrait AE comme étant Kaempferol-3-*O*-rutinoside pour la première fois dans cette espèce.

- **Pour les monoterpènes**

Dans l'extrait DCM , le pic avec un temps de rétention de 1,2min correspond à un monoterpène cétone :  $\beta$ -Damascénone (déjà détecté par LC-MS/MS dans cette espèce (Massadeh *et al.*,2022)) , alors que le pic avec un temps de rétention de 6,1 min correspond à monoterpène lactone : loliolide qui a été identifié pour la première fois dans cette espèce.

- **Pour les dérivés de l'acide hydroxy cinnamique;**

Ce type de composés constitue le deuxième groupe principal après la détection de quatre dérivés de l'acide hydroxycinnamique:

Les deux pics avec un temps de rétention 6,75 et 7,05 min correspondent respectivement à deux amides d'acide hydroxycinnamique qui ont été identifiés comme des isomères de Feruloyltyramine; le N-trans-Feruloyltyramine (Moupinamide) et le N-Cis-Feruloyltyramine, ce dernier représente le pic le plus abondant dans l'extrait DCM. Le troisième amide qui a été détecté dans l'extrait *n*-BuOH avec un temps de rétention de 1,40 min correspond à Cafféoyl putrescine.

Le seul acide phénolique qui a été détecté dans les extraits AE avec un temps de rétention de 6,2 min correspond à 3,4-Dicafféoyl-1,5-quinolactone. Ce sont des molécules qui ont été identifiées pour la première fois.

- **Pour les homosérine lactone**

L'analyse LC-MS/MS a également montré un pic dans l'extrait *n*-BuOH avec un temps de rétention de 6,45min, ce composé a été identifié pour la première fois dans l'espèce *N.glauca* comme une 3-oxo-C4-homoserine lactone.

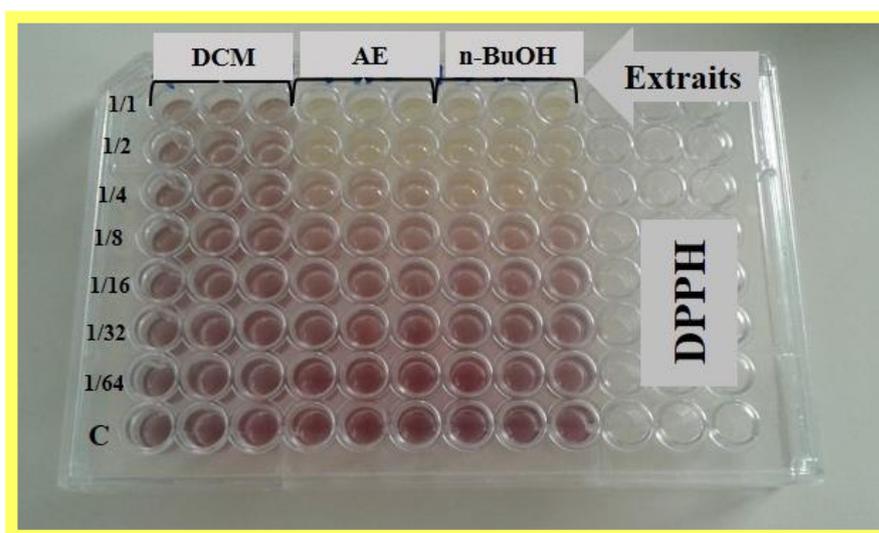
## 5. Détermination du potentiel antioxydant des extraits

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses des différents tests complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Popovici *et al.*,2009).

Dans la présente étude, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits : dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AE) et butanolique (*n*-BuOH) de *N.glauca*, a été réalisée par l'utilisation de six méthodes. Ces tests ont été choisis, parmi les tests les plus cités dans la littérature.

### 5.1. Test au DPPH

Cette méthode est basée sur la capacité de réduction d'une solution alcoolique du DPPH en présence des substances anti oxydantes. La forme anti radicalaire DPPH-H est formée. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de chaque extrait testé et des standards BHT et BHA sont présentés dans le **Tableau IV.6.**



**Figure IV.38.** Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) des extraits de *N.glauca*

**Tableau IV.7.** Inhibition du radical DPPH par les extraits de *N.glauca*

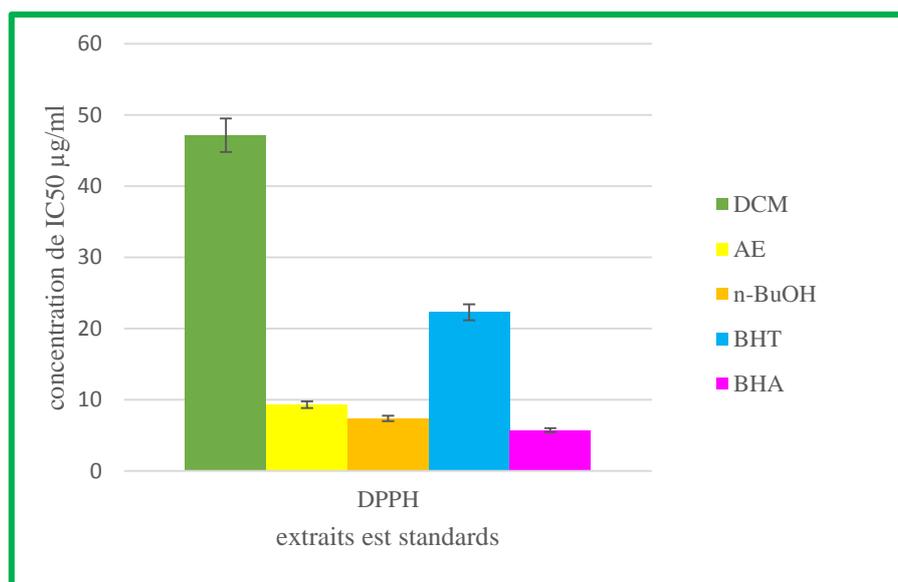
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibition							IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	0,781	1,562	3,125	6,25	12,5	25	50	
DCM	4,08 $\pm$ 1,54	7,56 $\pm$ 0,17	10,65 $\pm$ 0,58	16,07 $\pm$ 0,99	23,13 $\pm$ 1,45	37,44 $\pm$ 0,97	50,93 $\pm$ 0,59	47,17 $\pm$ 0,67
AE	8,04 $\pm$ 0,95	15,05 $\pm$ 0,37	25,21 $\pm$ 0,80	41,89 $\pm$ 0,19	58,71 $\pm$ 0,51	87,33 $\pm$ 0,65	88,64 $\pm$ 0,74	9,31 $\pm$ 0,92
<i>n</i> -BUOH	5,96 $\pm$ 1,31	12,83 $\pm$ 1,43	28,49 $\pm$ 2,66	43,87 $\pm$ 2,82	75,83 $\pm$ 1,39	87,38 $\pm$ 0,81	88,98 $\pm$ 0,15	7,40 $\pm$ 0,41
BHT	-	-	11,69 $\pm$ 1,88	22,21 $\pm$ 1,30	37,12 $\pm$ 1,80	52,63 $\pm$ 2,70	56,02 $\pm$ 0,53	22,32 $\pm$ 1,19
BHA	-	-	28,95 $\pm$ 1,16	54,33 $\pm$ 1,59	76,76 $\pm$ 1,65	84,09 $\pm$ 0,35	87,53 $\pm$ 0,82	5,73 $\pm$ 0,41

Les résultats obtenus (**Tableau IV.7.**) Montrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards BHT et BHA ou pour les extraits : DCM, AE et *n*-BuOH issus des feuilles de *N.glauca*.

On observe que le pourcentage d'inhibition des extraits *n*-BuOH et AE sont très proche avec 5,96 $\pm$ 1,31% et 8,04 $\pm$ 0,95% respectivement à une concentration de 0,781 $\mu\text{g/mL}$  (**Tableau IV.7.**); 88,98 $\pm$ 0,15% et 88,64 $\pm$ 0,74% à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$  respectivement, sont plus actifs par rapport au BHT. Ces deux extraits sont aussi supérieurs à celui de l'extrait DCM pour toutes les concentrations (4,08 $\pm$ 1,54% à 0,781 $\mu\text{g/mL}$  et 50,93 $\pm$ 0,59% à 50 $\mu\text{g/mL}$ ).

En revanche le pourcentage d'inhibition du radical DPPH de ce dernier (extrait DCM) est inférieur à celui de BHT et BHA à toutes les concentrations testées (de 0,781  $\mu\text{g/mL}$  à 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

On peut conclure que les extraits des feuilles de *N.glauca* étudiées possèdent un pouvoir antioxydant assez important. Ce pouvoir est confirmé par les valeurs d'IC<sub>50</sub> (**Figure IV.39.**).



**Figure IV.39.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> du test DPPH pour les extraits de *N.glauca*

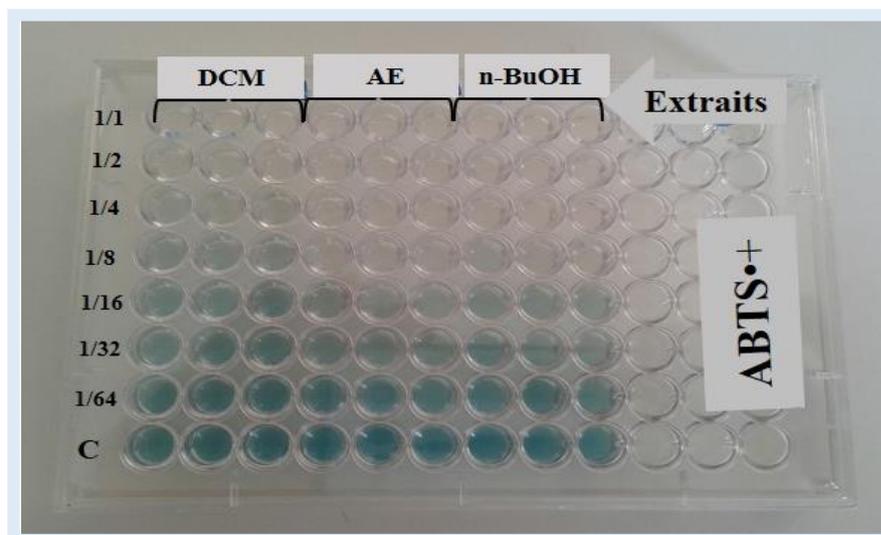
Le pouvoir antioxydant de l'extrait *n*-BuOH avec une valeur de IC<sub>50</sub> de 7,40±0,41µg/mL, est plus faible que ceux obtenus par l'extrait AE (9,31±0,92µg/mL) et l'extrait DCM (47,17 ± 0,67µg/mL). Ces valeurs sont supérieures à celle obtenue par le standard positif (BHA) avec la valeur de IC<sub>50</sub> de 5,73 ± 0,41 µg/mL. Cette valeur reste faible comparativement au BHT qui égale à 22,32 ± 1,19 µg/mL. L'extrait *n*-BuOH exprime donc, un pouvoir antioxydant plus grand que les autres extraits.

Si on classe nos extraits selon la puissance de réduction de DPPH par rapport aux standards, on obtiendra l'ordre suivant:

**BHA > *n*-BuOH > AE > BHT > DCM.**

## 5.2. Test à l'ABTS

Dans ce test, l'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> de couleur bleu/vert en ABTS incolore. Cette décoloration de la solution a été suivie par la mesure de l'absorbance et s'exprime par le pourcentage d'inhibition des différents extraits sélectifs de *N.glauca*, appliqué chacun à une série des concentrations comprise entre 3,125-200µg/mL en comparaison avec les standards BHA et BHT ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50%. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :



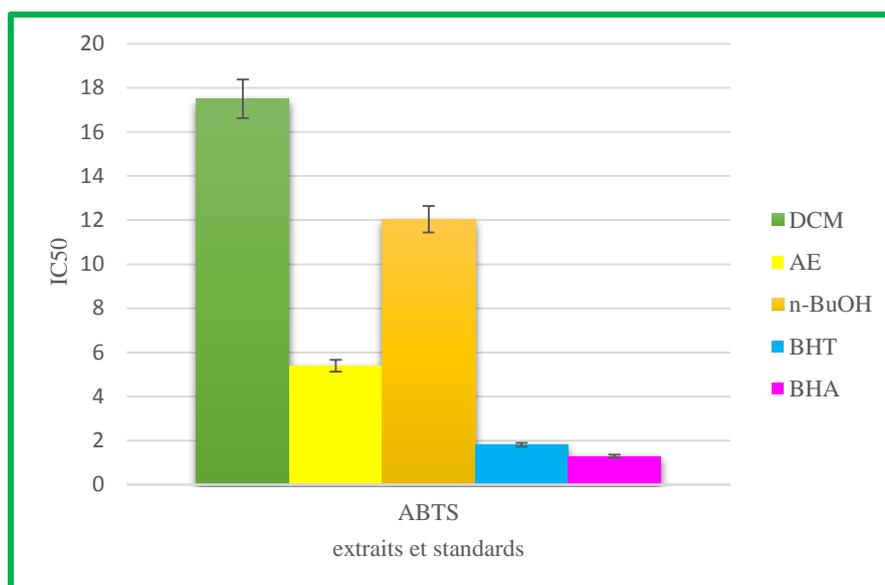
**Figure IV.40.** Plaquette de dosage de l'activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$  des extraits de *N. glauca*

**Tableau IV.8.** Inhibition du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$  par les extraits de *N. glauca*

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibition							
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
DCM	19,54 $\pm$ 1,64	39,33 $\pm$ 0,96	43,78 $\pm$ 1,16	59,68 $\pm$ 1,67	79,15 $\pm$ 0,76	86,71 $\pm$ 0,96	89,05 $\pm$ 0,39	17,51 $\pm$ 1,23
AE	32,72 $\pm$ 0,39	60,91 $\pm$ 1,06	64,13 $\pm$ 1,16	86,71 $\pm$ 0,96	89,55 $\pm$ 0,10	91,66 $\pm$ 0,67	93,44 $\pm$ 0,39	5,39 $\pm$ 0,64
<i>n</i> -BuOH	22,87 $\pm$ 1,26	45,73 $\pm$ 0,48	50,34 $\pm$ 0,39	78,09 $\pm$ 0,48	88,93 $\pm$ 0,19	89,60 $\pm$ 0,10	91,66 $\pm$ 0,58	12,04 $\pm$ 0,43
BHT	59,22 $\pm$ 0,59	78,55 $\pm$ 3,43	90,36 $\pm$ 0,00	92,18 $\pm$ 1,27	93,37 $\pm$ 0,86	94,87 $\pm$ 0,87	96,68 $\pm$ 0,39	1,81 $\pm$ 0,10
BHA	83,42 $\pm$ 4,09	93,52 $\pm$ 0,09	93,58 $\pm$ 0,09	93,63 $\pm$ 0,16	93,63 $\pm$ 0,95	94,20 $\pm$ 0,90	95,39 $\pm$ 2,62	1,29 $\pm$ 0,30

Selon les résultats enregistrés dans le **Tableau IV.8.**, tous les extraits présentent une capacité de piégeage des radicaux libres forte à différentes concentrations mais nettement inférieures que celle des standards (BHA et BHT).

Pour les extraits, le meilleur résultat obtenu est celui de l'extrait AE qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 93,44 $\pm$ 0,39% à une concentration de 200  $\mu\text{g/mL}$  contre 91,66 $\pm$ 0,58% pour l'extrait *n*-BuOH et 89,05 $\pm$ 0,39% pour l'extrait DCM à la même concentration. Pour la concentration minimale de 3,125  $\mu\text{g/mL}$  l'extrait AE produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre 32,72 $\pm$ 0,39% contre 22,87 $\pm$ 1,26% pour l'extrait *n*-BuOH et 19,54 $\pm$ 1,64% pour le DCM.



**Figure IV.41.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> du test ABTS pour les extraits de *N.glauca*

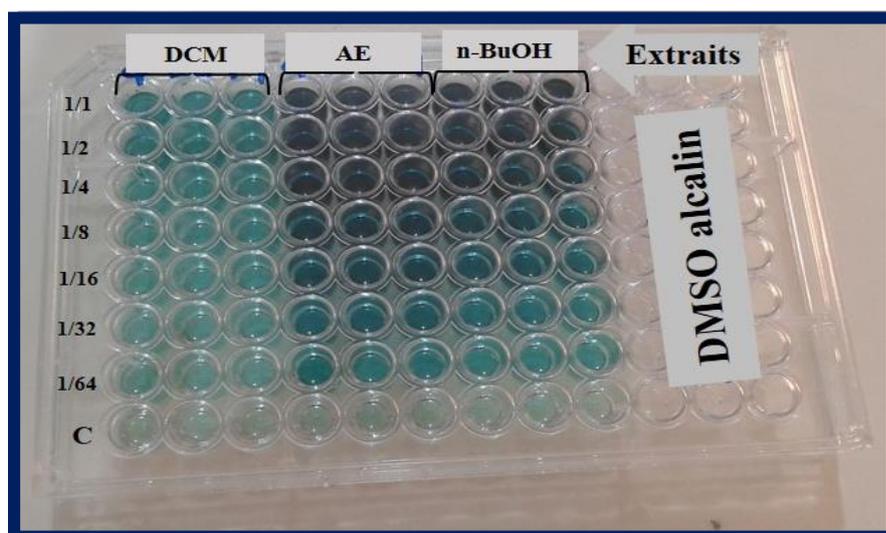
A partir de la représentation graphique ci-dessus on remarque que le BHA possède un IC<sub>50</sub> plus faible = 1,29±0,30 µg/mL, suivi par le BHT qui a une valeur d'IC<sub>50</sub> de 1,81±0,10 µg/mL, puis les extraits ou la IC<sub>50</sub> a été estimée à 5,39±0,64 µg/mL pour l'extrait AE, 12,04±0,43 µg/mL pour l'extrait *n*-BuOH et de 17,51±1,23µg/mL pour l'extrait DCM. L'extrait acétate d'éthyle exprime donc, un pouvoir antioxydant plus grand que les autres extraits.

Le classement des standards et les extraits selon leur puissance de réduction d'ABTS est le suivant :

**BHA > BHT > AE > *n*-BuOH > DCM.**

### 5.3. Test par superoxyde DMSO alcalin

Le pourcentage d'inhibition du radical superoxyde par chacun des extraits de *N.glauca*, appliqué chacun à une série des concentrations comprise entre 3,125-200µg/mL est calculé par rapport à des antioxydants standards (acide tannique et α-tocophérol) ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50%. Les résultats sont résumés dans le **Tableau IV.9.**



**Figure IV.42.** Plaque de dosage de l'activité du piégeage par superoxide DMSO alcalin des extraits de *N.glauca*

**Tableau IV.9.** Inhibition du DMSO alcalin par les extraits de *N.glauca*

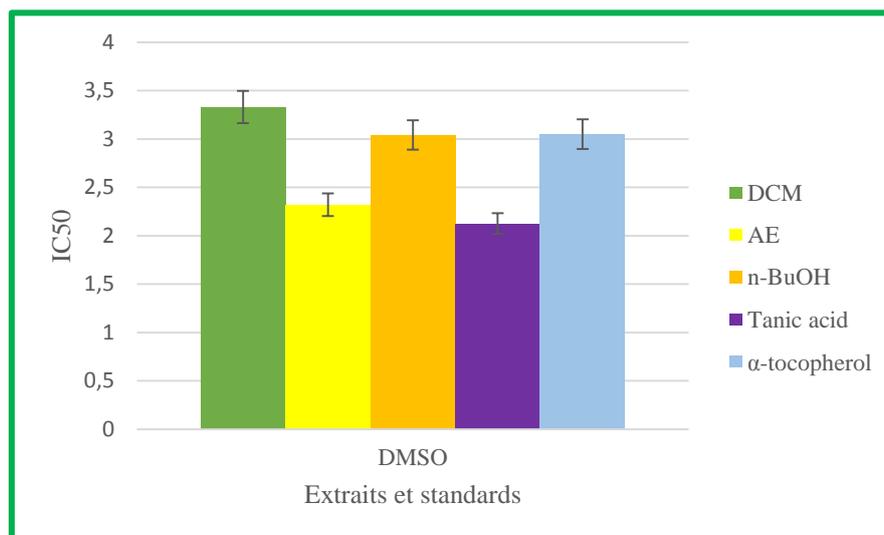
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibition							
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
DCM	49,35 $\pm$ 0,66	59,35 $\pm$ 0,87	65,38 $\pm$ 1,60	72,15 $\pm$ 0,13	78,45 $\pm$ 0,48	85,54 $\pm$ 0,12	88,69 $\pm$ 0,16	3,33 $\pm$ 0,22
AE	76,70 $\pm$ 1,12	85,00 $\pm$ 0,38	89,99 $\pm$ 0,21	92,64 $\pm$ 0,08	95,93 $\pm$ 0,10	96,68 $\pm$ 0,06	97,14 $\pm$ 0,12	2,32 $\pm$ 0,14
<i>n</i> -BuOH	72,60 $\pm$ 1,22	79,41 $\pm$ 0,37	87,55 $\pm$ 0,54	90,58 $\pm$ 0,05	93,55 $\pm$ 0,01	96,33 $\pm$ 0,01	96,98 $\pm$ 0,05	3,04 $\pm$ 0,16
Acide tannique	83,58 $\pm$ 1,00	88,35 $\pm$ 0,61	92,66 $\pm$ 0,42	94,98 $\pm$ 0,85	96,53 $\pm$ 0,23	96,95 $\pm$ 0,81	97,54 $\pm$ 0,68	< 3,125
$\alpha$ -tocophérol	70,09 $\pm$ 1,84	79,07 $\pm$ 2,54	85,1 $\pm$ 1,36	89,48 $\pm$ 0,88	94,76 $\pm$ 0,28	96,62 $\pm$ 0,29	96,86 $\pm$ 1,53	< 3,125

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage par superoxide DMSO alcalin, a montré que tous les extraits de la plante étudiée ainsi que les standards, présentent des propriétés anti oxydantes fortes et presque similaire à différentes concentrations (**Tableau IV.9.**). On remarque que le pourcentage d'inhibition pour les trois extraits est inférieur à celui de l'acide tannique pour toutes les concentrations utilisées.

Pour une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ , *N.glauca* a révélé un pourcentage d'inhibition de = 97,14 $\pm$ 0,12% pour le l'extrait AE, 96,98 $\pm$ 0,05% pour l'extrait *n*-BuOH et 88,69 $\pm$ 0,16% pour le DCM tandis que le standard  $\alpha$ -tocophérol est inhibée avec

96,86±1,53% de DMSO alcalin. Cependant, ceux-ci sont inférieurs aux pourcentages d'inhibition de l'acide tannique qui égale à 97,54±0,68% en fonction des concentrations.

En effet, une concentration faible de l'ordre 3,125µg/mL produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 76,70±1,12% pour l'extrait AE, 72,60±1,22% pour l'extrait n-BuOH et 49,35±0,66% pour l'extrait DCM par rapport à celle de l'acide tannique (83,58±1,00) et α-tocophérol (70,09±1,84).



**Figure IV.43.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> du test DMSO alcalin pour les extraits de *N.glauca*

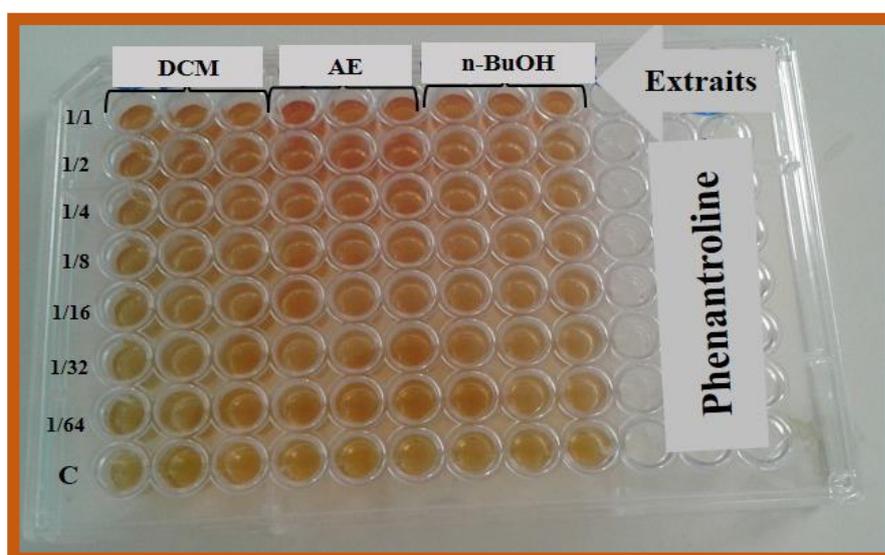
On remarque selon la **Figure IV.43.** ci-dessus qu'il n'existe pas une différence entre l'extrait AE, extrait *n*-BuOH et les standards acide tannique et α-tocophérol qui produisent des IC<sub>50</sub> importants et presque similaires ( $\leq 3,04\mu\text{g/mL}$ ). Cependant, la plus faible revient à l'extrait DCM qui a une valeur d'IC<sub>50</sub> de 3,33±0,22µg/mL.

Pour les extraits, les résultats obtenus par ce test vont dans le même sens que ceux obtenus par l'ABTS.

**ACIDE TANNIQUE > α-TOCOPHEROL > AE > n-BuOH > DCM.**

### 5.4. Test de phénantroline

Ce test est basé sur une réaction d'oxydoréduction qui a été suivie par la formation d'un complexe  $Fe^{+2}$ - phénantroline de couleur rouge-orangé. Cette réduction est déterminée par la mesure de valeurs d'absorbance  $A$  des extraits de la plante appliqué chacun à une série des concentrations comprise entre 3,125-200 $\mu$ g/ml et celles des standards BHA et BHT ainsi que les valeurs de la concentration d'absorbance  $A_{0,5}$  ce qui a permis d'obtenir les résultats suivants :

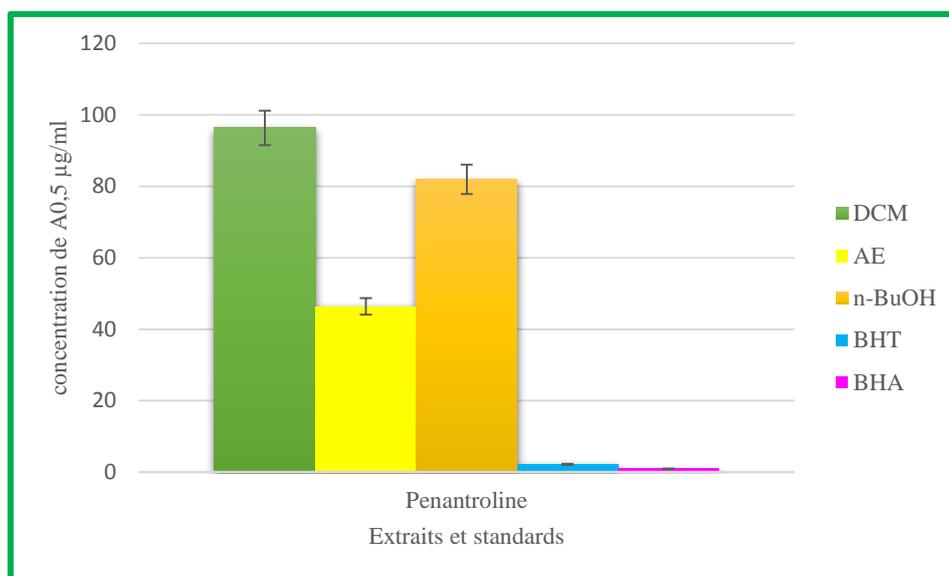


**Figure IV.44.** Plaqué de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe  $Fe^{+2}$  phénantroline par les extraits de *N.glauca*

**Tableau IV.10.** Absorbance du complexe  $Fe^{+2}$  phénantroline des extraits de *N.glauca*

Concentration ( $\mu$ g/mL)	Absorbance							
Extraits	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	$A_{0,5}$ $\mu$ g/mL
DCM	0,02 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,00	0,70 $\pm$ 0,01	96,33 $\pm$ 1,30
AE	0,04 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,00	0,98 $\pm$ 0,00	1,46 $\pm$ 0,01	46,43 $\pm$ 0,77
<i>n</i> -BuOH	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,00	0,59 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,04	81,98 $\pm$ 2,16
Standards	0,78125	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50	$A_{0,5}$ $\mu$ g/mL
BHT	0,47 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,02	1,84 $\pm$ 0,01	3,48 $\pm$ 0,03	4,84 $\pm$ 0,01	2,24 $\pm$ 0,17
BHA	0,49 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,01	1,25 $\pm$ 0,04	2,10 $\pm$ 0,05	4,89 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,07

Nous observons que l'activité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration (**Tableau IV.10.**). Le pouvoir réducteur de l'extrait *n*-BuOH et l'extrait DCM s'élèvent des absorbances de (0,05±0,01 ; 0,02±0,00) à la concentration 3,125 µg/mL et aussi (0,96±0,04 ; 0,70±0,01) à la concentration 200 µg/mL, respectivement. Ces deux extraits ont présenté l'activité la plus faible par rapport aux standards : BHA et BHT. Pour l'extrait AE a enregistré un pouvoir réducteur considérable avec des absorbances de 0,04±0,00 et 1,46±0,01 à la concentration 3,125 µg/mL et 200 µg/mL, respectivement. Mais cette capacité reste plus faible comparativement aux standards.



**Figure IV.45.** Valeurs des A<sub>0,5</sub> du test phénantroline pour les extraits de *N. glauca*

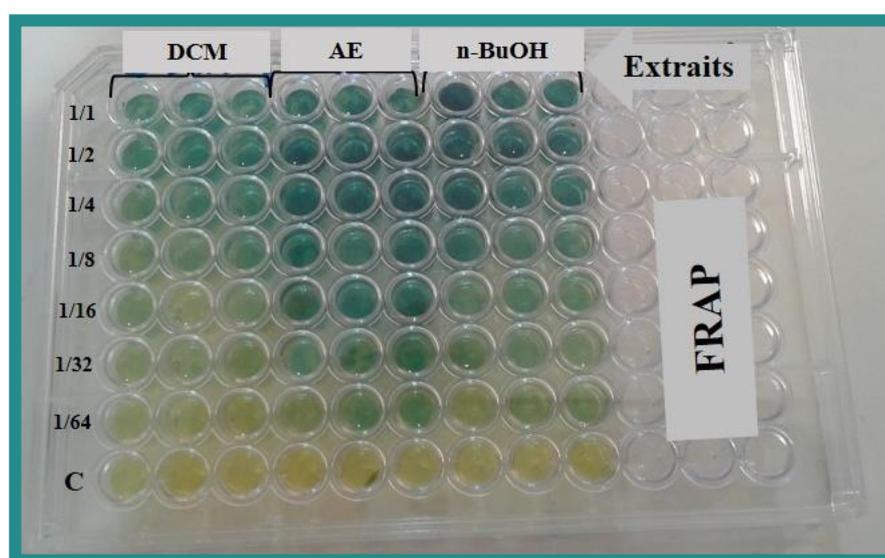
D'après la **Figure IV.45.** ci-dessus, l'extrait AE a présenté une meilleure activité réductrice avec A<sub>0,5</sub>=46,43±0,77µg/mL, en comparaison avec les extraits. Par contre, l'extrait DCM et *n*-BuOH a montré une activité anti radicalaire faible (A<sub>0,5</sub>=96,33±1,30µg/mL et A<sub>0,5</sub>=81,98±2,16µg/mL, respectivement) par rapport aux valeurs des standards.

Le classement des standards et les extraits selon leur puissance de réduction du complexe Fe<sup>+2</sup> phénantroline est le suivant :

$$\mathbf{BHA > BHT > AE > n\text{-BuOH} > DCM.}$$

### 5.5. Test de FRAP

Cette méthode est un essai simple, rapide et reproductible basée sur la réaction chimique de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . Par conséquent,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant les valeurs d'absorbance  $A$  des extraits de *N.glauca*, appliqué chacun à une série des concentrations comprise entre 12,5-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$  et par comparaison avec les standards acide tannique et  $\alpha$ -tocophérol ainsi que les valeurs ainsi que les valeurs de la concentration d'absorbance  $A_{0,5}$ . Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous :



**Figure IV.46.** Plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits de *N.glauca*

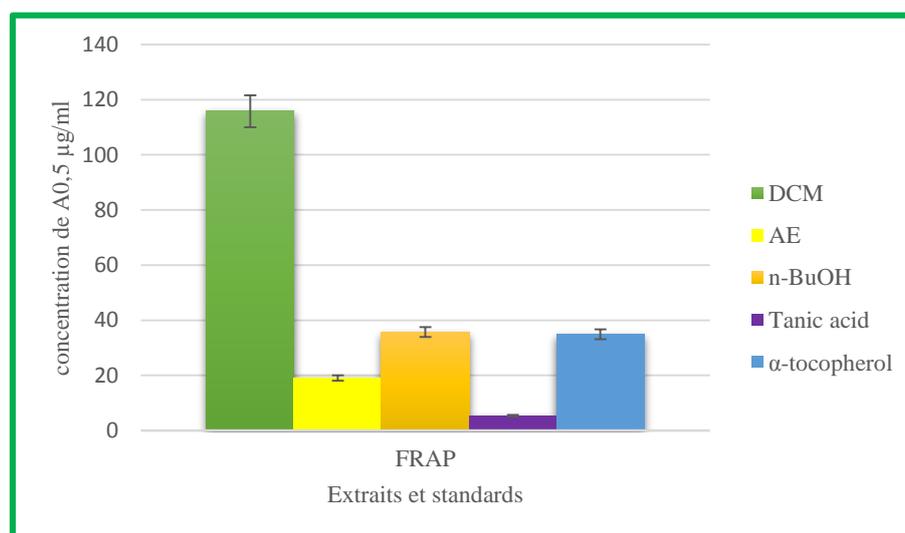
**Tableau IV.11.** Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits de *N.glauca*

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorbance							
Extraits	12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	800 $\mu\text{g}/\text{ml}$	$A_{0,5} \mu\text{g}/\text{mL}$
DCM	0,098 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,04	115,83 $\pm$ 1,83
AE	0,37 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,04	1,31 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,03	2,00 $\pm$ 0,04	2,41 $\pm$ 0,09	19,06 $\pm$ 0,50
n-BuOH	0,21 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,11	2,39 $\pm$ 0,15	35,71 $\pm$ 3,50
Standards	3,125 $\mu\text{g}$	6,25 $\mu\text{g}$	12,5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	$A_{0,5} \mu\text{g}/\text{mL}$
Acide Tannique	0,28 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,6	1,01 $\pm$ 0,21	1,02 $\pm$ 0,13	5,39 $\pm$ 0,91
$\alpha$ -Tocophérol	0,11 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,08	1,81 $\pm$ 0,09	34,93 $\pm$ 2,38

Les résultats obtenus montrent que le taux d'absorbance augmente en fonction de l'augmentation de la concentration utilisée (**Tableau IV.11.**). A une concentration de  $12,5\mu\text{g/mL}$ , l'extrait AE enregistre le pouvoir réducteur le plus important de l'ordre de  $0,37\pm 0,00$  comparativement à l'extrait *n*-BuOH ( $0,21\pm 0,09$ ) et à  $\alpha$ -Tocophérol ( $0,21\pm 0,03$ ). Mais cette capacité reste plus faible par rapport à l'acide tannique avec une absorbance égale à  $1,02\pm 0,07$  à la même concentration.

En effet, une concentration de l'ordre  $200\mu\text{g/mL}$  produit une absorbance de l'ordre de  $2,41\pm 0,09$  pour l'extrait AE,  $2,39\pm 0,15$  pour l'extrait *n*-BuOH par rapport aux standards.

Pour l'extrait dichloroformique DCM, les concentrations  $12,5$  et  $200\mu\text{g/mL}$  produisent les capacités à réduire le fer les plus faibles qui sont égales à  $0,098\pm 0,00$  et  $0,74\pm 0,01$  comparativement aux autres extraits et aussi aux standards.



**Figure IV.47.** Valeurs des  $A_{0,5}$  du test FRAP pour les extraits de *N.glauca*

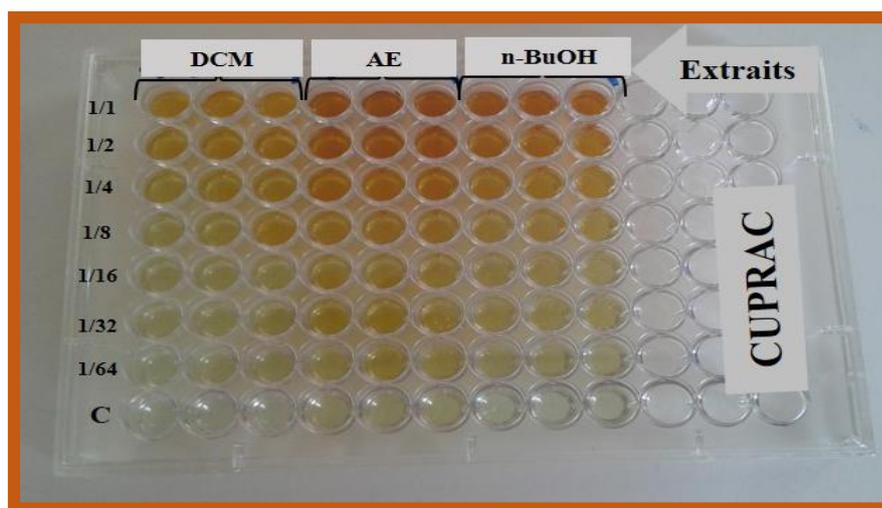
D'après la **Figure IV.47.** l'extrait AE présente une capacité réductrice importante avec  $A_{0,5} = 19,06 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$  comparativement à l'extrait *n*-BuOH qui possède une capacité moyenne avec  $A_{0,5} = 35,71 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$  et l'extrait DCM qui présente une capacité faible de l'ordre de  $115,83 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$  et aussi par rapport à  $\alpha$ -Tocophérol ( $A_{0,5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$ ). Mais tous ces extraits, leurs  $A_{0,5}$  sont supérieures à la valeur de l'acide tannique ( $A_{0,5} = 5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ ) qui présente la plus forte activité réductrice.

Le classement des standards et les extraits selon leur puissance de la réduction du fer est le suivant :

**ACIDE TANNIQUE > AE >  $\alpha$ -TOCOPHEROL > *n*-BuOH > DCM.**

## 5.6. Test de CUPRAC

Ce test est basé sur les modifications des caractéristiques d'absorption du complexe néocuproïne (Nc) cuivre (II) lorsqu'il est réduit par un antioxydant. le dosage de cette réaction est mesuré à titre des valeurs d'absorbance  $A_{0,5}$  des extraits de la plante appliqué chacun à une série des concentrations comprise entre 3,125-200 $\mu\text{g/mL}$  et comparé au standards BHA et BHT ainsi que les valeurs de la concentration d'absorbance  $A_{0,5}$ . Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :



**Figure IV.48.** Plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits de *N.glauca*

**Tableau IV.12.** La capacité antioxydante de réduction du cuivre de *N.glauca*

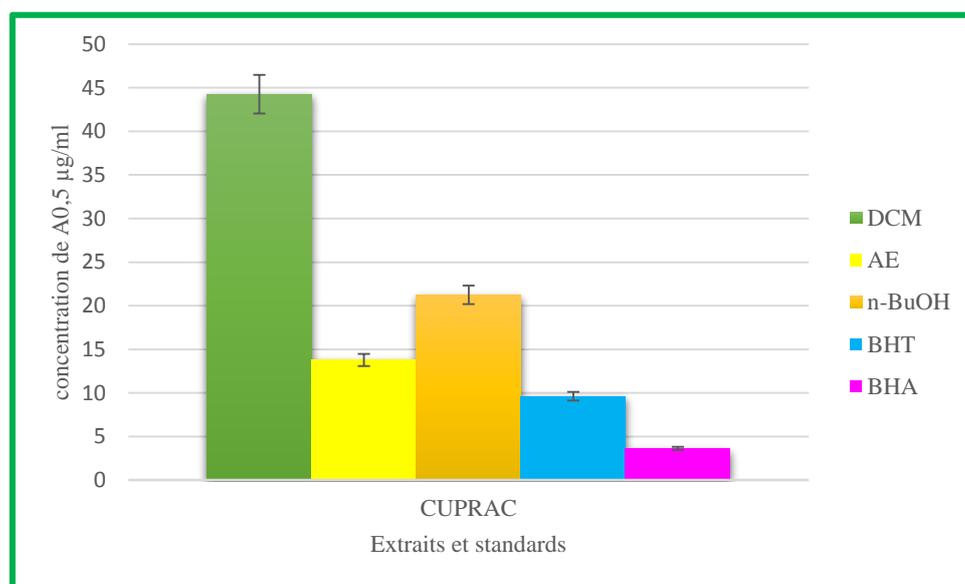
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbance							
	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	$A_{0,5} \mu\text{g/mL}$
DCM	0,04 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,00	1,18 $\pm$ 0,00	1,87 $\pm$ 0,02	44,26 $\pm$ 0,80
AE	0,31 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,00	0,84 $\pm$ 0,05	1,58 $\pm$ 0,01	2,75 $\pm$ 0,09	4,03 $\pm$ 0,07	13,78 $\pm$ 0,26
<i>n</i> -BuOH	0,15 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,02	2,15 $\pm$ 0,09	4,13 $\pm$ 0,04	21,24 $\pm$ 1,30
BHT	0,19 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,07	1,48 $\pm$ 0,09	2,04 $\pm$ 0,14	2,32 $\pm$ 0,28	9,62 $\pm$ 0,87
BHA	0,46 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,01	1,34 $\pm$ 0,08	2,36 $\pm$ 0,17	3,45 $\pm$ 0,02	3,76 $\pm$ 0,03	3,93 $\pm$ 0,01	3,64 $\pm$ 0,19

D'après le **Tableau II.12**, l'absorbance de l'activité antioxydante par la réduction du complexe cuivre-néocuproïne des extraits de *N.glauca* est proportionnel à la concentration.

Les extraits AE et *n*-BuOH ont des meilleures capacités réductrices avec des densités optiques maximales de  $4,03\pm 0,07$  et  $4,13\pm 0,04$  à la concentration 200  $\mu\text{g/ml}$  comparativement aux standards (BHT= $2,32\pm 0,28$  et BHA= $3,93\pm 0,01$ ) à la même concentration, respectivement.

A 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , les deux derniers extraits (AE et *n*-BuOH) s'élèvent de  $0,31\pm 0,00$  et  $0,15\pm 0,01$  par rapport aux standards (BHT= $0,19\pm 0,01$  et BHA= $0,46\pm 0,00$ ) à la même concentration, respectivement.

Pour l'extrait DCM sa capacité reste la plus faible par rapport aux différents extraits ainsi que les standards avec des absorbances égale à  $0,04\pm 0,00$  et  $1,87\pm 0,02$  à la concentration 3,125 et 200  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.



**Figure IV.49.** Les valeurs des A<sub>0,5</sub> du test CUPRAC pour les extraits de *N.glauca*

A partir de la représentation graphique ci-dessous (**Figure IV.49.**) on remarque que le meilleur pouvoir réducteur a été obtenu par l'extrait AE avec une valeur A<sub>0,5</sub>=  $13,78\pm 0,26\mu\text{g/mL}$ . Ensuite, cette activité est suivie par l'extrait *n*-BuOH qui a une valeur d'A<sub>0,5</sub>=  $21,24\pm 1,30\mu\text{g/ml}$ . Toutefois, les deux standards le BHA et le BHT présentent les plus fortes activités réductrices (A<sub>0,5</sub>= $3,64\pm 0,19$  et  $9,62\pm 0,87\mu\text{g/mL}$  respectivement).

Alors que l'extrait DCM avec  $A_{0,5} = 44,26 \pm 0,80 \mu\text{g/mL}$  a montré le pouvoir réducteur le plus faible par rapport aux standards (BHA et BHT) et aux autres extraits.

Le classement des standards et les extraits selon leur puissance de réduction du complexe cuivre-néocuproïne est le suivant :

**BHA > BHT > AE > *n*-BuOH > DCM.**

L'ensemble des résultats obtenus en utilisant six méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous a permis de conclure que l'extrait AE et *n*-BuOH des feuilles de *N. glauca* sont les extraits les plus actifs par rapport à l'extrait apolaire DCM.

- **Choix de l'extrait brut à étudier**

Pour notre étude, plusieurs critères ont guidé notre choix concernant l'extrait brut à étudier, parmi lesquels :

- Les résultats obtenus de l'évaluation antioxydante qui nous permettent de retenir en priorité les extraits (AE) et (*n*-BuOH) comme sources potentielles de substance antioxydante (En raison de l'effet antioxydant important de l'extrait brut (*n*-BuOH))
- Les résultats d'analyse chromatographique qui nous a montré que des deux extraits AE et *n*-BuOH sont très proches concernant leur richesse en métabolites secondaires. Cependant, la masse de l'extrait AE (6,8 g) reste faible par rapport à l'extrait *n*-BuOH (33,94 g)

Pour ces raisons, l'étude de l'extrait brut (*n*-BuOH) est réalisée en priorité comme source potentielle de substances antioxydantes. Il sera soumis à une étude phytochimique de fractionnement en vue d'isoler de potentiels agents bioactifs.

## 6. Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH

Une masse d'environ 5g d'extrait *n*-BuOH est déposée sur une colonne de polyamide DC6 comme phase stationnaire, dans le but de fractionner l'extrait à des sous fractions pour faciliter leur séparation à cause du nombre élevé des produits contenus dans cette extrait. L'élution est réalisée par le mélange (toluène-MeOH) avec des polarités croissantes. Des fractions de 100 ml ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice éluée par les systèmes suivants :

- (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH) (9 :1) ;
- (Acétate d'éthyle : MeOH : Eau) (10 :1 :1)

Les plaques CCM visualisées sous l'umière UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'ammoniaque. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (**Tableau IV.13**).

**Tableau IV.13.** La progression de la colonne polyamide de l'extrait *n*-BuOH

Lots des fractions	Système d'élution (%)	
	Toluène	MeOH
F <sub>1</sub> -F <sub>3</sub>	100	0
F <sub>4</sub> -F <sub>6</sub>	95	5
F <sub>7</sub> -F <sub>9</sub>	90	10
F <sub>10</sub> -F <sub>12</sub>	80	20
F <sub>13</sub> -F <sub>19</sub>	70	30
<b>F<sub>20</sub>-F<sub>27</sub></b>	60	40 (précipité jaune)
F <sub>28</sub> -F <sub>36</sub>	50	50
F <sub>37</sub> -F <sub>40</sub>	40	60
F <sub>41</sub> -F <sub>42</sub>	30	70
F <sub>43</sub> -F <sub>45</sub>	0	100

Le regroupement des fractions à partir du système des solvants (toluène : MeOH) (80 :20) jusqu'à (toluène : MeOH) (50 :50) issue de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-BuOH de *N.glauca* est très difficile, cela est dû à la présence d'un composé majoritaire dans presque toutes les fractions (**F<sub>10</sub>-F<sub>36</sub>**).

- Les fractions (F<sub>20</sub>-F<sub>27</sub>) :

Un composé majoritaire sous forme d'un précipité jaune (43mg) a été obtenu de la fraction (F<sub>20</sub>-F<sub>27</sub>) qui a été purifié par un lavage par le dichlorométhane. Il a été testé sur plaque CCM de gel de silice pour donner une seule tache majoritaire avec une fluorescence jaune sous UV 365 nm, c'est un produit pur (P\*).

### 6.1. Détermination structurale du composé P\*

Le composé P\* isolé de l'extrait *n*-BuOH a été identifié par la comparaison de leurs données spectrales (UV-visible, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C) avec celles décrites dans la littérature (Niassy *et al.*, 2004)

#### 6.1.1. UV-visible

Le composé P\* est isolé forme de poudre jaune. Le spectre UV dans le méthanol présente un maximum d'absorption à 256 nm (bande II) et un autre à 356 nm (bande I) confirmant la structure d'un flavonoïde de type flavonol substitué en 3 (Chen *et al.*, 2011).

L'ensemble des résultats de la série spectrale UV-Visible sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.14.** Données de la série spectrale UV-Visible du composé P\*

Réactifs	Les déplacements (nm)	
	Bande I	Bande II
MeOH	356	256
NaOH	412 + Apparition d'une nouvelle bande à 324nm	272
NaOH+5min	412	272
AlCl <sub>3</sub>	431	274
AlCl <sub>3</sub> +HCl	400	270
NaOAc	370	269
NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	374	261

La série spectrale UV tire les indications suivantes :

- L'addition du réactif NaOH provoque un déplacement bathochromique de la bande I +56 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, avec stabilité de l'intensité de l'absorbance ce qui indique un OH libre en position 4'. Par ailleurs

l'apparition d'une nouvelle bande à 324 indique la présence d'un OH libre en position 7.

- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = +13$  nm) par rapport au spectre du MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7
- Le déplacement bathochrome  $\Delta\lambda = +44$  nm de la bande I observé dans le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié ( $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ), comparativement à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.
- La présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B a été confirmée d'une part par le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +31$  nm) du spectre  $\text{AlCl}_3$  par rapport au spectre  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ , et d'une autre part par le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +18$  nm) du spectre  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$  en comparant avec celui enregistré dans le MeOH.

### 6.1.2. RMN<sup>1</sup>H

Le spectre RMN<sup>1</sup>H (300 MHz dans le DMSO-d<sub>6</sub>) du composé P\* (**Figure IV.50.**) présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques.

- **Identification de la partie aglycone :**

Au niveau du cycle A :

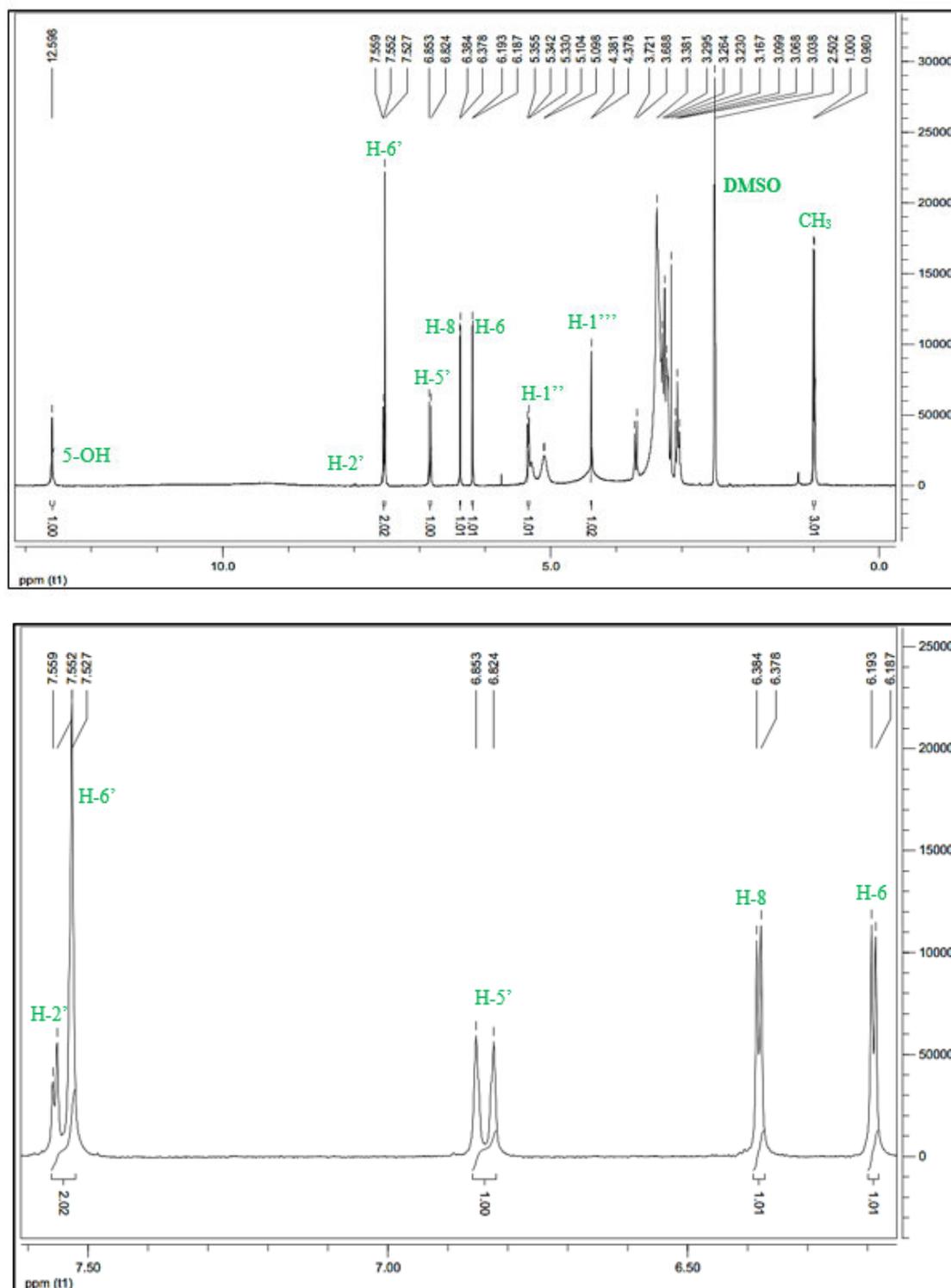
- Le proton à  $\delta$  6,20 ppm (1H, d,  $J = 1,8$  Hz) indicateur d'un couplage méta attribuable à H-6.
- Le proton à  $\delta$  6,41 ppm (1H, d,  $J = 1,8$  Hz) indicateur d'un couplage méta attribuable à H-8
- Le proton singulet à  $\delta$  12,59 ppm attribuable à 5-OH.

L'ensemble de ces trois signaux orient vers une disubstitution du cycle A des flavonoïdes en position 5 et 7 (**Figure IV.50.**)

Au niveau du cycle B :

le signal du proton H<sup>7</sup>-6 à  $\delta$  7,67 ppm est un doublet de doublet ( $J = 7,5$  ;  $J = 2,1$  Hz), révélant le couplage en ortho avec le proton H<sup>7</sup>-5 à  $\delta$  6,82 ppm, dont le signal est un doublet ( $J = 8,7$  Hz) et le couplage en méta avec le proton H<sup>7</sup>-2 à  $\delta$  7,53 ppm (d,  $J = 2,1$

Hz). L'ensemble de ces trois signaux orient vers une disubstitution du cycle B des flavonoïdes en position 4' et en 5' (**Figure IV.50.**)

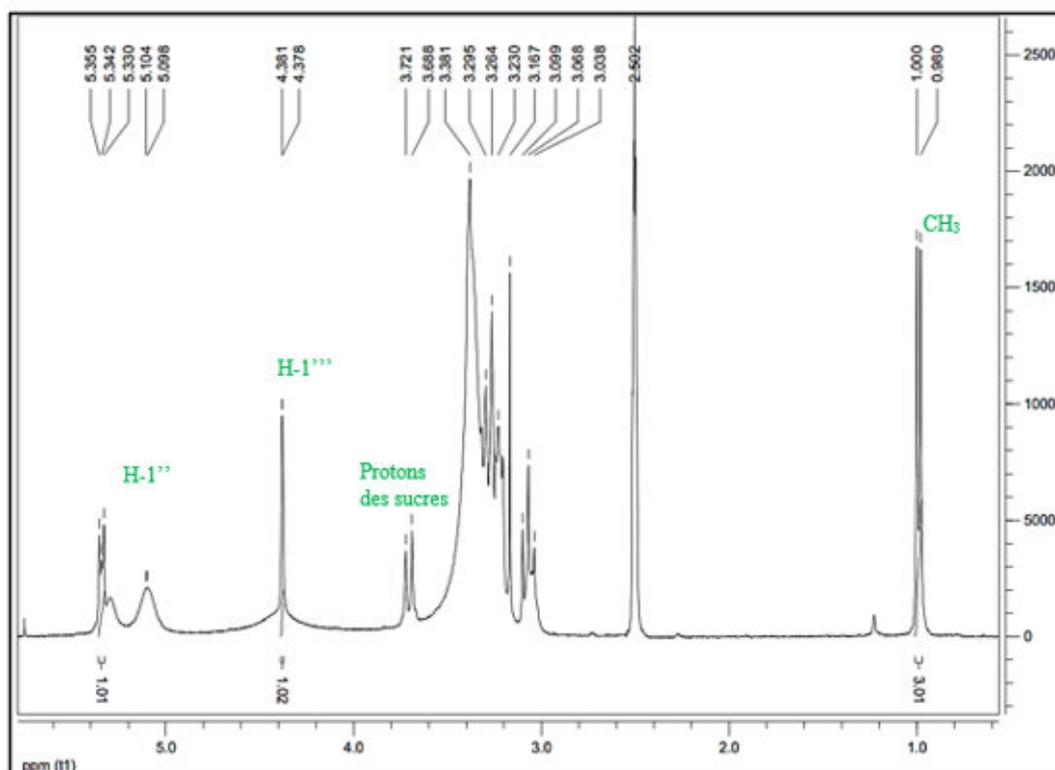


**Figure IV.50.** Spectre RMN<sup>1</sup>H étalé du composé P\* (région  $\delta=6.20$  ppm -12,59 ppm)

- **Identification de la partie osidique :**

La valeur élevée de la constante de couplage observée pour le signal du proton anomérique ( $H^{''}-1$ ) d'un des sucres centré à  $\delta$  5,34 ppm ( $d, J = 7,4$  Hz) suggère que ce sucre est sous la forme  $\beta$ -D-glycopyrannose ; l'autre proton anomérique ( $H^{'''}-1$ ) à  $\delta$  4,38 ppm ( $J = 0,9$  Hz) et le méthyle à  $\delta$  0,99 ppm ( $d, J = 6,0$  Hz) indiquent que ce sucre est sous la forme  $\alpha$ -L-rhamnopyrannose (Niassy *et al.*, 2004).

Dans l'intervalle (3,00 – 3,80) ppm se trouvent les autres protons du sucre (**Figure IV.51.**)

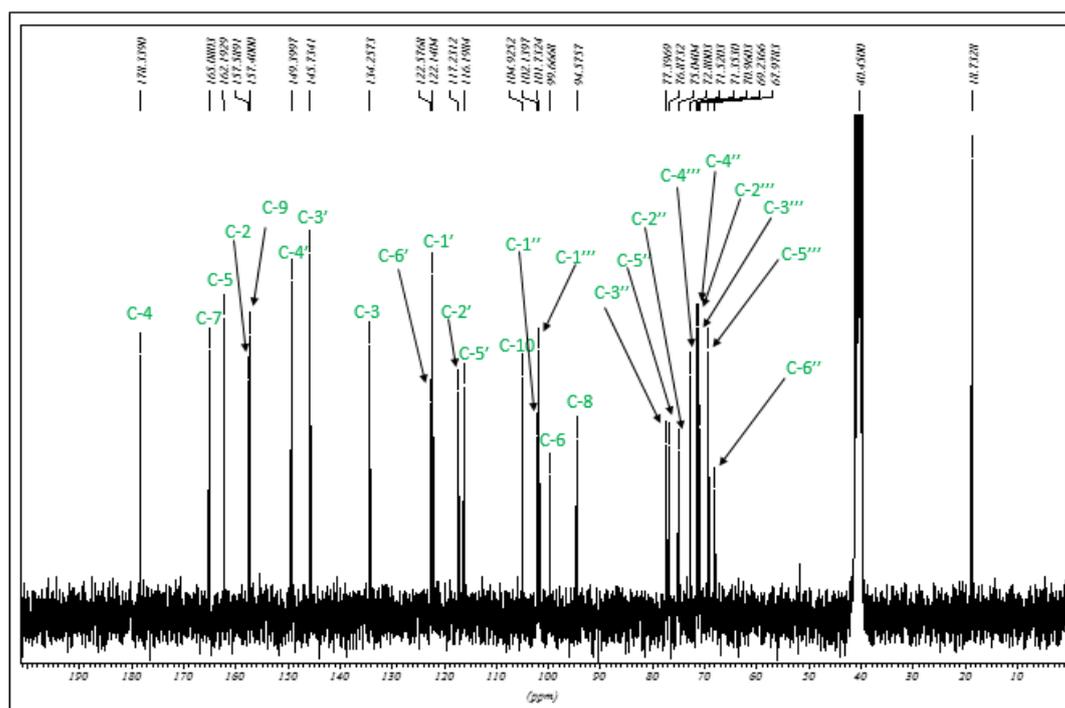


**Figure IV.51.** Spectre RMN<sup>1</sup>H étalé du composé P\* (région  $\delta=0,99$  ppm -5,34 ppm).

### 6.1.3. RMN <sup>13</sup>C

- **Identification de la partie aglycone :**

Sur le spectre RMN<sup>13</sup>C (75 MHz dans DMSO-d<sub>6</sub>), le blindage du signal du carbone C-3( $\delta$  134,2 ppm) et le déblindage pour les carbones C-2 ( $\delta$  157,5 ppm) et C-4 ( $\delta$  178,3 ppm) montrent que C-3 est la position d'attachement des sucres à l'aglycone. La présence des neuf carbones quaternaires (huit entre 130 et 170 ppm et un à  $\delta$ C 104,9 ppm) et cinq CH aromatiques montre les signaux caractéristiques de l'aglycone quercétine (**Figure IV.52.**)



**Figure IV.52.** Spectre  $^{13}\text{C}$  du composé P\* à 75 MHz enregistré dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

- **Identification de la partie osidique**

Parmi les signaux ne correspondant pas à la génine, nous observons les signaux de dix CH aliphatiques dont deux peuvent correspondre à des carbones portant les protons anomériques ( $\delta\text{C}$  102,1 et  $\delta\text{C}$  101,7 ppm), un CH<sub>2</sub> ( $\delta\text{C}$  67,9 ppm) et un méthyle ( $\delta\text{C}$  18,7 ppm). Le déplacement en champ faible de C-6'' à 67,9 ppm indiquerait que le rhamnose est lié en position 6'' du glucose.

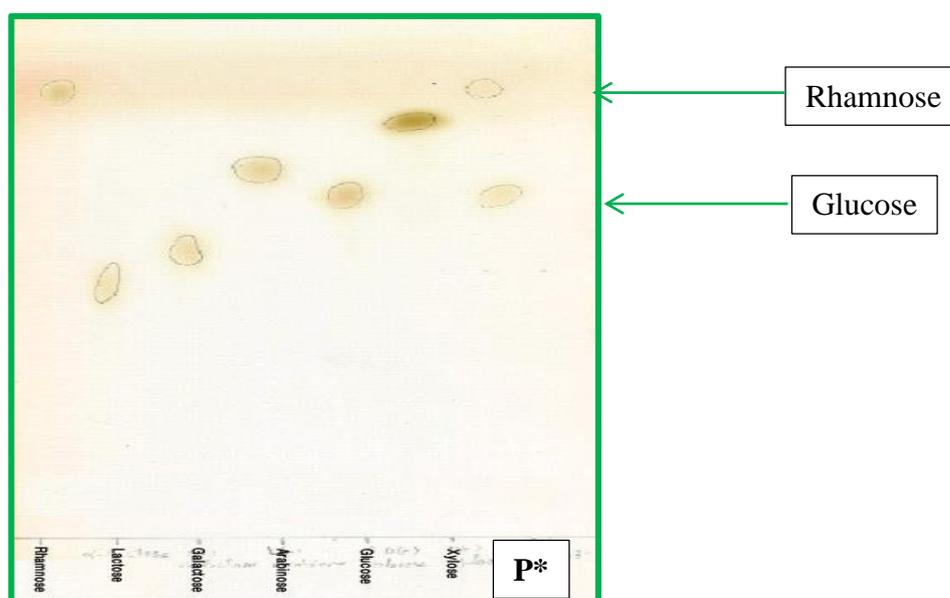
Dans la région des sucres, les déplacements chimiques en RMN $^{13}\text{C}$  sont caractéristiques de :

- une glucopyrannose (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' respectivement à  $\delta\text{C}$ , 102,1 ; 75,0 ; 77,3 ; 71,5 et 76,8 ppm) dont on note la configuration  $\beta$  grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique ( $J=7,5$  Hz)
- un rhamnopyrannose (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' et C-6''' respectivement à  $\delta\text{C}$ , 71,3 ; 70,9 ; 72,8 ; 69,2, et 18,7 ppm) en configuration  $\alpha$  (constante de couplage du proton anomérique H-1'''  $J = 0,9$  Hz).

#### 6.1.4. L'hydrolyse acide des hétérosides

L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosidés.

L'hydrolyse acide de composé P\*, libère deux sucres, dont la révélation par co-chromatographie avec des échantillons authentiques renforce l'hypothèse de glucose et rhamnose (groupement rutinosyle) (**Figure IV.53.**).



**Figure IV.53.** Co-chromatographie des sucres libérés de composé P\*.

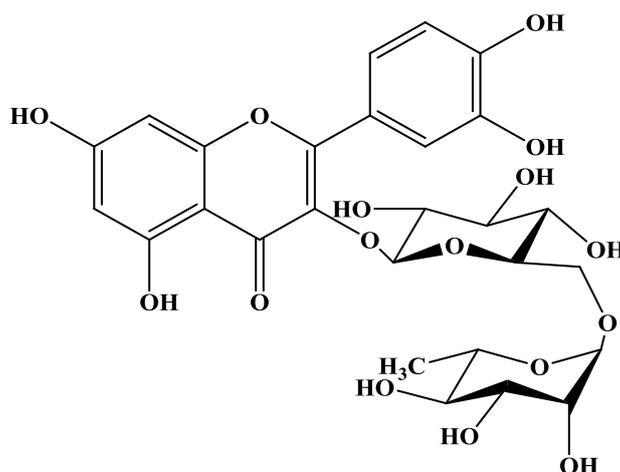
Les données spectrales qui sont résumées dans le **Tableau IV.15.** ci-dessous sont similaires à celles indiquées par la littérature (Niassy *et al.*, 2004 ; Keïta *et al.*, 2016).

Tableau IV.15. Données spectrales RMN<sup>1</sup>H (300 MHz ) et <sup>13</sup>C (75 MHz) du composé P\*.

la partie aglycone				la partie osidique			
Atome	<sup>1</sup> Hδ (ppm)	m J (Hz)	<sup>13</sup> C δ(ppm)	Atome	<sup>1</sup> H δ(ppm)	m J (Hz)	<sup>13</sup> Cδ (ppm)
2 (C)			157,5	1''(CH)	5,34	d (7,4)	102,1
3(C)			134,2	2''(CH)			75,0
4(C)			178,3	3''(CH)			77,3
5(C)	12,59	s (5-OH)	162,1	4''(CH)			71,5
6(C)	6,19	d (2,1)	99,6	5''(CH)			76,8
7(C)			165,0	6''(CH <sub>2</sub> )			67,9
8(CH)	6,38	d (1,8)	94,5	1'''(CH)	4,38	d (0,9)	101,7
9(C)			157,4	2'''(CH)			71,3
10(C)			104,9	3'''(CH)			70,9
1'(C)			122,1	4'''(CH)			72,8
2'(CH)	7,55	d (1,8)	117,2	5'''(CH)			69,2
3'(C)			145,7	6'''(CH <sub>3</sub> )	0,99	d (6,1)	18,7
4'(C)			149,3				
5'(CH)	6,83	d (8,7)	116,1				
6'(CH)	7,52	dd(7,5 ; 2,1)	122,5				

m : multiplicité; s:singulet; d:doublet ; dd : doublet de doublet

Toutes ces données permettent d'identifier la structure de P\* à celle de la rutine (**Figure IV.54.**)



**Figure IV.54.** Structure de la Rutine (2-(3,4-dihydroxyphényl)-4,5-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-méthyl-oxan-2-yl)oxyméthyl]oxan-chromén-7one).

## 6.2. Détermination du potentiel antioxydant du composé isolé P\*

Afin de détecter le flavonoïde présente dans l'extrait *n*-BuOH choisi, le potentiel antioxydant de ce dernier a été évalué par six méthodes différentes ; DPPH, ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline, FRAP et CUPRAC. L'ensemble des résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.16.** Capacité antioxydante du composé isolé P\* mesurés par différentes méthodes

Composé	IC <sub>50</sub> /DPPH (µg/mL)	IC <sub>50</sub> /ABTS (µg/mL)	IC <sub>50</sub> /DMSO (µg/mL)	A <sub>0,5</sub> /Phénantroline (µg/mL)	A <sub>0,5</sub> /FRAP (µg/mL)	A <sub>0,5</sub> /CUPRAC (µg/mL)
P*(Rutine)	7,19±0,11	10,12±0,14	3,09±0,05	33,88±0,23	56,27±1,56	7,55±0,18
BHT	22,32±1,19	1,81±0,10	-	9,62±0,87	5,39±0,91	9,62±0,87
BHA	5,73±0,41	1,29±0,30	-	3,64±0,19	34,93±2,38	3,64±0,19

L'activité antioxydante par la méthode de DMSO alcalin est plus importante pour le composé majoritaire P\* isolé avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 3,09±0,05 µg/mL suivi, respectivement, par DPPH (7,19±0,11µg/mL), CUPRAC (A<sub>0,5</sub>=7,55±0,18 µg/mL) et d'ABTS (10,12±0,14) par rapport aux BHT et BHA. Cependant, le test antioxydant réalisé par la méthode de Phénantroline et FRAP montre que ce composé présente un effet faible avec des valeurs d'A<sub>0,5</sub> égales à 33,88±0,23µg/mL et 56,27±1,56 µg/mL respectivement comparativement au BHT et BHA.

L'ensemble des résultats antioxydants de la présente étude révèlent une forte similarité de cette molécule avec le potentiel antioxydant de l'extrait *n*-BuOH.

**Références bibliographiques**

- Chen, H. J.,** Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2011). Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 260-285.
- Cherif, A.,** Ammar, S., & Boukhchina, S. (2019). Composition and characterization by GC-MS of the essential oil extracted from *Nicotiana glauca* Graham. *Grasas y Aceites*, 70(3), e317-e317.
- Crotti, A. E.,** Fonseca, T., Hong, H., Staunton, J., Galembeck, S. E., Lopes, N. P., & Gates, P. J. (2004). The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 232(3), 271-276.
- Dal Bello, F.,** Zorzi, M., Aigotti, R., Medica, D., Fanelli, V., Cantaluppi, V., & Medana, C. (2021). Targeted and untargeted quantification of quorum sensing signalling molecules in bacterial cultures and biological samples via HPLC-TQ MS techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 413(3), 853-864.
- Farias, L. D. S.,** & Mendez, A. S. (2014). LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*. *Quimica Nova*, 37, 483-486.
- Haq, F. U.,** Ali, A., Akhtar, N., Aziz, N., Khan, M. N., & Musharraf, S. G. (2020). A high-throughput method for dereplication and assessment of metabolite distribution in *Salvia* species using LC-MS/MS. *Journal of advanced research*, 24, 79-90.
- Hoai, N. T.,** Ngoc, T. T. Y., Nam, N. D., Thuy, T. T., Trang, C. T. T., Hai, N. D., & Nguyen, T. K. (2018). Effect of  $\beta$ -alanine on the preparation of 4-ethoxy-cinnamic acid. *The Open Materials Science Journal*, 12(1).58-67.
- Keïta, J. N.** (2016). Isolation and identification of three monoglycosylated flavonoids from flowers of *Vernonia galamensis* ssp. *galamensis* var. *galamensis* M. Gilbert. *Maghrebien J Pure Appl Sci*, 2(2), 39-46.
- Kumar, S.,** Singh, A., & Kumar, B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(4), 214-222.

- Majnooni, M. B.,** Fakhri, S., Shokoohinia, Y., Mojarrab, M., Kazemi-Afrakoti, S., & Farzaei, M. H. (2020). Isofraxidin: synthesis, biosynthesis, isolation, pharmacokinetic and pharmacological properties. *Molecules*, 25(9), 2040.
- Medana, C.,** Santoro, V., Bello, F. D., Sala, C., Pazzi, M., Sarro, M., & Calza, P. (2016). Mass spectrometric fragmentation and photocatalytic transformation of nicotine and cotinine. *Rapid communications in mass spectrometry*, 30(24),2617-2627.
- Massadeh, R. K.,** El-Elimat, T., Al-Gharaibeh, M., Tawaha, K., & Alali, F. Q. (2022). UPLC-HRESI-MS and GC-MS analysis of the leaves of *Nicotiana glauca*. *Acta Pharmaceutica*, 72(1), 97-108.
- Niassy, B.,** Um, B. H., Lobstein, A., Weniger, B., Koné, M., & Anton, R. (2004). Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 993-996.
- Scigelova, M.,** Hornshaw, M., Giannakopoulos, A., & Makarov, A. (2011). Fourier transform mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7).1-19.
- Yu, L.,** Chen, M., Liu, J., Huang, X., He, W., Qing, Z., & Zeng, J. (2020). Systematic detection and identification of bioactive ingredients from *Citrus aurantium* L. var. *amara* using HPLC-Q-TOF-MS combined with a screening Method. *Molecules*, 25(2), 357.
- Zbancioc, G.,** Gradinaru, R., Drochioiu, G., & Mangalagiu, I. I. (2012). Nicotine and tobacco alkaloids: A GC-MS approach. *International Journal of Criminal Investigation*, 2(1), 3-10.
- Zhang, P.,** Chan, W., Ang, I. L., Wei, R., Lam, M. M., Lei, K. M., & Poon, T. C. (2019). Revisiting fragmentation reactions of protonated  $\alpha$ -amino acids by high-resolution electrospray ionization tandem mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Zhang, J.,** Wen, Q., Zhou, M. Y., Zhong, C. C., Feng, Y., & Tan, T. (2020). Simultaneous Determination of Three Coumarins in Rat Plasma by HPLC-MS/MS for Pharmacokinetic Studies Following Oral Administration of *Chimonanthi Radix* Extract. *Journal of Chromatographic Science*, 58(10), 922-928.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

L'objectif principal de cette recherche porte sur le screening phytochimique, la quantification des polyphénols, flavonoïdes et flavonols, l'identification des composés chimiques majoritaires par LC-ESI-MS/MS des extraits bruts des feuilles de *Nicotiana.glauca* Graham et l'évaluation des potentiels antioxydants *in vitro* par l'utilisation de six méthodes. La purification, l'identification structurale et l'investigation des capacités antioxydantes du composé bioactif isolé a été élucidé.

Cette étude a permis dans un premier temps l'analyse qualitative des trois extraits dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AE) et butanolique (*n*-BuOH) issus des feuilles de *N.glauca* selon les procédures standards. Les résultats ont montré la présence des polyphénols et des coumarines et l'absence des saponines et phlobatannines dans tous les extraits. Flavonoïdes, tanins, stéroïdes et quinones ont été signalés dans les extraits d'AE et *n*-BuOH, alors que les alcaloïdes et les terpènes ont été observés dans l'extrait DCM.

Les dosages polyphénoliques, flavonoïdes et flavonols totaux ont été quantifiés, les extraits AE et *n*-BuOH révélaient des teneurs élevées en polyphénols totaux en comparaison avec leur teneur en flavonoïdes et flavonols. En effet, l'extrait d'AE a donné la quantité la plus élevée en polyphénols totaux ( $351,55 \pm 0,07$  mg GAE /g), suivi de l'extrait *n*-BuOH ( $284,98 \pm 0,08$  mg GAE /g), cependant l'extrait DCM a possédé la plus faible quantité en ces composés ( $133,80 \pm 0,06$  mg GAE /g). Par ailleurs, il a été montré que le taux des flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans les extraits *n*-BuOH et AE avec  $164,44 \pm 0,07$  mg QE/g et  $105,97 \pm 0,04$  mg QE/g, respectivement. Par contre, la quantité enregistrée pour l'extrait DCM ( $1,18 \pm 0,005$  mg QE/g) reste la plus faible par rapport à l'extrait AE et le *n*-BuOH. La teneur en flavonols totaux est presque la même dans l'extrait AE ( $22,41 \pm 0,24$  mg QE/g) et l'extrait *n*-BuOH ( $18,75 \pm 0,46$  mg QE/g) de la plante, tandis que l'absence de ces composés a été détecté dans l'extrait DCM.

L'ensemble d'analyse LC-ESI-MS/MS des trois extraits: DCM, AE et *n*-BuOH a montré l'identification de 16 composés dont la majorité a été détectée pour la première fois dans cette espèce dans le présent travail.

L'extrait DCM contient quatre classes des composés avec une tendance plus prononcée pour les alcaloïdes (3composés) suivis des monoterpènes et dérivés d'acides hydroxycinnamique (2 composés), plus une seule coumarine.

## Conclusion

L'extrait AE contient quatre classes des composés dont trois alcaloïdes, deux flavonoïdes, une coumarine et un dérivé d'acide hydroxycinnamique.

L'extrait *n*-BuOH contient cinq classes des composés avec une tendance plus prononcée pour les alcaloïdes (4 composés) suivis d'une coumarine d'un flavonoïde, d'un dérivés d'acides hydroxycinnamique et d'un homosérine lactone.

Dans un second temps, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits DCM, AE et *n*-BuOH de *N.glauca*, a été réalisée par l'utilisation de six méthodes : DPPH, ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline, FRAP et CUPRAC.

Cette évaluation a été montré que les extraits de *n*-BuOH et d'AE développaient la plus forte activité de piégeage du radical libre par rapport à l'extrait DCM (DPPH ;  $IC_{50}=7,40\pm 0,41\mu\text{g/ml}$ ,  $9,31\pm 0,92\mu\text{g/ml}$  et  $47,17 \pm 0,67\mu\text{g/ml}$ , respectivement) dans l'ordre suivant : *n*-BuOH >AE >DCM. En plus, dans les autres essais tous les extraits ont montré une bonne activité antioxydante dans l'ordre suivant : AE > *n*-BuOH >DCM comparés à des standards : BHT, BHA, Acide tanique et  $\alpha$ -tocophérol.

D'après les résultats obtenus, l'extrait ayant le rendement le plus élevé et celui qui possède la meilleure activité antioxydante a été sélectionné pour la suite du travail. Donc l'étude de l'extrait brut (*n*-BuOH) est réalisée en priorité comme source potentielle de substances antioxydantes. Cet extrait a subi un fractionnement par chromatographie sur colonne (CC) qui a abouti à l'isolement d'un flavonoïde P\*. La structure a été déterminé les différentes méthodes spectrales RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), UV-visible et par la comparaison avec les données de la littérature.

Parallèlement, le potentiel antioxydant du composé P\* "Rutine" a été évalué par les mêmes méthodes utilisées précédemment, qui a montré une activité antioxydante très importante (DPPH :  $IC_{50}=7,19\pm 0,11\mu\text{g/mL}$  ; ABTS :  $IC_{50}=10,12\pm 0,14\mu\text{g/mL}$  ; DMSO alcalin :  $IC_{50}=3,09\pm 0,05\mu\text{g/mL}$  ; phénantroline :  $A_{0,5}=33,88\pm 0,23\mu\text{g/mL}$  ; FRAP :  $A_{0,5}=56,27\pm 1,56\mu\text{g/mL}$  et CUPRAC :  $A_{0,5}=7,55\pm 0,18\mu\text{g/mL}$ ).

Ce travail ouvre des perspectives sur d'autres investigations phytochimiques qui pourraient aboutir à l'identification de nouveaux composés à potentialité antioxydante.

# Résumé

## Résumé

*Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae), ou tabac d'arbre, se trouve dans les climats secs et arides du Nord Amérique, Afrique et Europe. Il a été rapporté qu'il avait des propriétés à la fois toxique et médicales. L'objectif principal de cette étude porte sur la caractérisation phytochimique, la quantification des composés phénoliques, l'identification des composés chimiques majoritaires par LC-ESI-MS/MS et d'évaluer ses propriétés antioxydantes *in vitro* des extraits bruts à partir de feuilles de *N.glauca*. Trois solvants différents ont été utilisés pour extraire les composés bioactifs de la poudre feuilles de *N.glauca* : dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (AE) et *n*-butanol (*n*-BuOH). Le screening phytochimique a été montré la présence de polyphénols et de coumarines dans tous les extraits, des flavonoïdes, des tanins, des stéroïdes et des quinones ont été signalés dans l'AE et des extraits de *n*-BuOH. De plus, des alcaloïdes ont été observés dans l'extrait de DCM, tandis que les saponines et les phlobatannins étaient absents dans tous les extraits. Les extraits AE et *n*-BuOH révélèrent des teneurs élevées en polyphénols totaux ( $351,55 \pm 0,07$  mg GAE /g et  $284,98 \pm 0,08$  mg GAE /g respectivement) en comparaison avec leur teneur en flavonoïdes ( $105,97 \pm 0,04$  mg QE/g et  $164,44 \pm 0,07$  mg QE/g, respectivement) et flavonols ( $22,41 \pm 0,24$  mg QE/g et  $18,75 \pm 0,46$  mg QE/g, respectivement). L'identification chromatographique par la spectrométrie LC-ESI-MS/MS, menée sur les extraits DCM, AE et *n*-BuOH a permis de caractériser 16 composés, dont la majorité a été détectée pour la première fois dans cette espèce, classés en 6 groupes : 5 alcaloïdes, 2 coumarines, 2 flavonoïdes, 2 monoterpènes, 4 dérivés de l'acide hydroxycinnamique et une seule homosérine lactone. De plus, l'évaluation de la capacité antioxydante a été réalisée en utilisant six méthodes (DPPH, ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline, FRAP et CUPRAC). Les résultats utilisant la méthode de DPPH ont montré une forte activité d'élimination des radicaux libres pour les trois extraits, cette activité diminuait avec l'augmentation de la concentration dans l'ordre suivant : *n*-BuOH > AE > DCM. Dans les autres méthodes, tous les extraits ont montré une bonne activité antioxydante qui diminue avec l'augmentation de la concentration dans l'ordre suivant : AE > *n*-BuOH > DCM. Les extraits ont été comparés à des standards : BHT, BHA, Acide tanique et  $\alpha$ -tocophérol. De l'ensemble des résultats, l'extrait *n*-BuOH des feuilles de *N.glauca* a été sélectionné pour la séparation des molécules bioactives. Cette séparation en utilisant la chromatographie sur colonne (CC). Le composé isolé a été élucidé par les différentes méthodes spectrales RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), UV-visible et par la comparaison avec les données de la littérature. Parallèlement, le potentiel antioxydant du composé majoritaire isolé P\* "Rutine" a montré une activité antioxydante très importante (DPPH :  $\text{IC}_{50} = 7,19 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$  ; ABTS :  $\text{IC}_{50} = 10,12 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$  ; DMSO alcalin :  $A_{0,5} = 3,09 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$  ; phénantroline :  $A_{0,5} = 33,88 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$  ; FRAP :  $A_{0,5} = 56,27 \pm 1,56 \mu\text{g/mL}$  et CUPRAC :  $A_{0,5} = 7,55 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ ).

**Mots clés :** *Nicotiana glauca* Graham, LC-ESI-MS/MS, activité antioxydante, screening.

# **Abstract**

## **Abstract**

*Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae), or tree tobacco, is found in dry arid climates of North America, Africa and Europe. It has been reported to have both toxic and medicinal properties. The main aim of this study was to analyze the phytochemical screening and quantitative estimation of polyphenols, flavonoids and flavonols and identification of the main chemical compounds by LC-ESI-MS/MS of crude extracts from the leaves of *N. glauca* to evaluate its *in vitro* antioxidant properties. Three different solvents were used to extract bioactive compound from powdered leaves of *N. glauca* : dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AE) and *n*-butanol (*n*-BuOH). Phytochemical screening showed the presence of polyphenols and coumarins in all extracts. Moreover, flavonoids, tannins, steroids and quinones were reported in the AE and *n*-BuOH extracts. In addition, alkaloids were seen to be present in DCM extract, while saponins and phlobatannins were absent in all extracts. The extracts AE and *n*-BuOH have high total polyphenols ( $351.55 \pm 0.07$  mg GAE /g and  $284.98 \pm 0.08$  mg GAE /g respectively) compared to their total flavonoids ( $105.97 \pm 0.04$  mg QE/g and  $164.44 \pm 0.07$  mg QE/g, respectively) and total flavonols contents ( $22.41 \pm 0.24$  mg QE/g and  $18.75 \pm 0.46$  mg QE/g, respectively). The chromatographic identification by LC-ESI-MS/MS spectrometry, conducted on the DCM, AE and *n*-BuOH extracts, provided tentative identification of 16 compounds, the majority of which were detected for the first time in this species, including 5 alkaloids, 2 coumarins, 2 flavonoids, 2 monoterpenes, 4 hydroxycinnamic acid derivatives and one homoserine lactone. Furthermore, The antioxidant capacity was performed using six methods (DPPH, ABTS, DMSO alcalin, Phénantroline, FRAP and CUPRAC). Results using the DPPH method showed strong free radical scavenging activity for three extracts, this activity decreased with increasing concentration in the following order : *n*-BuOH > AE > DCM. In other assays, all extracts showed good antioxidant activity which decreased with increasing concentration in the following order : AE > *n*-BuOH > DCM. Extracts were compared with standards : BHT, BHA, Tannic acid and  $\alpha$ -Tocopherol. From all these results, *n*-BuOH extract was selected for the separation of bioactive molecules. This separation using column chromatography (CC). The compound separated was elucidated by the various methods spectral : NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), UV and comparison with literature values. In parallel, the antioxidant potential of the majority compound separated P\* Rutin, was evaluated by the same six methods used previously, showed a very significant antioxidant activity (DPPH :  $IC_{50} = 7.19 \pm 0.11$   $\mu$ g/mL ; ABTS :  $IC_{50} = 10.12 \pm 0.14$   $\mu$ g/mL ; DMSO alcalin :  $A_{0.5} = 3.09 \pm 0.05$   $\mu$ g/mL ; phénantroline :  $A_{0.5} = 33.88 \pm 0.23$   $\mu$ g/mL ; FRAP :  $A_{0.5} = 56.27 \pm 1.56$   $\mu$ g/mL and CUPRAC :  $A_{0.5} = 7.55 \pm 0.18$   $\mu$ g/mL).

**Key words:** *Nicotiana glauca* Graham, LC-ESI-MS/MS, antioxidant activity, screening

# ملخص

*Nicotiana glauca* Graham نبتة سامة ذات خصائص طبية ننتمي للعائلة Solanaceae ، توجد في المناخات الجافة و القاحلة في أمريكا الشمالية، إفريقيا وأوروبا. خصص هذا العمل للتحليل والدراسة الفيتوكيميائية وتقييم المحتوى الكلي للفينولات، الفلافونويدات والفلافونولات للمستخلصات الخام من أوراق هذه النبتة وكذا تحديد المركبات الكيميائية بواسطة LC-ESI-MS/MS بالإضافة إلى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لها.

تم اسنخدام ثلاثة مذيبات مختلفة لاستخراج المركبات النشطة بيولوجيا: ثنائي كلور الميثان (DCM)، أسيتات الإيثيل (AE) والبيوتانول (*n*-BuOH) من أجل الفحص النوعي الفيتوكيميائي باستخدام الإجراءات القياسية، حيث تم قياس المحتوى الكلي للفينولات، للفلافونويدات ولفلافونولات للمستخلصات باستخدام طريقتي Folin Cioaltea وكلوريد الألمنيوم على التوالي. أظهرت النتائج وجود الفينولات والكومارينات في جميع المستخلصات بينما وجد كل من الفلافونويدات، ستيرويدات والكينونات في مستخلصات أسيتات الإيثيل (AE) والبيوتانول (*n*-BuOH) بالإضافة إلى وجود الألكالويدات في مستخلص كلور الميثان (DCM)، بينما تعيبت الصابونينات والفلوباتانينات في جميع المستخلصات. أظهرت نتائج الفحص النوعي الفيتوكيميائي المحتوى الكلي للفينولات (133,8±0.06 mg/g ; 351,55±0,07 ; 284,98 ±0.08) و الفلافونويدات (1,18±0,005 mg/g ; 105.97±0.04 ; 164,44±0,07) في مستخلصات كلور الميثان (DCM)، أسيتات الإيثيل (AE) و البيوتانول (*n*-BuOH) على التوالي و للفلافونولات (18,75 ±0,46 mg/g ; 22,41±0,24) في كل من أسيتات الإيثيل (AE) و البيوتانول (*n*-BuOH). سمحت التحليل المخبرية بواسطة LC-ESI-MS/MS بالتعرف على 16 مركب الموجودة في مستخلصات كلور الميثان (DCM)، أسيتات الإيثيل (AE) والبيوتانول (*n*-BuOH) تم اكتشاف معظمها لأول مرة في هذا العمل مصنفة إلى 6 اقسام : 5 ألكالويدات، 2 كومارينات، 2 فلافونويدات، 2 مونوتربينات، 4 أمحاض فينولية مشتقة من حمض هيدروكسي سيناميك وهو موسرين لاكتون واحد. فيما يخص تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للنبتة المدروسة باستخدام الطرق: FRAP، Phénantroline، DMSO alcalin، ABTS، DPPH، CUPRAC. فقد أظهرت النتائج باستخدام طريقة DPPH نشاط قوي لإزالة الجذور الحرة لجميع المستخلصات حيث انخفض هذا النشاط مع زيادة التركيز حسب الترتيب التالي:  $n\text{-BuOH} > \text{AE} > \text{DCM}$ . من ناحية أخرى، أظهرت جميع المستخلصات فعالية جيدة كمضادات للأكسدة حيث تتناقص نشاطها مع زيادة التركيز حسب الترتيب التالي:  $\text{AE} > \text{DCM} > n\text{-BuOH}$ . > علما أن تقييم نشاط هذه المستخلصات قد تم بالمقارنة مع: BHT, BHA, Acide. tanique et  $\alpha$ -tocophérol حسب جميع هذه النتائج، فإن مستخلصي كل من أسيتات الإيثيل (AE) و البيوتانول (*n*-BuOH) هما الأكثر فعالية، لذلك تم إختيارهم من أجل فصل المركبات المسؤولة عن هذا النشاط البيولوجي وذلك باستخدام العمود الكروماتوغرافي (CC) و طرق التحليل الطيفي المختلفة في البرهنة على البنى الكيميائية للمركب المعزول UV و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN) وهذا بالمقارنة مع بيانات البحث البيبليوغرافي. في موازاة ذلك ، تم تقييم إمكانات مضادات الأكسدة للمركب المعزول الرئيسي P \* "Rutin" بنفس الطرق الست المستخدمة سابقًا ، وأظهرت نشاطًا مضادًا للأكسدة مهمًا جدًا (DPPH)  $\text{IC}_{50}=7,19\pm 0,11\mu\text{g/mL}$ ; ABTS :  $\text{IC}_{50}=10,12\pm 0,14\mu\text{g/mL}$  ; DMSO alcalin :  $A_{0,5}=3,09\pm 0,05\mu\text{g/mL}$  ; phénantroline:  $A_{0,5}=33,88\pm 0,23\mu\text{g/mL}$  ; FRAP :  $A_{0,5}=56,27\pm 1,56\mu\text{g/mL}$  و CUPRAP :  $A_{0,5}=7,55\pm 0,18\mu\text{g/mL}$

كلمات مفتاحية: *Nicotiana glauca* Graham ، LC-ESI-MS/MS ، نشاط مضاد للأكسدة، فحص فيتوكيميائي