

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire ou unité de recherche de rattachement Biochimie Appliquée

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**Présentée par**  
**Zaidi Sid ali**

*Thème*

**Eco-extraction, encapsulation et valorisation des phyto-complexes de**  
*Populus nigra et Pistacia lentiscus*

Soutenue le : .....

Devant le Jury composé de :

**Nom et Prénom**

**Grade**

<b>Mr Kati Djamel Edine</b>	Prof	Univ. de Bejaia	Président
<b>Mme Benaida-Debbache Nadjjet</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Rapporteur
<b>Mr Boudjouan Fares</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Co-Rapporteur
<b>Mme Boucheffa Saliha</b>	MCA	Univ. de Sétif 1	Examinatrice
<b>Mme Amir Hassiba</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Examinatrice
<b>Mme Chaher Nassima</b>	MCA	Univ. de Bejaia	Examinatrice

**Année Universitaire : 2023/2024**

## Sommaire

Remerciements	
Liste des abréviations	
List des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Composés phénoliques .....	3
I.1.1. Classification des composés phénoliques.....	4
I.1.1.1. Phénols simples .....	4
I.1.1.2. Acides phénoliques.....	4
I.1.1.3. Flavonoïdes.....	6
I.1.1.4. Tanins .....	10
I.1.1.5. Coumarines .....	12
I.1.1.6. Quinones.....	13
I.1.1.7. Stilbène .....	13
I.1.1.8. Lignanes.....	14
I.2. Extraction des composés phénoliques .....	14
I.2.1. Extraction assistée par les micro-ondes.....	15
I.2.2. Extraction assistée par les ultrasons .....	17
I.2.3. Extraction par les liquides sous pression.....	19
I.2.4. Extraction par les fluides supercritiques.....	21
I.2.5. Extraction avec un champ pulsé .....	22
I.2.6. Extraction assistée par les enzymes (EAE) .....	23
I.2.7. Extraction assistée par les bio-solvants .....	24
I.3. Encapsulation.....	25
I.4. Aperçu sur les plantes étudiées.....	26
I.4.1. <i>Pistacia lentiscus</i> .....	26
I.4.1.1. Généralité.....	26
I.4.1.2. Classification de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	26
I.4.1.3. Répartition géographique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	27
I.4.1.4. Utilisation traditionnelle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	27
I.4.1.5. Données pharmacologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	28

I.4.1.6. Composition chimique de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	29
I.4.2. <i>Populus nigra</i> .....	30
I.4.2.1. Généralité.....	30
I.4.2.2. Classification de <i>Populus nigra</i> .....	31
I.4.2.3. Répartition géographique de <i>Populus nigra</i> .....	31
I.4.2.4. Utilisation traditionnelle de <i>Populus nigra</i> .....	32
I.4.2.5. Données pharmacologiques de <i>Populus nigra</i> .....	32
I.4.2.6. Composition chimique de <i>Populus nigra</i> .....	34

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II. Matériel et méthodes .....	35
II.1. Matériel .....	35
II.1.1. Matériel végétal.....	35
II.1.2. Animaux de laboratoire .....	35
II.1.3. Matériels et réactifs .....	35
II.2. Procédure d'extraction .....	36
II.2.1. Échantillonnage, broyage et tamisage .....	36
II.2.2. Extraction .....	36
II.2.3. Optimisation et validation du modèle .....	36
II.3. Screening phytochimique .....	37
II.3.1. Détection des alcaloïdes .....	37
II.3.2. Détection des polyphénols.....	37
II.3.3. Détection des glycosides .....	38
II.3.4. Détection des stéroïdes et des terpénoïdes .....	38
II.3.5. Détection des protéines .....	38
II.4. Dosage des substances actives .....	38
II.4.1. Polyphénols totaux .....	38
II.4.2. Flavonoïdes .....	39
II.4.3. Tanins condensés.....	39
II.4.4. Tanins hydrolysables.....	40
II.4.5. Saponines .....	40
II.4.6. Protéines totales.....	41
II.5. Détermination de l'activité antioxydante .....	41
II.5.1. Activité scavenging du radical DPPH•.....	41

II.5.2. Activité scavenging du radical ABTS•+	42
II.5.3. Activité scavenging du radical hydroxyle	42
II.5.4. Pouvoir réducteur de fer	43
II.5.5. Pouvoir réducteur de molybdate	43
II.5.6. Pouvoir chélateur des ions ferreux	43
II.6. Détermination de l'activité anti-inflammatoire	44
II.6.1. Activité scavenging du radical d'oxyde nitrique (NO•)	44
II.6.2. Activité anti-cyclooxygénase	45
II.6.3. Activité anti-myéloperoxydase	45
II.7. Analyse infrarouge	45
II.8. Analyse par GC-MS	46
II.9. Analyse par LC-MS	46
II.10. Encapsulation et formulation à base de particules chargées d'extrait	46
II.10.1. Activité protectrice contre les rayons UVB	47
II.10.2. Toxicité cutanée	47
II.11. Analyse statistique	48

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

III.1. Optimisation des variables par le plan de Box-Behnken	49
III.1.1. Modélisation et ajustement du modèle	50
III.1.2. Analyse de surface de réponse	53
III.1.3. Validation et vérification du modèle prédictif	56
III.2. Criblage phytochimique	57
III.3. Détermination des teneurs en composés bioactifs	57
III.3.1. Composés phénoliques	58
III.3.2. Flavonoïdes	60
III.3.3. Tanins	61
III.3.4. Saponines	62
III.3.5. Protéines totales	63
III.4. Activité antioxydante	64
III.4.1. Activité scavenging des radicaux DPPH• et ABTS•+	64
III.4.2. Activité scavenging du radical hydroxyle	66
III.4.3. Pouvoir réducteur de fer	67
III.4.4. Pouvoir réducteur de molybdate	68

III.4.5. Pouvoir chélateur des ions ferreux.....	69
III.5. Activité anti-inflammatoire.....	71
III.5.1. Activité scavenging du radical d'oxyde nitrique .....	71
III.5.2. Activité anti-myéloperoxydase .....	72
III.5.3. Activité anti-cyclooxygenase .....	73
III.6. Analyse infrarouge.....	75
III.7. Analyse GC-MS.....	76
III.8. Identifications structurales des composés bioactifs à l'aide de l'analyse LC-ESI-MS.....	80
III.9. Formulations à base de plantes .....	85
III.10. Activité protectrice contre les UVB .....	87
III.11. Tolérance cutanée .....	88
Conclusion et perspectives.....	89
Références .....	91
Annexes	

## **Remerciements**

En premier lieu, nous tenons à remercier notre Dieu, notre Créateur, de nous avoir donné la force nécessaire pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

Je tiens avant tout à exprimer mes plus chaleureux remerciements à ceux qui ont rendu possible ce travail par leur enseignement.

En premier lieu, je voudrais exprimer ma reconnaissance à Madame Debbache Nadjet, qui a été pour moi une directrice de thèse attentive. Vous m'avez inspiré ce thème et guidé mes premiers pas dans la recherche. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre efficacité, et surtout votre rigueur scientifique qui a approfondi ma compréhension sur le plan scientifique. Ces aspects ont été et resteront des moteurs dans mon travail de chercheur. Je tiens à vous remercier pour votre précieuse aide et votre regard critique qui se sont avérés grandement utiles tout au long de ma thèse et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Mr Kati Djamel Eddine, Professeur U. A. M Béjaïa, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse. Que vous trouvez ici le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

Je tiens à remercier Mme Boucheffa Saliha, Maître de conférences U. Sétif, d'avoir accepté de faire partie du jury et de consacrer de son temps pour examiner ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Mme Chaher Nassima, Maître de conférences U.A.M. Bejaia, pour ses conseils, son enseignement et d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements à Mme Amir Hassiba, Maître de conférences U.A.M. Bejaia, d'avoir accepté de participer à mon jury comme examinateur. Recevez mon profond respect.

J'aimerais également exprimer un grand et sincère remerciement à Mme Moulaoui Kenza, Saadaoui Khalida et Medjahed Zineb. Merci pour votre présence, vos soutiens et vos conseils scientifiques avisés, ainsi que pour votre aide précieuse lors des expériences réalisées dans le laboratoire de génétique. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Un remerciement particulier à Khebat Racim, Aguemat Mourad, Mekhnache Housseem, Chetouane Walid, Taibi Lydia, Bendahmane Tinhinane, Belmouri Loubna, Tebbi Sara, Kadi Radia, Saidene Naima, Lahouaou Amel, Atia Amina, Belkhire Sara, Kaddour Taous, Dris Nabil et Oubrahem Aissa. Vous m'avez permis de débiter chaque journée de ma thèse avec motivation, le cœur léger et l'esprit tranquille. Merci infiniment pour votre soutien lors de mes moments de doute et pour vos nombreux et répétés encouragements. Un grand merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils pertinents qui ont contribué à faire progresser mon travail, ainsi que pour votre disponibilité, votre patience, votre gentillesse et votre générosité. Merci de m'avoir accompagné dans mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je ne saurais jamais assez-vous exprimer ma gratitude.

Mes vifs remerciements s'adressent également à l'équipe du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'université de Béjaïa : les enseignants Mr Atmani Djebbar, Mme Atmani Dina, Ayouni Karima, Berboucha Meriem, Kasmi Souad, Yous Farah, Benloukil Malika, Aissat Aghiles et Bouguellid Ghania et Azib Lila. Merci pour leur soutien lors des moments difficiles, leurs conseils et leur collaboration à la réalisation de ce travail.

Je remercie très sincèrement le personnel de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, le personnel du service post-graduation ainsi que le personnel administratif du département de Biologie Physico-chimique pour leur disponibilité.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents et à ma famille. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances de réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. Sans eux, je n'aurais pas pu y parvenir.

## Liste des abréviations

**AA** : Acide arachidonique  
**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)  
**BBD** : Box behnken design  
**ASE** : Accelerated solvent extraction  
**BSA** : Bovin serum albumin  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice  
**COX** : Cyclooxygénase  
**DMSO** : Dimethylsulfoxyde  
**DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle  
**EAE** : Extraction assisté par enzyme  
**FPS** : Facteur de protection solaire  
**GC-MS** : Gas chromatography-mass spectrometry  
**IC** : Inhibitor concentration  
**IL** : Interleukine  
**LC-MS** : Liquid chromatography-mass spectrometry  
**EAM** : Extraction assistée par micro-onde  
**MPO** : Myéloperoxydase  
**NMRI** : Naval Medical Research Institute  
**NO** : Oxyde nitrique  
**PE** : Phyto-œstrogène  
**PGH2** : Prostaglandine H2  
**ELP** : Extraction par liquide sous pression  
**PPT** : Polyphénols totaux  
**PVP** : Polyvinylpyrrolidone  
**RMSE** : Root mean square error  
**RSM** : Response surface methodology  
**ERO** : Espèce reactive d'oxygène  
**SC-CO<sub>2</sub>** : CO<sub>2</sub> super critique  
**SPE** : Solid phase extraction  
**STZ** : Streptozotocine  
**TCA** : acide trichloracétique  
**TMPD** : Tétraméthyl-paraphénylènediamine  
**TNF** : tumoral Factor necrose  
**UAE** : Ultrasound-assisted extraction  
**UV** : Ultra-violet

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure de quelque phénol simple .....	4
<b>Figure 2</b> : Structure de l'acide para-hydroxybenzoïque.....	5
<b>Figure 3</b> : Structure de l'acide para-coumarique.....	6
<b>Figure 4</b> : Squelette de base des flavonoïdes .....	6
<b>Figure 5</b> : Quelques composés phénoliques de la classe des flavonoïdes.....	7
<b>Figure 6</b> : Structure de base des tanins hydrolysables .....	11
<b>Figure 7</b> : Structure chimique d'une unité monomérique .....	12
<b>Figure 8</b> : Quelques structures de coumarines .....	13
<b>Figure 9</b> : Représentation de la technique d'extraction assistée par micro-ondes .....	16
<b>Figure 10</b> : Représentation de la technique d'extraction assistée par ultrasons.....	17
<b>Figure 11</b> : Représentation de la technique d'extraction par les liquides sous pression..	19
<b>Figure 12</b> : Représentation de la technique SC-CO <sub>2</sub> .....	21
<b>Figure 13</b> : Une photographie de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	26
<b>Figure 14</b> : Différentes parties du peuplier noir : (A) arbre entier, (B) feuilles et bourgeons, (C) fleurs, (D) males fleurs femelles .....	31
<b>Figure 15</b> : Courbes graphiques des valeurs observées par rapport aux valeurs attendues, (1) <i>P.lentiscus</i> et (2) <i>P.nigra</i> .....	50
<b>Figure 16</b> : Surfaces des réponses des effets interactifs sur le taux d'extraction des composés phénoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i> solvant - température (a), solvant - temps (b) et température - temps (c) .....	54
<b>Figure 17</b> : Surfaces des réponses des effets interactifs sur le taux d'extraction des composés phénoliques des bourgeons de <i>P.nigra</i> , solvant - température (a), solvant - temps (b) et température - temps (c) .....	54
<b>Figure 18</b> : Teneur en polyphénol totaux des extraits.....	58
<b>Figure 19</b> : Teneur en flavonoïde des extraits.....	60
<b>Figure 20</b> : Teneur en saponine totaux des extraits.....	63
<b>Figure 21</b> : Teneur en protéine des extraits.....	64
<b>Figure 22</b> : Activité anti radicalaire des extraits .....	65
<b>Figure 23</b> : Activité d'inhibition du radical hydroxyle .....	67
<b>Figure 24</b> : Pouvoir réducteur des extraits .....	68
<b>Figure 25</b> : Activité antioxydante totale des extraits .....	69
<b>Figure 26</b> : Activité chélatrice du fer par les extraits.....	70
<b>Figure 27</b> : Pourcentage d'inhibition du radical oxyde nitrique par les extraits.....	71
<b>Figure 28</b> : Inhibition de la myéloperoxydase par les extraits .....	73
<b>Figure 29</b> : Inhibition de la myéloperoxydase par les extraits .....	74

<b>Figure 30</b> : Spectre infrarouge de l'extrait brut de <i>P.lentiscus</i> .....	75
<b>Figure 31</b> : Spectre infrarouge de l'extrait brut de <i>P.nigra</i> .....	76
<b>Figure 32</b> : Chromatogramme GC-MS de l'extrait brut de <i>P.nigra</i> .....	77
<b>Figure 33</b> : Chromatogramme GC-MS de l'extrait brut de <i>P.lentiscus</i> .....	78
<b>Figure 34</b> : Chromatogramme des ions totaux (TIC) des composés phénoliques identifiés dans les extraits de <i>P.lentiscus</i> par la méthode LC-ESI-MS en mode négatif et positif...	82
<b>Figure 35</b> : Chromatogramme des ions totaux (TIC) des composés phénoliques identifiés dans les extraits de <i>P.nigra</i> par la méthode LC-ESI-MS en mode négatif et positif.....	85
<b>Figure 36</b> : Observation au microscope optique des particules de PVP chargées d'extrait, (1) <i>P.lentiscus</i> , (2) <i>P.nigra</i> .....	86

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Compositions des formulations préparées .....	47
<b>Tableau II</b> : Echelle du test de tolérance cutanée (l'échelle de draize) .....	48
<b>Tableau III</b> : Matrice du plan de Box-Behnken et valeurs de réponse pour le rendement d'extraction des composés phénoliques totaux .....	50
<b>Tableau IV</b> : Estimation des coefficients de régression pour le modèle quadratique et analyses de variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux <i>P.lentiscus</i> .....	52
<b>Tableau V</b> : Estimation des coefficients de régression pour le modèle quadratique et analyses de variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux <i>P.nigra</i> .....	53
<b>Tableau VI</b> : Analyse phytochimique qualitative des extraits de <i>P.lentiscus</i> et <i>P.nigra</i> .	57
<b>Tableau VII</b> : Teneur en tanins des extraits .....	62
<b>Table VIII</b> : Résultat des spectres infrarouge d'extrait de <i>P.lentiscus</i> .....	76
<b>Table IX</b> : Résultat des spectres infrarouge d'extrait de <i>P.nigra</i> .....	76
<b>Tableau X</b> : Identification des composés de l'extrait de <i>P.nigra</i> par GC-MS.....	78
<b>Tableau XI</b> : Identification des composés de l'extrait de <i>P.lentiscus</i> par GC-MS.....	79
<b>Tableau XII</b> : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de feuilles de <i>P.lentiscus</i> en mode d'ionisation positive par LC-MS .....	81
<b>Tableau XIII</b> : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de feuilles de <i>P.lentiscus</i> en mode d'ionisation négative par LC-MS .....	82
<b>Tableau XIV</b> : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de bourgeons de <i>P.nigra</i> L. en mode d'ionisation positive par LC-MS .....	84
<b>Tableau XV</b> : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de bourgeons de <i>P.nigra</i> en mode d'ionisation négative par LC-MS .....	84
<b>Tableau XVI</b> : Résultats des paramètres d'évaluation physicochimique de la formulation .....	86
<b>Tableau XVII</b> : Observation des manifestations cutanées de la formulation à base d'extrait .....	88

## **Introduction**

Le stress oxydatif est l'ensemble des agressions induites par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), générées à la fois par des sources endogènes, telles que les sous-produits de l'oxydation en aérobie ou la réponse cellulaire à l'inflammation, et par des stimuli pro-oxydants externes tels que, le rayonnement ultraviolet (Portugal et al., 2007). Le stress oxydatif peut provoquer des modifications chimiques et une alteration des composants cellulaires (lipides, protéines et ADN) et des éléments extracellulaires (collagène et fibres élastiques). En outre, il est connu que les ERO influencent l'expression d'un certain nombre de gènes et de voies de transduction du signal qui conduit à des effets indésirables exprimés par un photovieillissement, une inflammation, une manifestation auto-immune et une hypersensibilité (Briganti et Picardo, 2003). De plus, il a été également rapporté que les radiations UV sont une source de radicaux libres capables de diminuer et d'inactiver les enzymes antioxydantes induisant une augmentation du stress oxydant (Shindo et al., 1993).

Pour mettre en place une stratégie de défense efficace contre les ERO et leurs effets néfastes, il est impératif d'explorer de nouvelles substances. Idéalement, des alternatives écologiques et non toxiques, capables de réagir de manière proactive avec les ERO pour prévenir les dommages oxydatifs. Notamment, les plantes médicinales pourraient offrir une réponse thérapeutique appropriée. Les remèdes à base de plantes représentent une alternative dans les systèmes de soins primaires et ainsi, une voie prometteuse pour développer des médicaments traditionnellement améliorés (Dramane et al., 2010). Les aspects phytochimiques, pharmacologiques, ainsi que les propriétés biologiques potentiellement bénéfiques pour les êtres humains, telles que les activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses ont été largement explorés et sont souvent attribuées à la présence de diverses substances allant des alcaloïdes aux flavonoïdes en passant par les terpènes et les phénols (Sharma, 2013 ; Chanwitheesuk et al., 2005).

Ces dernières années, une tendance mondiale vers l'utilisation des composés phytochimiques, notamment les polyphénols qui sont des composés naturels qui se trouvent en grande partie dans le règne végétal. Ces composés sont impliqués dans la défense, notamment contre les rayons ultraviolets et l'agression des pathogènes (Pandey et Rizvi, 2009). De plus, ces composés ont la capacité de donner des protons aux radicaux libres tout en empêchant la formation des ERO. Ils présentent également une diversité d'activités biologiques qui peuvent être attribuées à leurs propriétés antioxydantes (Osamuyimen et al., 2011). Par ailleurs, les composés phénoliques sont reconnus pour leur activité anti-inflammatoire remarquable, car ils

peuvent inhiber les processus inflammatoires en modulant les voies inflammatoires et en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, ces composés ont démontré des effets immuno-modulateurs, ce qui signifie qu'ils peuvent réguler et renforcer le système immunitaire en modulant la réponse immunitaire de l'organisme, ce qui les rend précieux dans la prévention et le traitement de diverses maladies inflammatoires et auto-immunes d'origine oxydatif (Sun et al., 2023).

Les plantes médicinales choisies pour cette étude ont une longue histoire dans la médecine traditionnelle locale, où elles sont largement utilisées depuis des générations. *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*, en particulier, ont été étudiées dans diverses traditions médicales pour leurs multiples propriétés bénéfiques. Des études antérieures, telles que celles menées par Remila et al. (2015) et Kus et al. (2018), ont documenté ces propriétés en attribuant diverses bio-activités à ces plantes. Ces bio-activités comprennent des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens et autres, ce qui a suscité un intérêt continu pour explorer davantage leur potentiel pharmacologique.

Dans cette étude, les polyphénols sont obtenus par un procédé durable, économique et écologique en exploitant l'acide lactique comme solvant vert qui constitue une approche prometteuse pour maximiser la teneur en principes actifs, contrairement aux méthodes conventionnelles reposant sur des solvants pétrochimiques hautement inflammables et toxiques, lesquelles soulèvent des préoccupations en matière de durabilité.

Cette recherche visait à optimiser l'extraction des composés phénoliques de deux plantes médicinales, *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*, tout en évaluant les activités biologiques des extraits obtenus, notamment leur activités antioxydante, anti-inflammatoire et leur effet photoprotecteur ainsi que une analyse phytochimique.

Dans un premier temps, la diversité structurale et fonctionnelle des composés phénoliques, les méthodes d'extraction ont été rapportées ainsi qu'une monographie des plantes étudiées qui regroupe les données phytochimiques et pharmacologiques.

Le deuxième chapitre, détaille la démarche expérimentale qui incluant une étude d'optimisation d'extraction des composés phénoliques, une analyse phytochimique et l'évaluation des activités biologiques suivie d'une caractérisation phytochimique. Le troisième chapitre expose, interprète et discute les résultats obtenus. Le futur travail est marqué par des perspectives, nous allons nous focaliser sur les potentielles applications de l'extrait en cosmétique.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

---

Les plantes, à travers leurs différentes voies métaboliques, synthétisent deux types de métabolites. Les métabolites primaires, essentiels à la vie de la plante, lui assurent la couverture de ses besoins nutritifs et énergétiques, ils incluent les acides aminés, les glucides et les acides nucléiques. En parallèle, les métabolites secondaires lui permettent d'interagir avec son écosystème et lui garantissent une protection contre les différentes agressions (prédateurs, infections...etc). Ces métabolites secondaires sont subdivisés en trois grands groupes : les composés phénoliques, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui sont un axe de recherche de nombreuses études, en raison de leurs nombreuses activités biologiques. Ces activités incluent l'activité antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antioxydante et anti-inflammatoire (Hopkins, 2003 ; Pandey et Rizvi, 2009).

### I.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle. Ils sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connues, allant de simples molécules telles que les acides phénoliques aux substances hautement polymérisées telles que les tanins.

Les composés phénoliques sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou l'agression par des agents pathogènes, des parasites et des prédateurs. Ils sont omniprésents dans tous les organes de la plante et constituent une partie intégrante de l'alimentation humaine et essentielle pour le renforcement du système antioxydant (Liu et al., 2009). En effet les polyphénols sont un groupe très diversifié et multifonctionnel de composés actifs ayant un potentiel de santé substantielle dont leur capacité est médiée par les groupements fonctionnels capables de neutraliser les espèces réactive de l'oxygène (Dai et Mumper, 2010).

La catégorie des composés phénoliques englobe les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes et les lignanes, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes puissantes, susceptibles de prévenir diverses pathologies telles que les cancers (Dai et Mumper, 2010), les pathologies inflammatoires (Sergent et al., 2010), ainsi que pour leurs effets antimicrobiens (Lima et al., 2019), vasodilatateurs et immunostimulants (Leopoldini et al., 2011).

### I.1.1. Classification des composés phénoliques

#### I.1.1.1. Phénols simples

Ces composés sont caractérisés par la présence d'une seule unité phénoliques à C<sub>6</sub> liée à une ou a plusieurs fonctions hydroxyles tel que, le catéchol, le résorcinol, le phloroglucinol et le guaiacol. Cette catégorie de substances est rare dans la nature à l'exception de l'hydroquinone, présente dans plusieurs familles botaniques telles que les *Ericaceae* et les *Rosaceae*. De plus, les deux phénols hydroxylés de cette catégorie, à savoir le catéchol avec ses deux groupes OH et le pyrogallol avec ses trois groupes OH, ont exhibé un potentiel antimicrobien (Cowan, 1999).

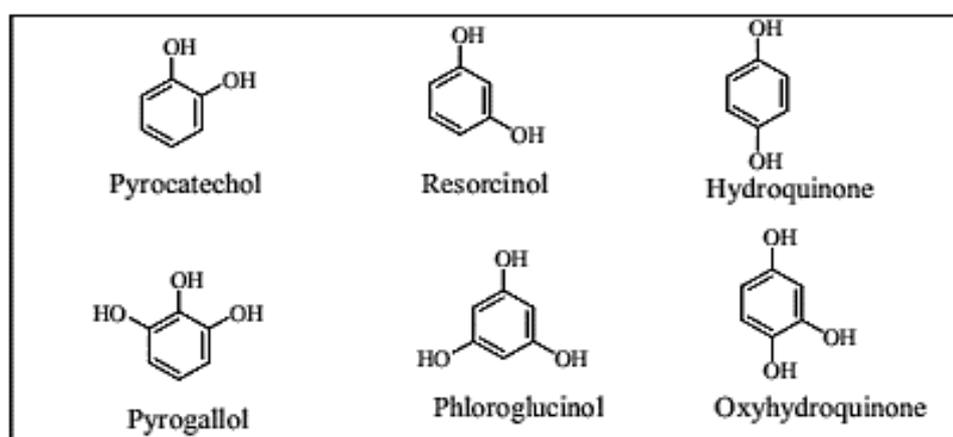


Figure 1 : Structure de quelque phénol simple (Sobiesiak, 2017).

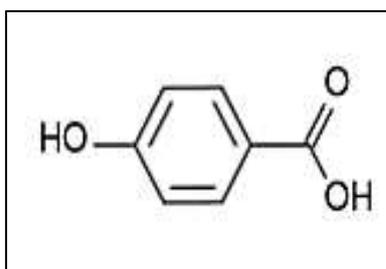
#### I.1.1.2. Acides phénoliques

Ces composés possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont rarement présents à l'état libre et ils sont généralement combinés à d'autres molécules organiques par des fonctions carboxyliques conduisant à la formation des esters (glucose et les acides quiniques, tartriques, maliques...) ou à des phénolamide (tyramine, spermidine...) (Macheix, 2005).

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et sont divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique qui sont les plus fréquents (Pandey et Rizvi, 2009). Certains acides phénoliques ont montré une capacité à prévenir le cancer, tel que l'acide gallique qui présentait des effets chimio-préventifs contre le cancer du côlon chimiquement induit chez le rat (Giftson et al., 2010 ; Giftson et al., 2011) et l'acide caféique qui est capable d'inhiber la capacité d'invasion des cellules PC3 issues du cancer humain de la prostate (Lansky et al., 2005).

➤ **Acides hydroxybenzoïques** : Sont des dérivés d'acide benzoïque, caractérisé par un squelette de C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthyloxylation du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4) donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïques, 3-hydroxybenzoïques, acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatechique, acide vanillique, acide gallique, acide syringique, acide salicylique et acide gentisique (Tomas-Barberan et al., 2000).

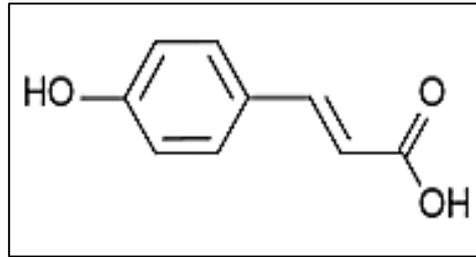
Les dérivés de l'acide benzoïque sont moins fréquents dans les végétaux et l'alimentation courante. Ils sont généralement présents dans les plantes aromatiques et les épices (23 à 27 mg/kg dans l'écorce de cannelle) et plus fréquemment dans les légumes et les fruits sous forme de conjugués (esters ou glycosides). Cependant l'acide gallique peut être retrouvé sous forme libre dans certains fruits comme le kaki. La réaction d'estérification d'un de ces acides avec une molécule de glucose donnera des structures plus complexes appelées tanins hydrolysables (Clifford et al., 2000) comme les gallotanins retrouvés dans la mangue, ou les ellagitannins dans certains fruits rouges comme les fraises.



**Figure 2** : Structure de l'acide para-hydroxybenzoïque (Bruneton, 1999).

➤ **Acides hydroxycinnamiques** : Cette sous classe est très répandue dans le règne végétal, sont des dérivés d'acide cinnamique, distingué par un squelette de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique qui regroupe l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique qui sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous formes conjuguées. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach et al., 2004 ; Macheix et al., 2006).

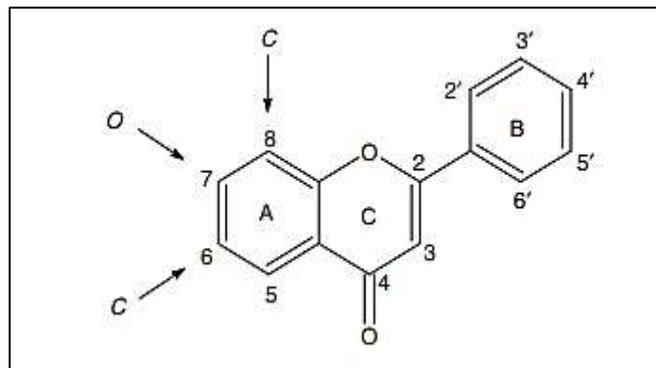
Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100 % des acides hydroxycinnamiques totaux dans la plupart des fruits (D'Archivio et al., 2007). Ainsi que l'acide férulique, sinapique et para-coumarique (Clifford, 2000b).



**Figure 3** : Structure de l'acide para-coumarique (Bruneton, 1999).

### I.1.1.3. Flavonoïdes

Sont une classe de large gamme de composés naturels, considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Plus de 6500 molécules existent sous forme d'aglycones (génines) ou sous forme de glycosides basés sur un squelette  $C_6-C_3-C_6$  constitué de deux cycles aromatiques liés par une chaîne de  $C_3$  formant un hétérocycle oxygéné (Corradini et al., 2011).



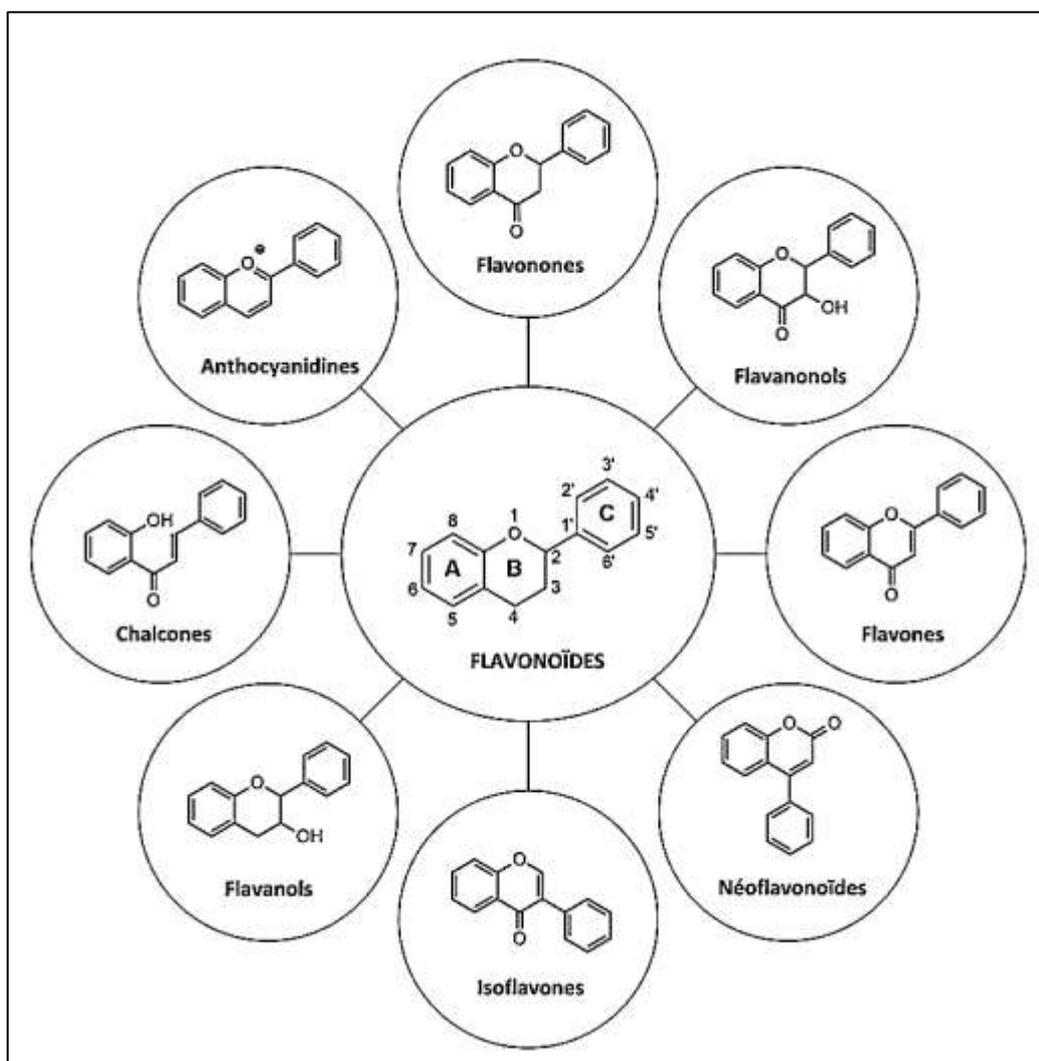
**Figure 4** : Squelette de base des flavonoïdes (Corradini et al., 2011).

Différentes catégories ont été distinguées dont les plus importantes sont les flavones, les isoflavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les chalcones, les aurones et les anthocyanidines. Ces composés sont largement répandus dans tous les tissus des plantes supérieures, où ils contribuent à la pigmentation des fruits, légumes et fleurs, ainsi qu'aux variations de couleur des feuilles en nuances de rouge, violet ou bleu en fonction du pH (Corradini et al., 2011).

Les flavonoïdes sont principalement engagés dans la protection des plantes contre les radiations UV, ils sont également impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.

Les flavonoïdes hétérosidiques sont hydrosolubles et solubles dans les alcools tandis que les flavonoïdes lipophiliques des tissus superficiels des feuilles sont solubles dans les solvants

polaires et moyennement polaires (comme par exemple le dichlorométhane) (Bruneton, 1999). Ces composés possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques, sont également de puissants anti-inflammatoires, antiallergique, hépatoprotecteur, anti-thrombotique, antiviral et possèdent des activités anticancéreuses (Corradini et al., 2011).



**Figure 5 :** Quelques composés phénoliques de la classe des flavonoïdes (Corradini et al., 2011).

### ➤ Flavonols

Ce type de flavonoïde sont largement répandus dans les plantes qui présentent des substances de teinture jaune et forment un grand nombre de différentes sortes de glycosides. Leur structure est similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. La myricétine, le kaempférol et la quercétine sont les plus abondants, ils sont présents dans les poireaux, le brocoli, le chou frisé et les oignons avec des concentrations allant jusqu'à 1,2 g/kg de poids frais (Herrero et al., 2012). De plus, les

flavonols sont abondants dans le thé et le vin rouge sous leur forme glycosylée liée à des sucres simples comme le glucose ou le rhamnose. La partie externe de certains fruits contient environ 5 à 10 glycosides de flavonol différents (Kumar et Pandey, 2013). José et ses collaborateurs (2015) ont observé que les légumes à feuilles, ainsi que la partie externe verte des feuilles, renferment une concentration plus élevée de flavonols que la partie interne de teinte plus claire. De plus, les boissons à base de pommes et de canneberges sont répertoriées parmi les sources abondantes en flavonols (Boyer et Liu, 2004).

### ➤ Flavones

Les flavones sont des substances de couleur jaunâtre caractérisée par une structure de base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> avec un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation en position C<sub>3</sub>. Ils sont présentés sous forme de glycosides d'apigénine et de lutéoline dont les sources sont peu signalées, notamment le poivron doux, le céleri et le persil. Ils existent sous forme de glycosides de flavones dans les céréales comme le blé et le mil tandis que dans la peau des agrumes, ils existent sous forme de flavones polyméthoxylées, notamment la nobiletine, la sinensétine et la tangerétine (Stuetz et al., 2010).

### ➤ Isoflavones

Cette sous-classe de flavonoïdes existe sous forme de phytoestrogènes en raison de leur affinité pour les récepteurs d'œstrogènes même s'ils ne sont pas des stéroïdes, ils contiennent un OH- en positions 7 et 4' dans une configuration comme l'estradiol. La différence fondamentale entre les isoflavones et les autres flavonoïdes réside dans la position du cycle benzénique B en C<sub>3</sub>. Les légumineuses telles que le soja transformé sont les sources essentielles d'isoflavone dans l'alimentation. Ces composés provenant du soja contiennent trois molécules importantes : la glycitéine, la daidzéine et la génistéine qui existent principalement sous forme de glycosides de malonyle ou d'acétyle (Wang et al., 2013). La teneur en isoflavonoïdes est affectée principalement par la méthode de traitement.

### ➤ Flavanones

Ce type de classe sont des substances cristallines sans couleur caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 dans le cycle C<sub>3</sub>. Ils se trouvent dans plusieurs matrices végétales et particulièrement dans les fruits et d'agrumes sous forme d'hespérine dans les oranges, d'ériodictyol dans les citrons et d'aglycones naringénine dans le pamplemousse (Portet, 2007). Ils sont majoritairement

glycosylés en position 7 par un disaccharide, expliquant le goût amer de certaines peaux d'agrumes. Entre 40 et 140 mg de glycosides de flavanone peuvent être trouvés dans un verre de jus d'orange (Kaur et Kaur, 2014).

### ➤ Anthocyanes

Ce sont les flavonoïdes les plus étudiés qui existent sous forme de pigments dans plusieurs feuilles, fruit et aliments, expliquant la couleur violette, rouge, rose ou cyan de ces aliments. Structurellement, les anthocyanines sont caractérisés par un noyau " flavylium " généralement glucosylé en position C<sub>3</sub> porteurs d'une charge positive sur l'oxygène de l'hétérocycle C. En se basant sur la nature des radicaux R1 et R2 et R3 plusieurs composés comme les hétérosides d'une unité aglycone ont été caractérisés. Les différents anthocyanes varient principalement en fonction de la position de ces liaisons, la nature et le nombre de sucres liés, les carboxylates aliphatiques ou aromatiques attachés au sucre dans les molécules ainsi que le nombre de groupes hydroxylés dans l'aglycone (Khoo et al., 2017).

Les anthocyanes peuvent exister sous différentes formes, comme les aglycones estérifiés avec différents acides organiques, glycosylés avec le glucose en position 3 et les acides phénoliques. Ils se stabilisent en se complexant avec d'autres flavonoïdes (Khoo et al., 2017). Les anthocyanes sont abondants dans les céréales, le vin rouge et certains légumes-racines comme les oignons, le chou, les haricots et autres. Cependant, ils sont généralement trouvés dans certains fruits comme les cerises, les fruits rouges et les grenades (Martín et al., 2017).

### ➤ Flavanols

Flavan-3-ols (Catéchines) sont les composés les plus réducteurs parmi les composés flavonoïdiques, ils se présentent dans les aliments sous forme non glycolyses (Katz et al., 2011). Ils existent sous forme de catéchines dont trois isomères ont été identifiés par l'existence de deux atomes de carbone asymétriques (Souquet et al., 1996) ou d'oligomère de catéchine (proanthocyanidines). Le cycle A du monomère subit plusieurs niveaux d'hydroxylation en positions 5 et 7 tandis que le cycle B subit la même modification en aux positions 3', 4' et 5'. Par ailleurs la position 3 du cycle C contient un groupement OH<sup>-</sup> ou bien estérifiée avec de l'acide gallique.

Les catéchines, sont des substances cristallines sans couleur, qui s'oxydent facilement et se polymérisent. Ces composés sont largement présents dans les plantes, ils ont été trouvés dans les fruits, comme les pommes, les poires, les coings, les fraises sauvages, le raisin de

l'ours, le chuingum, les abricots, les pêches et les boissons comme le vin rouge, les jus de fruits, le chocolat et le thé vert etc... Les principales catéchines présentes dans l'alimentation sont la catéchine, l'épicatchine, la gallocatéchine et les catéchines galloylées (par exemple l'épigallocatéchine gallate principale catéchine du thé vert). Les catéchines ont exhibé une activité vitaminique P qui augmentent l'élasticité des vaisseaux capillaires en rétablissant leur infiltration détruite.

### I.1.1.4. Tanins

Sont des composés phénoliques polymériques ayant une masse moléculaire qui varie entre 500 à 3000 et présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Ces composés sont répandus dans tout le règne végétal, ils se trouvent dans presque toutes les parties de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (Cowan, 1999).

Ce groupe de composés a reçu une attention particulière ces dernières années, car il a été suggéré que la consommation de boissons contenant des tanins, en particulier les thés verts et les vins rouges peuvent guérir ou prévenir une variété de maux. En outre, les tanins sont caractérisés par une saveur astringente, à un degré plus au moins élevé, les tanins donnent un goût amer à l'écorce et aux feuilles et les rends impropres à la consommation par les insectes ou le bétail (Eberhard et al., 2005).

Plusieurs travaux ont mis en évidence divers effets bénéfiques des tanins, notamment l'activité antioxydante (Zargham et Zargham, 2008), l'activité antimicrobienne (Doughari et al., 2008) et la capacité d'agir autant que tensio-actif naturel pour réduire le ballonnement (Tanner et al., 1995). De plus, de nombreuses activités physiologiques, telles que la stimulation des cellules phagocytaires, l'activité tumorale induite par l'hôte et une large action anti-infectieuse, insectistatique ont été attribuées aux tanins (Cowan, 1999).

En outre, l'application locale des tanins favorise la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure à travers leurs effets antiseptiques, antibactériens et antifongiques (bruneton, 2009).

Les tanins représentent également un axe de recherche contre le cancer, en particulier les ellagitanins qui sont activement étudiés pour leurs effets contre le cancer de la prostate (Heber, 2008). Les gallotanins ont montré des effets bénéfiques contre des xénogreffes de cellules HCT 116 issues de cancer colorectal humain chez la souris (Al-Halabi et al., 2011).

Par ailleurs, des dimères de procyanidines étaient capables d'inhiber la biosynthèse d'œstrogènes *in vitro* et *in vivo* (Eng et al., 2003), ce qui suggère des effets protecteurs contre le cancer du sein. Les proanthocyanidines, associées à des fibres, pourraient aussi permettre de réduire les risques de cancer du côlon (Lizarraga et al., 2011). En revanche, d'autres études n'ont pas montré des effets significatifs de mélanges riches en proanthocyanidines sur l'apparition de cryptes aberrantes chez le rat (Caderni et al., 1999).

➤ **Tanins hydrolysables** : Ce sont des oligo ou des polyesters de glucose et d'acide phénolique susceptibles d'être dégradés par l'hydrolyse chimique ou enzymatique, libérant ainsi une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide éllagique dans le cas des ellagitannins.

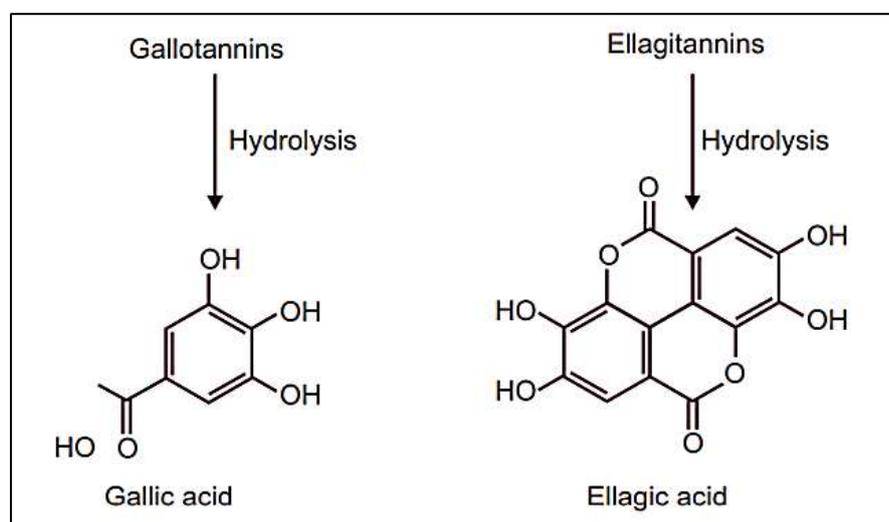
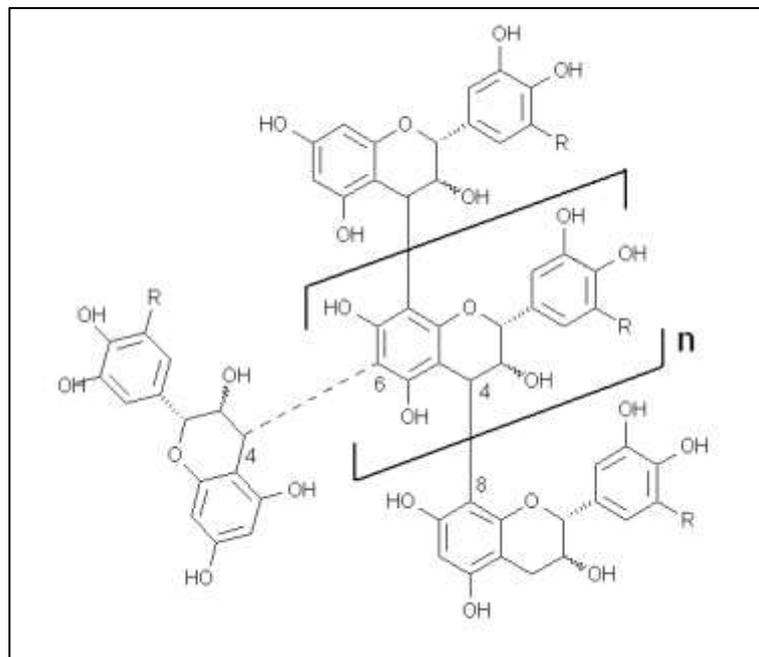


Figure 6 : Structure de base des tanins hydrolysables (Macáková et al., 2014).

➤ **Tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols** : Ce sont des polymères de flavanols qui sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type CC en 4-6 ou 4-8. Ils sont présents dans le thé, le cacao, les fruits, notamment les pommes, les raisins, les poires et les kiwis, sont les principales sources de flavanols condensés. Les flavanols condensés sont responsables du goût amer des chocolats, de l'astringence des boissons et des fruits en raison de leur capacité à produire des complexes avec les protéines salivaires (Katz et al., 2011).

Ils ont une affinité aux protéines et des propriétés tannantes, seules les attaques chimiques fortes permettant leurs dégradations telles qu'un traitement acide à chaud produit un pigment

rouge, d'où le nom proanthocyanidine est attribué pour les formes dimères et oligomères (Bruneton, 2009).

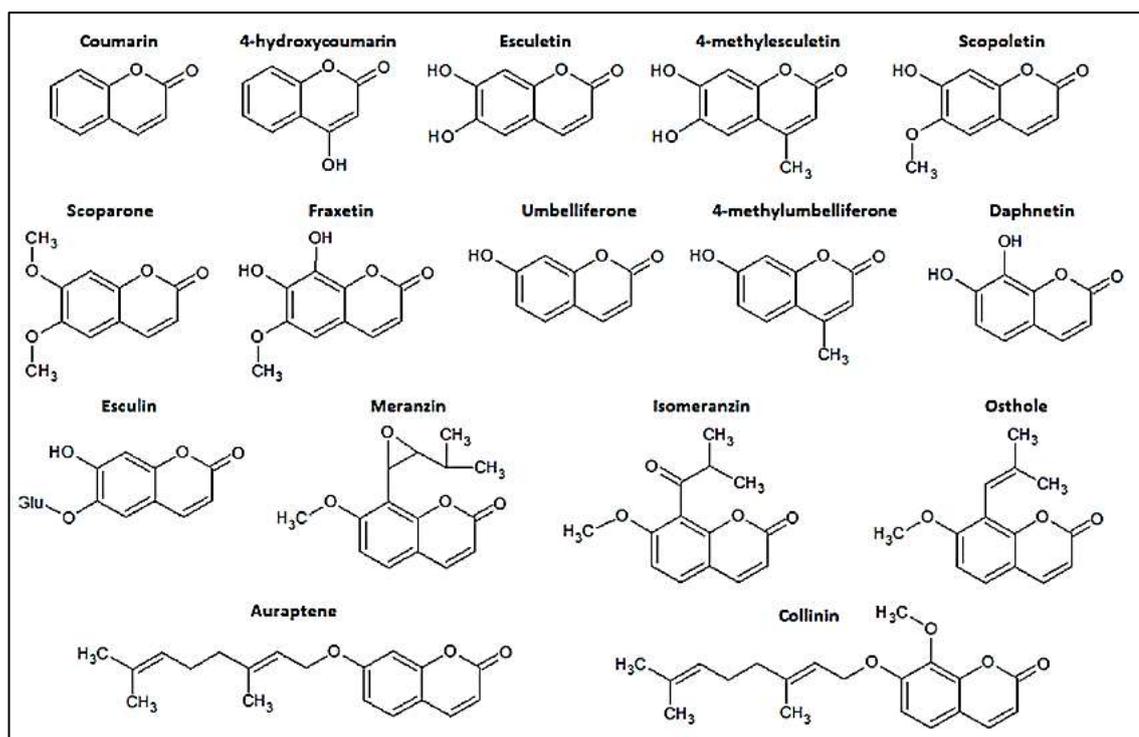


**Figure 7 :** Structure chimique d'une unité monomérique (flavan-3-ol) (Corradini et al., 2011).

### I.1.1.5. Coumarines

Sont des composés dérivés d'un squelette de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> comporte comme structure de base le benzo-2-pyrone qui sont toutes substituées en C<sub>7</sub> par un hydroxyle. Ils sont présents soit à l'état libre ou bien à l'état hétéroside dans plusieurs plantes en quantités plus faibles comme le mélilot, la sauge sclarée et la lavande.

Les coumarines sont connues pour leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, veinotonique, vasculoprotecteur anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives et sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées. Le skimmine, l'esculoside, la visnadine, la cichorine, la scopoline et le fraxoside sont les représentants de cette classe (Bruneton, 2009). A côté de ces molécules, la warfarine est recommandée pour ses activités anti-thrombotiques, anti-inflammatoires, vasodilatatrices et principalement comme anticoagulant oral. Cependant, sa toxicité élevée chez les rongeurs en fait également un agent rodenticide (Cowan, 1999).



**Figure 8 :** Quelques structures de coumarines (Di Stasi, L.C., 2021).

### I.1.1.6. Quinones

Sont des substances aromatiques colorées et brillantes, généralement de couleur rouge, jaune ou orange identifiées chez les végétaux, les champignons et les bactéries avec une structure de base caractérisée par deux fonctions cétoniques dans le noyau benzène tel que l'ubiquinone, anthraquinone, l'hypericine et la naphtoquinone (antihémorragique). Cette catégorie est hautement réactive, capable de fournir une source de radicaux libres stables, responsable du phénomène de brunissement des fruits et des légumes. En outre, les quinones peuvent interagir par la complexation d'une manière irréversible avec les acides aminés nucléophiles présents dans les protéines, les adhésines exposées à la surface, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes liées à la membrane conduisant souvent à l'inactivation et l'altération de telle fonction (Cowan, 1999).

### I.1.1.7. Stilbènes

Sont une famille de molécules dérivées de la voie des phénylpropanoïdes, possédant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, dont la structure est C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. Ils sont parfois des phytoalexines produites par les plantes en réponse à une attaque par les micro-organismes pathogènes (fongiques, bactériens et viraux). Ils sont présents dans la plante sous forme de monomères, dimères, trimères ou polymères à l'état libre ou

hétérosidique et sont principalement très abondants dans les raisins, les vins, le soja et les arachides, parmi les composés, on cite le pinosylvine, l'hydrangénol, l'acide lunularique, le combretastatine, le phénanthrène ainsi que le résvératrol qui a fait l'objet de nombreuses études notamment ses effets sur le cancer et les maladies cardiovasculaires (Bruneton, 2009 ; Ferrer, 2005).

### I.1.1.8. Lignanes

Ils sont des composés phénoliques très abondants chez les plantes vasculaires, synthétisés à partir du métabolisme de phénylalanine et de précurseurs monolignols qui rentre dans la composition de la paroi des cellules végétales. Les lignanes présentent un squelette  $(C_6-C_2)_2$  introduit par dimérisation de deux unités de phenylpropane liées par le carbone central ( $C_8$ ) de chaque chaîne propyle.

Les lignanes sont rarement présents en concentration élevée, ils sont retrouvés dans les tiges, les rhizomes, l'écorces, les racines et les graines possèdent des propriétés cytotoxiques, antiprolifératives, pro-apoptiques, antimitotiques. Le dérivé de podophyllotoxine hémisynthétique, impliqué dans le protocole de chimiothérapie anticancéreuse et aussi des sécoisolaricirésinol, matairesinol présent dans les grains de lin oléagineux qui sont considérés comme des phyto-œstrogènes utilisées également dans le traitement de pathologies cardiovasculaires et certains cancers hormono-dépendants (sein, prostate).

En effet, le sécoisolaricirésinol et le matairesinol sont métabolisés par les bactéries de la flore intestinale des mammifères en entérolignanes, respectivement l'entérodol et l'entérolactone qui présentent une ressemblance structurelle proche à celle de l'œstradiol (en particulier au niveau des noyaux aromatiques), qui agissent comme modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires des œstrogènes. Selon la nature du PE, et en fonction du rapport des concentrations PE/œstrogènes, les entérolignanes peuvent agir comme agonistes, en simulant la fixation d'œstrogènes, mais avec des effets différents en fonction de l'interaction ultérieure avec des activateurs ou des inhibiteurs de transcription de certains gènes ou bien comme antagonistes, en empêchant la fixation de l'œstrogène et en inhibant ainsi son action médiée par la fixation au récepteur (Lamblin, 2008).

## I.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est un procédé qui dépend principalement de leur solubilité, régie essentiellement par la nature chimique de l'échantillon de plante ainsi que la

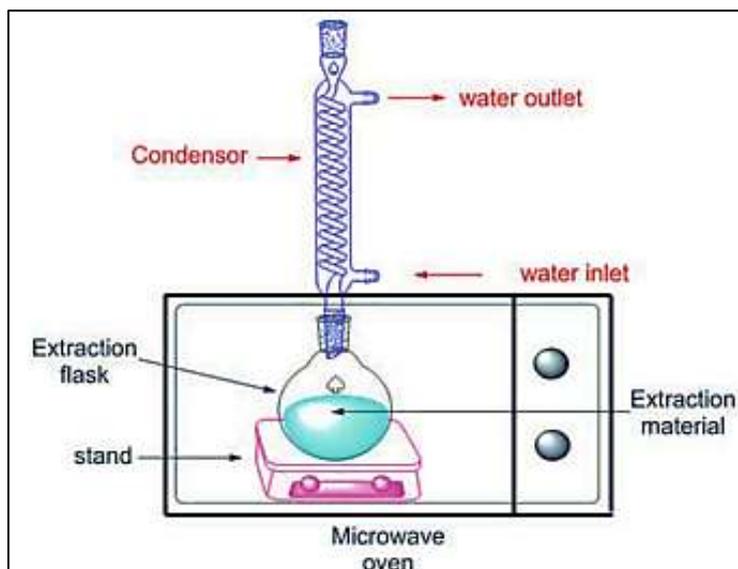
polarité des solvants utilisés. En général des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et leurs combinaisons souvent avec différentes proportions d'eau ont été utilisés pour l'extraction de composés phénoliques à partir de matières végétales (Xu et al., 2007). En particulier le méthanol est généralement avéré plus efficace dans l'extraction des polyphénols de faible poids moléculaire tandis que les flavanols de poids moléculaire élevé sont mieux extraits avec l'acétone (Dai et Mumper, 2010). Les études antérieures ont également démontré l'efficacité de l'éthanol dans l'extraction des composés phénoliques (Shi et al., 2005).

Autre le solvant utilisé, la technique d'extraction peut affecter significativement le rendement d'extraction. Les méthodes d'extraction conventionnelles des composés phénoliques telles que la macération et l'extraction par soxhlet ont montré une faible efficacité et une pollution environnementale potentielle en raison de grands volumes de solvant organique et une durée d'extraction plus élevée requis dans ces méthodes (Dai et al., 2010). Cependant des technologies plus récentes ont été exploitées telle que l'extraction par : liquide sous pression, fluide sous-critique et supercritique, ultrasons et micro-ondes (Lavilla et Bendicho, 2017).

### **I.2.1. Extraction assistée par les micro-ondes**

Le traitement par des micro-ondes pour l'extraction de composés biologiques a été introduit pour la première fois en 1986. Depuis ce temps, ce procédé a été utilisé avec succès pour l'extraction des huiles essentielles, d'arômes, de pigments, antioxydants, colorants, phénols et autres matières premières ou métabolites secondaires.

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) implique l'utilisation de l'énergie du rayonnement micro-ondes pour réchauffer le mélange soluté-solvant (Alara et Abdurahman, 2019). D'une autre manière, la chaleur générée avec une haute pression facilite la diffusion du solvant à travers l'échantillon induisant ainsi une augmentation de la rupture des liaisons hydrogène retenant l'échantillon, permettant ainsi aux composés cibles de se dissoudre dans le fluide d'extraction (Shams et al., 2015).



**Figure 9 :** Représentation de la technique d'extraction assistée par micro-ondes (Alara et al., 2021).

Les avantages de l'extraction assistée par micro-ondes incluent la réduction du temps nécessaire pour extraire les composés, l'utilisation de petites quantités de solvant et un taux d'extraction élevé avec un meilleur produit à moindre coût (Song et al., 2011). L'extraction assistée par micro-ondes représente une méthode efficace pour extraire les polyphénols à chaîne courte, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Cependant, son utilisation est limitée dans l'extraction des polyphénols polymères comme les anthocyanes et les tanins en raison de la sensibilité à la chaleur et au rayonnement des micro-ondes qui engendre une destruction des substituants de type hydroxyle des polyphénols.

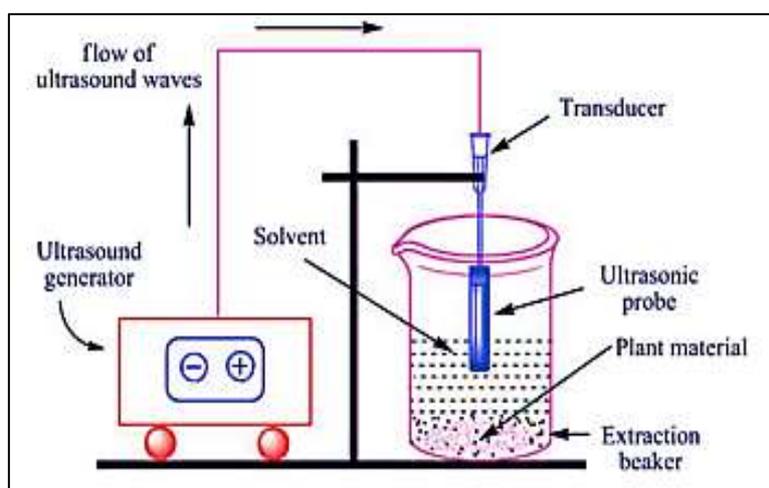
Le système MAE a été utilisé dans l'extraction de plusieurs produits phytochimiques, y compris les polyphénols. Néanmoins, les problèmes à prendre en compte lors de l'utilisation de cette technique pour l'extraction des polyphénols incluent le type de matériau, le type et la pureté du solvant, la puissance et la durée d'application des micro-ondes, la surface disponible de l'échantillon, ainsi que la température de fonctionnement. Le facteur le plus critique est le type de solvant, car ses effets s'étendent à l'ensemble du processus, allant de la solubilité des composants cibles à l'efficacité du processus. Par conséquent, le solvant doit être sélectionné avec soin en tenant compte à la fois de son affinité pour les composés cibles et de sa capacité d'absorption de l'énergie des micro-ondes (Zhang et al., 2011). Les solvants transparents tels que l'hexane ou le dichlorométhane peuvent ne pas être applicables en MAE en raison de leur incapacité à chauffer sous le rayonnement des micro-ondes. D'autres solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou l'eau, ayant une bonne capacité d'absorption des micro-ondes, peuvent

facilement chauffer, réduisant ainsi la durée d'application de la puissance des micro-ondes et peuvent donc être utilisés dans ces processus (Dudley et al., 2015). En outre, ces solvants n'ont aucune influence sérieuse sur les composés thermolabiles.

### I.2.2. Extraction assistée par les ultrasons

Ces dernières années, l'extraction assistée par ultrasons (EAU) a suscité un grand intérêt dans l'extraction de substances bioactives à partir de plantes, de fruits, d'algues et de champignons, tant à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle. En effet les ultrasons sont définis comme une source d'énergie associée au son à des fréquences supérieures à celles détectées par l'oreille humaine. Cette énergie est appliquée dans divers domaines tel que la médecine ou l'industrie pour de nombreuses applications, comme l'homogénéisation, l'émulsification, l'extraction, la cristallisation, le dégazage, le démoussage et le nettoyage. Ces avantages font de cette méthode une technologie écologique, simple, rapide, polyvalente et efficace dite verte ou durable.

Ce type de méthode est une technique d'extraction simple dont le principe repose sur le phénomène de cavitation impliquant l'explosion des microbulles générées sous irradiations ultrasonores (20 et 2 000 kHz) provoquent ainsi la rupture et une désorganisation rapide des tissus qui facilite la diffusion des composés phytochimiques dans le solvant, améliorant ainsi l'extraction de composants bioactifs (Vinatoru, 2001). Cette méthode d'extraction est simple et peu coûteuse qui peut être utilisée aussi bien dans des contextes à petite qu'à grande échelle (Shirzad et al., 2017).



**Figure 10** : Représentation de la technique d'extraction assistée par ultrasons (Alara et al., 2021).

Lors de l'extraction assistée aux ultrasons des effets physiques sont exercés sur les matières végétales définies comme une fragmentation (réduction de la taille des particules), érosion (des structures végétales), effet sonocapillaire (augmentation de la pénétration du solvant dans les canaux et les pores de la cellule végétale), sonoporation (pores de la membrane cellulaire libérant du contenu cellulaire pour l'agent d'extraction), la contrainte de cisaillement locale (effets d'écoulement et de micro-écoulement), et détexturation (destruction des structures végétales).

Outre les effets physiques, il existe également des effets chimiques qui se manifestent. En raison de la vapeur de solvant, des pressions et des températures élevées à l'intérieur, la bulle génère des radicaux primaires qui peuvent se recombinaison pour former d'autres radicaux et des espèces réactives qui favorisent des réactions d'oxydoréduction (c'est-à-dire la sonochimie). Lorsque des composés bioactifs sont extraits, les espèces radicalaires doivent être contrôlées car des réactions indésirables telles que les réactions d'oxydation peuvent avoir lieu. En général, les concentrations de radicaux générés augmentent lorsque la température à l'intérieur de la bulle augmente. Ce qui est important de contrôler les paramètres affectant la génération de radicaux, tels que la puissance, la température extérieure...etc.

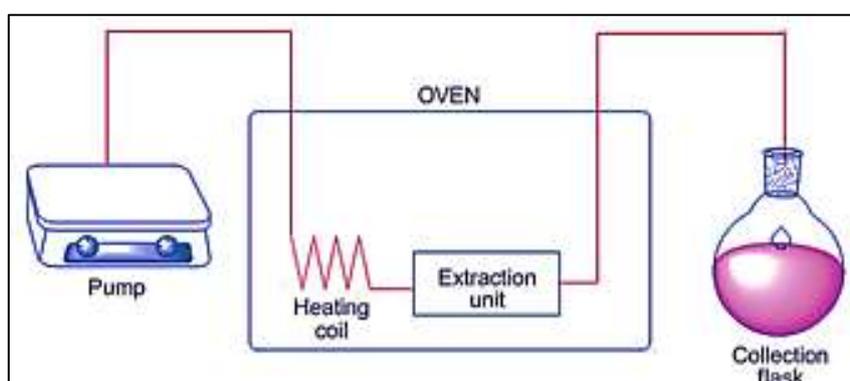
En outre, la température et le temps ultrasonique sont des paramètres prépondérants car un temps court peut signifier une extraction incomplète et des temps longs peuvent générer des réactions indésirables et des extractions moins sélectives. Bien qu'une augmentation de la température soit positive en termes de solubilité mais un contrôle exhaustif de la température est nécessaire pour éviter les problèmes de thermolabilité, des réactions indésirables et de contrôle de la cavitation. Généralement, des températures inférieures à 60°C sont utilisées cependant dans certains cas des températures plus élevées ont été appliquées À savoir 85°C. Pour maintenir une température constante, des bains thermostatés ou des bains d'eau et/ou de glace avec sondes sont utilisés, pour cela les processus d'optimisation doivent être pris en compte pour chaque extraction (Lavilla et Bendicho, 2017).

Les principaux avantages de cette technique par rapport aux techniques d'extraction peuvent être résumés dans l'amélioration du rendement d'extraction, plus pratique pour les composés thermolabiles car ils nécessitent moins d'énergie et d'extractant. Selon divers rapports, l'extraction assistée par ultrasons garantit une extraction plus rapide et meilleure des polyphénols avec une dégradation minimale des composés par rapport à d'autres techniques d'extraction (Vinatoru, 2001).

Zu et al. (2012) ont rapporté que l'extraction assistée par les ultrasons s'est révélée plus efficace pour extraire l'acide rosmarinique et carnosique que celle des techniques d'extraction conventionnelles. De plus, Ghitescu et al. (2015) ont obtenu avec la même méthode d'extraction un rendement maximal du taux d'extraction des polyphénols (13,20 mg/g du poids sec) à partir de l'écorce d'épicéa. Il a été trouvé que l'utilisation des ultrasons lors de l'extraction des anthocyanes de la patate douce violette a augmenté le taux d'extraction (Cai et al., 2016). L'utilisation de l'extraction assistée par les ultrasons augmente la solubilité des composés dans le solvant et réduit le volume du solvant. Il a été aussi suggéré qu'un temps de sonication court et une température basse amélioreraient l'extraction des polyphénols et préservent les composés thermolabiles. Parallèlement, certains rapports ont souligné que de longues périodes de sonication supérieures à 40 minutes à un niveau d'énergie supérieur à 20 kHz pourraient affecter les composés phytochimiques extraits en raison de la diminution du taux de surface/taux de diffusion et de l'augmentation de la distance de diffusion (Wang et al., 2008 ; Annegowda et al., 2010).

### I.2.3. Extraction par les liquides sous pression

La méthode d'extraction par liquide sous pression (ELP) désignée sous le nom d'extraction accélérée par solvant est l'une des techniques actuellement développée pour extraire les composés phytochimiques. Cette méthode exige l'application de températures et de pressions élevées, notamment des pressions échelonnées de 3,3 à 20,3 MPa, conjuguées à des températures élevées allant de 40 à 200°C. Ces conditions permettent de faciliter la désorption et la solubilité des molécules dans les solvants (Zhang et al., 2018).



**Figure 11 :** Représentation de la technique d'extraction par les liquides sous pression (Alara et al., 2021).

De plus, cette méthode d'extraction implique un processus d'extraction rapide utilisant quelques volumes de solvants par rapport aux méthodes d'extraction conventionnelles (Niето

et al., 2010). En outre, cela encourage une meilleure utilisation de l'eau comme solvant d'extraction (Teo et al., 2010). Lorsque la température atteint environ 200°C, l'eau subira une modification de ses propriétés diélectriques, la transformant en un solvant organique standard, améliorant ainsi la capacité d'extraction (Plaza et Turner, 2015). Ainsi, obtenir des extraits purs par rapport à ceux obtenus par des méthodes traditionnelles. Cette amélioration supprime la nécessité d'effectuer des étapes de purification supplémentaires, notamment l'analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (Sosa-Ferrera et al., 2013). Cependant, les principales limites de cette technique sont la faible sélectivité des analytes lors de l'extraction, la présence d'interférents pendant le processus d'extraction, le niveau élevé de dilution des extraits en particulier lors de l'utilisation de plusieurs cycles et la nécessité d'une instrumentation avancée qui est un processus coûteux. Malgré ces limitations, l'extraction par liquide sous pression est une méthode d'extraction courante qui a été utilisée pour extraire les polyphénols à partir de diverses sources (Erdogan et al., 2011 ; Liazid et al., 2014).

Afin d'améliorer l'efficacité du processus, certains paramètres doivent être optimisés et le plus important de ces paramètres est la sélection du solvant. Même si les propriétés de n'importe quel solvant peuvent être modifiées sous la température élevée utilisée dans cette méthode, le succès du procédé dépend toujours du solvant utilisé. Plusieurs solvants et leurs mélanges ont été utilisés pour extraire les composants phénoliques à travers plusieurs sources, mais les solvants les plus fréquemment utilisés sont le méthanol, l'éthanol et leur combinaison avec de l'eau dans divers rapports. Il a été prouvé qu'une sélection adéquate de solvant peut affecter le niveau d'extraction de plusieurs composés phénoliques à partir du même échantillon en raison de la grande différence dans la composition chimique de ces composants.

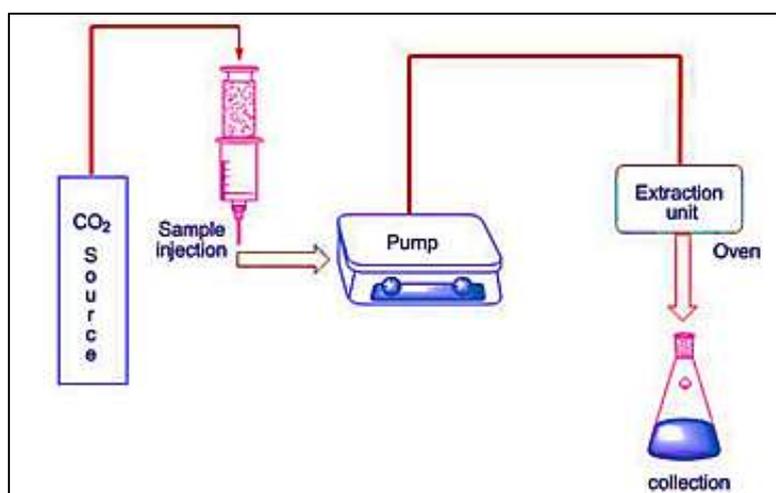
De même, les autres paramètres, notamment le temps, la température, le conditionnement de l'échantillon à l'intérieur de la cellule d'extraction et le débit du solvant, doivent être optimisés car ils pourraient influencer le processus. Bien que l'on pense que la pression en tant que paramètre facilite la rupture de la matrice de l'échantillon et permet une meilleure expérience d'extraction. Néanmoins, des études ont prouvé que la pression n'a pas d'influence significative sur le résultat de l'extraction si sa valeur est largement suffisante pour maintenir le solvant en phase liquide tout au long du processus d'extraction.

L'extraction liquide sous pression est généralement combinée à une extraction en phase solide en mode hors ligne ou en ligne pour obtenir une meilleure isolation des composés

phénoliques cibles. Concernant le couplage en ligne, il implique le positionnement de la phase solide au sein des cellules d'extraction avec l'échantillon extrait ciblé mais délimité par un agent dispersant. Cette étape garantit une meilleure pureté de l'échantillon avant l'analyse chimique. Plusieurs études ont utilisé la technique PLE-SPE hors ligne et en ligne pour extraire des composés phénoliques (Plaza et Turner, 2015). D'autres plateformes commerciales en ligne auraient été utilisées pour la quantification (Pritor et Liwei, 2005). Dans cette situation, l'emploi d'un appareil automatisé est requis pour assurer le transfert des extraits du flacon de collecte ELP vers le dispositif SPE.

### I.2.4. Extraction par les fluides supercritiques

Les fluides supercritiques sont considérés comme alternative aux solvants organiques. En effet lorsqu'un fluide supercritique est chauffé au-dessus de la température critique et pressurisé au-dessus de sa pression critique présente une densité proche des liquides, ce qui lui confère un pouvoir solvatant proche des liquides et une viscosité proche des gaz qui conduit à une augmentation du transfert de masse entre les solutés à extraire et le fluide. Ces propriétés physiques qui peuvent être modulées par une augmentation de pression et/ou température, au-delà de leurs valeurs critiques permettent d'ajuster la sélectivité de fluide supercritique lorsque l'extraction d'un composé ciblé est souhaitée.



**Figure 12 :** Représentation de la technique SC-CO<sub>2</sub> (Alara et al., 2021).

Cette méthode nécessite principalement l'utilisation du CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique en raison de sa non-toxicité, de son ininflammabilité, de sa rentabilité et de sa haute disponibilité avec un degré de pureté élevé (Alara et al., 2021). De plus, différentes combinaisons pression-température peuvent être appliquées, faisant de cette technique la méthode de choix pour créer plusieurs produits finaux ainsi, le SC-CO<sub>2</sub> est considéré comme

une méthode courante dans les installations à l'échelle du laboratoire. Par ailleurs, la combinaison de basses températures et de pressions assure la préservation des composés phytochimiques thermolabiles. D'autres avantages du SC-CO<sub>2</sub> incluent une plus grande capacité d'extraction en raison du transfert de masse plus élevé entre les phases occasionnées par une diminution de la viscosité et un coefficient de diffusion accru du CO<sub>2</sub> par rapport aux solvants. Une pénétration plus élevée du solvant dans les échantillons, possibilité de différentes combinaisons pression-température pour une meilleure adaptabilité des conditions d'extraction et la recyclabilité du CO<sub>2</sub> à la fin du processus d'extraction pour garantir l'absence d'effet nocif sur l'environnement (De Zordi et al., 2014 ; Alara et al., 2021).

Cependant, Il existe des limites de cette technique, notamment celles liées à la faible polarité du CO<sub>2</sub> qui est plus adapté à l'extraction des composés apolaires. En revanche, son application peut être étendue aux autres groupes de composés en introduisant un faible pourcentage de solvants organiques polaires dans le processus d'extraction pour permettre l'extraction des composés polaires tels que les polyphénols. Parmi les solvants organiques pouvant être utilisés comme co-solvants avec le CO<sub>2</sub> figurent l'éthanol et le lactate d'éthyle (Kooi-Yeong et al., 2017).

Par exemple, l'extraction maximale des composés phénoliques des graines de goyave a été obtenue en utilisant du CO<sub>2</sub> supercritique avec de l'éthanol à une température de 60°C et une pression de 100 bar (Tyśkiewicz et al., 2018). Le pourcentage typique d'éthanol lorsqu'il est utilisé comme co-solvant avec le CO<sub>2</sub> varie généralement de 5 à 15 %. Il est donc important d'optimiser soigneusement ce paramètre pour obtenir le meilleur taux d'extraction. Des preuves statistiques ont montré que le pourcentage et le type de co-solvant constituent le deuxième paramètre le plus vital lors de l'extraction des polyphénols de l'huile de graines de grenade (Zam et al., 2012). L'étude a également utilisée de l'eau, de l'éthanol et de l'hexane comme modificateurs, mais la comparaison a prouvé que la polarité du co-solvant doit être raisonnablement augmentée pour garantir une extraction adéquate des polyphénols. Par conséquent, la sélection d'un co-solvant approprié dépend principalement de la concentration et du type de composants phénoliques contenus dans l'échantillon.

### **I.2.5. Extraction avec un champ pulsé**

Le traitement par champ électrique pulsé, est également appelé électroperméabilisation ou électroporation, dont le principe réside sur l'application d'un champ électrique externe sur une cellule vivante pour une durée très courte (de quelques nanosecondes à plusieurs

millisecondes). Le mécanisme de perméabilisation membranaire n'est pas encore bien élucidé, mais il est suggéré que l'électroporation se manifeste par l'augmentation du potentiel transmembranaire de la membrane cytoplasmique dû à la charge de la membrane cellulaire par un champ électrique externe de (0,2 - 1,0 V), ce qui conduit à la création de petits pores hydrophiles avec évolution du nombre et la taille de ces derniers pendant le traitement au champ électrique pulsé qui engendre ainsi la fuite de composés intracellulaires.

En effet, l'efficacité de l'électroperméabilisation des membranes cellulaires dépend de plusieurs paramètres tel que l'intensité du champ électrique, temps de traitement, énergie spécifique, forme d'impulsion, largeur d'impulsion, la fréquence, la température, le mode de traitement (batch, continu), la configuration de la chambre de traitement (colinéaire, coaxiale et parallèle), les caractéristiques physico-chimiques de la matrice traitée (pH et conductivité), les caractéristiques des cellules traitées (taille, forme, membrane et structure de l'enveloppe) et l'état (suspension, solide, semi-solide) (Chemat et al., 2017).

### **I.2.6. Extraction assistée par les enzymes (EAE)**

Il s'agit d'une technique actuelle qui exploite la capacité des enzymes à décomposer le compartiment de la paroi cellulaire pour assurer le mouvement du contenu cytoplasmique dans le fluide d'extraction tel que l'eau (Puri et al., 2012). Les enzymes utilisées au cours du processus d'extraction sont capables de briser et d'affaiblir les parois cellulaires pour exposer leur contenu cellulaire à l'extraction (Gómez-García et al., 2012 ; Swer et al., 2016). Cela permet d'extraire les polyphénols de ces échantillons. En fait, la plupart des composés phytochimiques végétaux sont liés à la lignine qui est un composant résistant de la paroi cellulaire végétale, via des liaisons hydrogène ou hydrophobes, ce qui les rend classiquement inaccessibles (Gómez-García et al., 2012). Par conséquent, le processus de prétraitement enzymatique permet de faciliter la libération efficace de ces composés phytochimiques liés.

Une partie de ces enzymes est utilisée pour faciliter l'extraction de composants phytochimiques à partir de matières végétales, notamment les cellulases, les hémicellulases, les pectinases et autres. Ils peuvent être utilisés pour hydrolyser la lignine de la paroi cellulaire afin de favoriser l'efficacité de l'extraction. L'influence positive de cette technique sur l'extraction des polyphénols a été rapportée à plusieurs reprises. Un rapport sur l'extraction des polyphénols des déchets de raisin a montré une forte performance en termes de rendement en polyphénols lorsque les enzymes celluclast®, pectinex® et novoferm® étaient utilisées comme enzymes de prétraitement (Gómez-García et al., 2012). D'autres

études ont signalé une tendance similaire en suggérant que l'extraction assistée par enzyme devrait être considérée comme une technique alternative pour une meilleure extraction des composés phénoliques liés aux glucides à partir des déchets de vinification (De Camargo et al., 2016). Ces études ont confirmé également l'activité des enzymes dans la dégradation des composants de la paroi cellulaire afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs. De plus, cette méthode a été identifiée comme une méthode respectueuse de l'environnement en raison de son utilisation de l'eau comme solvant plutôt que des solvants organiques. En outre, c'est l'une des techniques d'extraction récentes qui suscitent beaucoup d'intérêt en raison de la récente campagne pour l'adoption de techniques de laboratoire respectueuses de l'environnement.

### **I.2.7. Extraction assistée par les bio-solvants**

Les bio-solvants comme son nom indique, c'est une catégorie de solvants issue d'une source d'agriculture renouvelable sans production d'effet de serre. Ils sont considérés comme une alternative aux solvants pétrochimiques qui présentent des avantages indéniables. Plusieurs paramètres et conditions préalables sont nécessaires pour qu'un solvant qualifié comme solvant vert. On peut citer le fait que le solvant est renouvelable et recyclable grâce à des méthodes respectueuses de l'environnement, doit avoir un point d'ébullition élevé, une faible pression de vapeur et une biodégradabilité améliorée dans des conditions environnementales normales (Chemat et al., 2017).

Les solvants d'origine biologique proviennent de ressources renouvelables, principalement de cultures agricoles riches en glucides telles que le maïs, le blé et les betteraves, ou de matières organiques résiduelles qui ont longtemps été considérées comme des déchets, bien que d'autres sources de solvants d'origine biologique existent, peuvent être classées en trois catégories en fonction du secteur agroalimentaire à partir duquel elles sont produites : céréales/sucre, oléoprotéagineuses et le bois. Les biosolvants obtenus à partir de sources céréalières ou sucrées sont principalement obtenus par fermentation de jus sucrés présent dans les plantes saccharifère (la betterave, canné) les plantes amylacées (blé, maïs) et des ressources lignocellulosiques issus des déchets de production céréalière. Dans cette catégorie, on peut retrouver par exemple l'éthanol (Ravi et al., 2018), l'acétate d'éthyle (Farooque et al., 2018), les esters de l'acide lactique (D'Archivio et al., 2018), les dérivés de l'acide succinique, le sorbitol, ou encore le furfural et ses dérivés comme le 2-

méthyl-tétrahydrofurane également appelé 2-méthylloxolane (Chaabani et al., 2019) ou éther cyclopentylméthylique (Zhuang et al., 2018).

Les solvants oléo-protéagineux biosourcés sont produits à partir de graines oléagineuses (tournesol, soja, colza). C'est typiquement le cas des esters d'acides gras et des dérivés du glycérol. La filière bois offre la possibilité de produire des hydrocarbures terpéniques tels que le d -limonène, le p-cymène ou l' $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène à partir de conifères ou d'écorces de fruits, ils peuvent être aussi obtenu par distillation d'oléorésines contenues dans le pin ou encore à partir des essences de térébenthine après distillation des résines de bois ou des liqueurs noires de papeteries. Globalement, une large gamme de solvants biosourcés est actuellement disponible. La sélection d'un solvant particulier permet de cibler des molécules spécifiques à extraire et à analyser telles que les polyphénols, les caroténoïdes, les arômes ou encore les lipides (Claux et al., 2021).

### I.3. Encapsulation

L'oxygène et la lumière sont les principaux facteurs de dégradation des composés actifs. Afin de préserver leur activité et de faciliter leur utilisation dans des environnements hostiles, des techniques de formulation telles que l'encapsulation sont employées. Ceci permet de maintenir leur intégrité jusqu'à leur assimilation dans les organes humains appropriés, là où leur action est nécessaire (Gadkari et al., 2015).

L'encapsulation est un processus pour lequel une substance sous formes solide, liquide ou gazeuse est emprisonnée au sein d'une matrice polymère qui est une macromolécule composée de répétition de petite unité appelés monomères. Les polymères sont couramment utilisés dans l'encapsulation en raison de leur capacité à former des matrices solides et stables, ainsi que de leur compatibilité avec une grande variété de substances encapsulées (Akash et al., 2015). Une fois que la molécule est renfermée à l'intérieur du polymère, elle peut donner naissance à deux types de structures principales notamment les capsules et les particules.

Plusieurs polymères ont été utilisés dans le processus d'encapsulation, chacun offrant des caractéristiques uniques et des avantages spécifiques. Parmi ces polymères, on peut citer les polysaccharides tels que l'alginate, la gomme arabique et le chitosane, qui sont largement utilisés en raison de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur capacité à former des gels lorsqu'ils entrent en contact avec des ions divalents. De plus, les polymères synthétiques comme le polyacide lactique-co-glycolique (PLGA) et le polyéthylène glycol

(PEG) sont également fréquemment utilisés en raison de leur stabilité, de leur facilité de manipulation et de leur capacité à contrôler la libération. D'autres polymères naturels tels que les protéines et les lipides peuvent également être utilisés pour l'encapsulation en raison de leurs propriétés spécifiques, offrant ainsi une large gamme d'options pour répondre aux besoins spécifiques des applications d'encapsulation (Akash et al., 2015).

Dans cette recherche, notre intérêt s'est porté sur la polyvinylpyrrolidone (PVP) en tant que support hydrophile et biodégradable, un matériau approuvé par la Food and Drug Administration des États-Unis, est l'un des polymères les plus utiles dans les applications technologiques et pharmaceutiques (Sengwa et al., 2014).

La polyvinylpyrrolidone (PVP), également appelée Povidone, est un polymère synthétique obtenu par polymérisation radicalaire du monomère N-vinylpyrrolidone (Haaf et al., 1985). La PVP est non toxique, non ionique, inerte, résistante à la température, stable au pH, biocompatible et présente une affinité complexe pour les médicaments hydrophiles et hydrophobes. Le PVP est un polymère soluble dans l'eau disponible en différentes qualités avec un poids moléculaire et une viscosité variables (Koczur et al., 2015 ; Bühler, 2005 ; Kurakula et al., 2020).

Des études antérieures ont montré que le PVP est capable d'inhiber la cristallisation en diminuant la mobilité moléculaire des médicaments (Sethia et al., (2004). Les propriétés de dissolution des médicaments sont donc améliorées (Doherty et al., 1987). De plus, la PVP peut augmenter la stabilité des médicaments en les intégrant dans une matrice PVP (Yen et al., 2010). De plus, la PVP contient un groupe accepteur de protons et est donc capable de former des liaisons hydrogènes avec un groupe donneur de protons ainsi que la liaison hydrogène améliore l'étendue de l'interaction entre le médicament et le PVP (Kazarian et al., 2002)

De plus, le PVP occupe une grande surface dans les produits transdermiques comme les pommades, les crèmes et les gels, il est utilisé pour développer des hydrogels (qui agissent comme matrice de diffusion) et comme inhibiteur de croissance cristalline dans certains systèmes de matrice médicamenteuse-adhésive. En raison de l'excellente propriété adhésive démontrée par le PVP en plus de sa sécurité physiologique et de son inertie, il est utilisé comme adhésif dans plusieurs systèmes d'administration de médicaments mucoadhésifs (Chun et al., 2013 ; Sizílio et al., 2018) et systèmes transdermiques (Suksaeree et al., 2017) en raison de ses propriétés telles que l'adhésivité, l'inhibition des cristaux, la solubilisation,...

etc. Les produits transdermiques comprennent les gels, les patchs, les comprimés buccaux, destinés à adhérer à la peau ou aux muqueuses (Kurakula et al., 2020). Des exemples de médicaments utilisés avec la PVP dans les produits transdermiques comprennent le captopril, la chlorhexidine, la bromhexine, le dinitrate d'isosorbide.

### I.4. Aperçu sur les plantes étudiées

#### I.4.1. *Pistacia lentiscus*

##### I.4.1.1. Généralité

*Pistacia lentiscus* est un arbrisseau de la famille des Anacardiaceae de 1 à 3 mètres de hauteur qui atteint parfois 5 - 6 mètre, dégageant une odeur résineuse pénétrante (Botineau, 2015), cette espèce est caractérisée par :

**Branches :** tortueuses et pressées, forment une masse serrée.

**Feuille :** persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (jusqu'à 12) d'un vert Sombre, coriaces, étroites et pointues, dont le pétiole est bordé d'une aile verte.

**Fleurs :** Comme tous les autres pistachiers, l'arbre de lentisque est dioïque, ses fleurs sont petite apétale se rassemblent sous forme de grappes. Les mâles ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres. Les femelles, à 3 ou 4 sépales entourant l'ovaire. La floraison de lentisque s'étend du mois de Mars jusqu'au mois de Mai.

**Fruit :** est une grappe de petites drupes globuleuse environ 5 mm de diamètre, d'abord rouge et il devient noire à sa maturité en mois d'octobre à novembre.



**Figure 13 :** Une photographie de *Pistacia lentiscus* (Botineau, 2015).

##### I.4.1.2. Classification *Pistacia lentiscus*

La position des lentisques dans la systématique du règne végétal est donnée par l'arbre phylogénique représenté ci-dessous (Nahida et Siddiqui, 2012).

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédone

**Sous classe :** Dialpétales

**Série :** Diacifores

**Ordre :** Sapindale

**Famille :** *Anacardiacees*

**Genre :** *Pistacia*

**Espèce :** *Lentiscus*

### **I.4.1.3. Répartition géographique de *Pistacia lentiscus***

Le lentisque est naturellement répandu dans les zones qui entourent les régions côtières de la Méditerranée, du Portugal et de l'Afrique tropicale et pousse sur toutes sortes de sols, où il pousse à l'état sauvage en Algérie, Tunisie, Maroc, Turquie, France, Espagne, Italie et la Grèce (Morkhade, 2007 ; Khiari et al., 2018). En Algérie, le lentisque se rencontre aussi bien dans la région tellienne que dans les zones forestières (Cheurfa et Alem, 2015).

### **I.4.1.4. Utilisation traditionnelle de *Pistacia lentiscus***

Depuis l'antiquité lentisque pistachier est connu pour ses propriétés médicinales, elle est largement utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédatives dans le traitement de la toux, les maux de gorge, les maux d'estomac, les calculs rénaux et la jaunisse. Leur huile est utilisée par voie interne dans le traitement des ulcères et par voie externe pour guérir le psoriasis (Mehenni et al., 2016).

En médecine traditionnelle, les parties aériennes ont été utilisées dans le traitement de l'hypertension et possèdent des propriétés stimulantes et diurétiques, les feuilles sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de l'eczéma, la diarrhée, les infections de la gorge et en tant qu'agent antiulcéreux puissant. En effet plusieurs études ont également rapporté que l'huile essentielle de parties aériennes possède des propriétés biologiques appréciables telles qu'antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antifongique et antiathérogène (Khiari et al., 2018).

La résine est aussi appliquée depuis longue date dans les pays arabes pour la mastication, où elle adoucit l'haleine et aide à préserver les dents et les gencives. En tant qu'agent curatif

dans le traitement de la gastrite, des reflux gastro-œsophagiens et des infections intestinales. Elle a également été évaluée en tant que médicament brut pour l'activité antiulcéreuse gastrique et duodénale avec une activité antibactérienne spécifique contre *Helicobacter pylori* (Morkhade, 2007).

### I.4.1.5. Données pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*

Plusieurs extraits préparés à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* ont montré des propriétés pharmacologiques significatives antioxydantes, antibactérienne, antifongique, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antidiabétique, et des activités hépatoprotectrice, hypocholestérolémie et antiulcéreuse (Sehaki et al., 2023), Il a été prouvé que diverses préparations d'extraits de feuilles présentent un potentiel antioxydant exceptionnel, évalué au moyen de différents tests anti-radicalaire (Ghenima et al., 2015 ; Salhi et al., 2019). D'après l'étude menée par Bakli et al. (2020), il a été observé que l'extrait de feuille présente des propriétés antibactériennes contre *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis*. De plus une activité contre *Vibrio cholerae* (MBC = 0,3 mg/ml). Par ailleurs, l'extrait de feuilles a également montré une activité antifongique contre les souches *Candida pelliculosa*, *Fusarium oxysporum albiginis*, *Richophyton mentagrophyte* et *Microsporium canis* (Mansour-Djaalab et al., 2012 ; Salhi et al., 2019).

En outre, des recherches antérieures ont révélé une activité cytotoxique modérée à l'encontre de divers types de cancer, notamment le cancer du poumon A549, le cancer du sein MCF7, le cancer de la prostate PC3 et le cancer du foie HepG2 (Kirolos et al., 2019). De plus, un potentiel anticancéreux a été démontré contre les lignées cellulaires de mélanome B16F10 ainsi que des effets clairs dépendants de la dose sur la croissance de la lignée cellulaire HT-29 dérivée de l'adénocarcinome colorectal humain (Remila et al., 2015 ; Siano et al., 2020).

Un potentiel anti-inflammatoire sur des lignées cellulaires monocytaires THP-1 a mis en évidence la capacité d'extrait à inhiber la sécrétion d'interleukine IL1 par les macrophages ainsi qu'une activité anti-inflammatoire importante *in vivo* par le test d'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris, la pleurésie induite par le carraghénane chez le rat et la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris (Bouriche et al., 2016 ; Salhi et al., 2019).

Les travaux antérieurs de Mehenni et al. (2016), ont rapporté un effet antidiabétique des extraits du *P.lentiscus* via le mécanisme d'inhibition de  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase. Une étude *in vivo* a également attribuée aux feuilles et au fruit de *P.lentiscus*, une activité antidiabétique prometteuse. L'effet de l'extrait était comparable à celui de la molécule de référence (Glibenclamide 0,91 g/l). Les mêmes auteurs ont également montré un effet hépatoprotecteur significatif contre des lésions induites par des concentrations élevées du paracétamol.

L'effet hypocholestérolémiant des feuilles de *Pistacia lentiscus* a fait l'objet d'une étude menée par Cheurfa et al. (2015). Leurs recherches ont révélé qu'une dose de 200 mg/kg d'extrait ethanologique a diminué significativement le cholestérol total, des triacylglycérides et du cholestérol des lipoprotéines de basse densité ( $154,6 \pm 18,10$  ;  $71,2 \pm 4,38$  et  $99,36 \pm 18,77$  mg/dl, respectivement) tandis que l'extrait aqueux a significativement diminué le cholestérol total et des triacylglycérides (respectivement  $203,6 \pm 9,18$  ;  $97,6 \pm 3,57$  et  $38,2 \pm 1,48$  mg/dl).

### **I.4.1.6. Composition chimique de *Pistacia lentiscus***

L'analyse phytochimique de *P.lentiscus* a démontré la richesse et la diversité des composés d'extraits en lipide, polyphénol et les terpénoïdes.

*P.lentiscus* est une plante riche en lipide principalement en acide gras tel que l'acide oléique (50 - 72 %), l'acide palmitique (23,2 %) et l'acide linoléique (21,7 %), l'acide palmitoléique (1,3 %), stéarique (1,1 %), linoléique (0,8 %), gadoléique (0,2 %) et arachidique. Ainsi qu'en phytostérol on cite, le  $\beta$ -sitostérol (90 %), le campestérol, le cholestérol et le stigmastérol (Trabelsi et al., 2012).

Le profil phénolique de l'extrait de feuille de *P.lentiscus* est caractérisé principalement par la présence d'acide gallique, acide protocatéchique, acide chlorogénique, acide caféique, acide salicylique, acide p-coumarique, rutine, hespéridine, isoquercitrine, rhoifoline, apigétrine, la catéchine, l'acide ellagique, la lutéoline, l'acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique, l'acide benzoïque, kaempférol, myricétine, quercétine, acide syringique, acide carnosique, tyrosol,  $\beta$ -glucogalline, naphthorésorcinol, génistéine, taxifoline ainsi que les anthocyanines composés principalement par cyanidine-3-O-glucoside, delphinidine-3-O-glucoside et cyanidine-3-O-arabinoside (Mehenni et al., 2016 ; Souilah et al., 2023 ; Sehaki et al., 2023).

Les terpénoïdes sont les métabolites majoritaires de *P.lentiscus* qui renferme dans leur composition des monoterpènes et des tri-terpènes. Selon les études réalisées par Amhamdi et al. (2009) et Souilah et al. (2023), les feuilles sont caractérisées par la présence des monoterpène a noter : le myrcène, limonène, le -gurjunène, le germacrène, le  $\alpha$ -pinène, le muurolene,  $\alpha$ -humulène, l'épibicyclosquiphellandrène, le  $\beta$ -pinène, le p-cymène, l' $\alpha$ -phellandrène, le terpinène-4-ol,  $\alpha$ -thujene, camphene, sabinene,  $\alpha$ -terpinene, (E)- $\beta$ -Oocimene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinolene,  $\alpha$ -terpineol, 2-undecanone,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -Eelemene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -muurolene,  $\delta$ -cadinene,  $\delta$ -cadinol,  $\alpha$ -muurolol, l'oxyde de caryophyllène, l'acétate de bornyle. Tandis que La résine est constituée d'environ 2 % d'huile volatile principalement l'acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -masticiniques, acide masticolique, acides  $\alpha$ - et  $\beta$  -masticoniques, masticosène,  $\beta$ -masticosène (également appelé masticine). Tandis que L'huile volatile de la gomme mastic contient principalement le d-pinène (Morkhade, 2007).

### I.4.2. *Populus nigra*

#### I.4.2.1. Généralité

*Populus nigra* L. est une espèce arborescente de la famille des Salicaceae qui peut atteindre 25 à 30 m de hauteur avec une longévité de 200 ans, dioïques, héliophiles et majoritairement pionniers, ces caractéristiques morphologiques sont définies ci-dessous (Dupérat, 2008 ; Rameau, 2008) :

**Houppier :** ample irrégulier avec de grosses branches.

**Feuilles :** sont triangulaire en forme losangique mesurant de 4 à 7 cm de long glabre denticulée verte assez foncé sur les deux faces, limbe fine dentée et vert, le pétiole est comprimé.

**Fleurs :** La floraison en mars avril fait intervenir des chatons males de 5 cm rouge violacé puis pourprés et des chatons femelles plus longue verte pale puis devenant vert jaunâtre et cotonneux en juin au moment de la libération des grains munies d'aigrettes soyeuse.

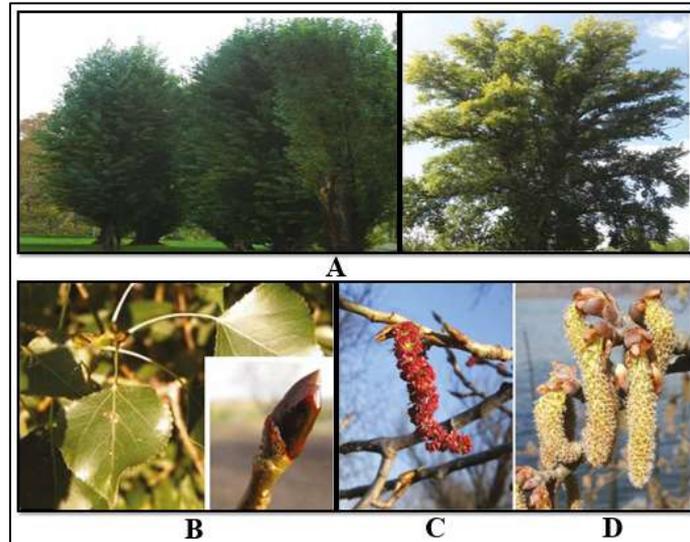
**Fruits :** Capsule ovoïdes en chapelet à grain cotonneuse.

**Rameaux :** Rameau glabre ronds, légèrement anguleux et luisant portent de petit bourgeon pointu orangé et un peux visqueux.

**Bourgeons :** Sont de forme conique et allongé glabre visqueux.

**Ecorce :** jeune lisse mince grisâtre devient rugueuse noirâtre et entaillée de profondes gerçures verticale.

**Graine :** Les graines sont petites et duveteuses et sont disséminées entre mai et juin.



**Figure 14 :** Différentes parties du peuplier noir : (A) arbre entier, (B) feuilles et bourgeons, (C) fleurs, (D) males fleurs femelles (Siler et al., 2014).

### I.4.2.2. Classification *Populus nigra*

Selon Siler et al. (2014), la classification du peuplier noir (*Populus nigra* L.) est comme suit :

**Embranchement :** Spermaphytes

**Division :** Phanerogameae

**Sous Division :** Angiospermae

**Classe :** Dicotyledonae

**Ordre :** Salicales

**Famille :** *Salicaceae*

**Genre :** *Populus*

**Espèce :** *Populus nigra* L.

### I.4.2.3. Répartition géographique de *Populus nigra*

Le peuplier noir occupe un vaste territoire, s'étendant des couloirs fluviaux des zones de plaine, de piémont et de montagne de l'hémisphère nord depuis l'Afrique du Nord et l'Irlande à l'ouest jusqu'à la Russie et la Chine en l'est (Siler et al., 2014).

En Algérie, Il se trouve dans la région d'Elkala, Kabylie et Tlemcen, il est réparti surtout dans les plaines alluviales et les vallées. C'est une espèce méditerranéenne, qui peut s'étend jusqu'à aux régions sèches ou la pluviométrie dépasse 400 m (Letreuch-Belarouci, 1991 ; Belouad, 2001).

### **I.4.2.4. Utilisation traditionnelle de *Populus nigra***

Dans la phytothérapie traditionnelle, l'importance était également accordée à l'écorce de peuplier, à laquelle on attribuait des propriétés astringentes, anti-inflammatoires, antirhumatismales et antiseptiques utilisés en topique dans les lésions cutanées superficielles, les coups de soleil, les piqûres d'insectes ou les contusions en outre les feuilles de cet arbre sont aussi utilisées comme tonique et antiseptique.

Les bourgeons de peuplier étaient utilisés comme teinture, infusion, poudre ou pommade. La teinture a été recommandée comme remède contre l'asthme et d'autres affections respiratoires, telles que la bronchite, la toux, la trachée, la laryngite, le mal de gorge, la grippe, la goutte et l'hémorragie pulmonaire. La pommade elle est utilisée pour traiter les infections cutanées, les fissures, les ulcérations, les hémorroïdes, les douleurs anales, la goutte inflammatoire et le rhumatisme. De plus la pommade possède un effet anti-âge.

Les bourgeons de peuplier noir sont employés comme antipyrétiques, antiallergiques, antimicrobiennes, antidiabétiques, anti-tumorales et pour leurs propriétés anti-inflammatoires d'ailleurs il existe une formulation ancienne à base de bourgeons de peuplier commercialisé sous le nom Unguentum populeum utilisée encore comme anti-inflammatoire et anti hémorroïdes (kuš et al., 2018).

### **I.4.2.5. Données pharmacologiques de *Populus nigra***

Les recherches ont révélé un potentiel antioxydant des bourgeons de *P.nigra*, les bourgeons ont été également étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoires dans le modèle de l'œdème plantaire chez la souris (Debbache et al., 2014), les résultats ont démontré un potentiel antiinflammatoire de l'extrait éthanolique à une dose de 200mg/Kg comparable à celui du diclofénac à 50mg/Kg. De plus, Wang et al. (2014) ont montré que l'extrait à différentes concentrations (25 et 100 mg/kg) a exhibé des effets anti-inflammatoires significatifs en inhibant la production de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$ ) et en bloquant l'expression des gènes pro-inflammatoire.

*Populus nigra* a également révélé des propriétés antimicrobiennes avec une sensibilité accrue des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* et *Listeria monocytogenes* (Vardar-Unlu et al., 2007 ; Benedec et al., 2014). De plus, une action antifongique a été également constatée contre *Candida albicans* (CMI = 45,16 µg/ml) (Merghache et al., 2018). Selon Debbache et al. (2013), tous les extraits examinés (éthanol, acétate d'éthyle aqueux, chloroforme et chloroforme aqueux) de bourgeons de peuplier ont montré une activité modérée contre les souches fongiques telles qu'*Aspergillus niger* et *Fusarium polyferatum*.

Au cours d'une analyse approfondie portant sur les propriétés antidiabétiques, l'étude menée par Peng et al. (2018) a révélé que l'extrait éthanolique de bourgeons de peuplier provenant de Chine avait la capacité d'améliorer la sensibilité à l'insuline et diminué l'hémoglobine glyquée et les protéines sériques glycosylées *in vivo* sur un modèle expérimental animal de souris diabétiques. De plus, ils ont révélé que les bourgeons de peuplier (50 ou 100 mg/kg/jour pendant 4 semaines) provoquaient une diminution de plus de 25 % du taux d'insuline sérique des souris modèles (DT2) induits par HFD et STZ ainsi que l'extrait a exhibé un effet plus significatif que celui exhibé par la metformine (100 mg/kg/jour).

L'équipe de Debbache-Benaidia et al. (2013) ont mené une étude *in vivo* sur des souris albinos pour évaluer les propriétés hépato-protectrices de l'extrait éthanolique de *Populus nigra* (200 mg/kg) contre la toxicité hépatique induite par l'aluminium et l'analyse histopathologies des coupes hépatiques traitées a révélé une architecture hépatique normale. De plus, l'extrait protégeait le foie contre les lésions hépatiques et la nécrose induites par l' $AlCl_3$ . En outre, l'étude abordée par Debbache et al. (2013) sur une préparation vasculaire d'aorte porcine pré-contractée avec U46619 ont montré des propriétés vasorelaxantes traduit par une augmentation du pourcentage de relaxation, qui était comparable à la fois pour l'endothélium intact (67,74 % ; IC 50 = 0,04 mg/ml) et pour l'endothélium dénudé (72,72 % ; IC 50 = 0,075 mg/ml). Le mécanisme de vasodilatation des artères coronaires était indépendant du NO', ce qui suggère que l'extrait agit directement sur le muscle lisse, empêchant probablement le calcium à l'intérieur de la cellule.

Debbache et al. (2018) ont rapporté l'effet hypouricémiant de l'extrait éthanolique de *P. nigra* testé (100 - 400 mg/Kg) chez la souris.

### I.4.2.6. Composition chimique de *Populus nigra*

A travers les études phytochimiques, Il a également été souligné que les dérivés de flavonoïdes ont été identifiés comme l'un des principaux composés phytochimiques des bourgeons de *P.nigra*. Ils sont représentés par des flavones (chryssine, tectochryssine, apigénol), des flavonols (galangine, kaempférol, quercétol), des flavanones (pinocembrine, pinostrobin et pinobanksine). Aussi, les acides phénoliques et leurs esters, tels que l'acide caféique, p-coumarique, acide férulique, isoférulique, la catéchine, acide cinnamique, acide ellagique, acide rosmarinique sont décrits parmi les principaux composés phytochimiques détectés dans différents extraits de bourgeons de peuplier noir. Outre ces composés, Différentes études phytochimiques menées sur différents extraits de *P.nigra* ont rapporté la présence des hétérosides phénoliques à savoir le populoside et le salicoside (Lee et al., 2010 ; kúš et al., 2018 ; Kis et al., 2020 ; Kis et al., 2022) et compris des tanins, des cires, des résines, du glucose, du fructose, des oligosaccharides, des dérivés triterpéniques ( $\alpha$  et  $\beta$  amirenon) (Isidorov et al., 2003 ; Ristivojević et al., 2015). Ainsi que les huiles essentielles principalement riches en cadinène, cinéol, bisabolol, humuline, farnésol, bisabolène,  $\beta$ -eudesmol et  $\alpha$ -eudesmol,  $\gamma$ -sélénène, le  $\delta$ - l' $\alpha$ -élémane et le  $\gamma$ -cadinène et des hémiterpènes ainsi que les monoterpènes présents dans les bourgeons de peuplier noir. Parmi les composés volatils non terpénique on distingue des alcools aliphatiques et aromatiques, des composés carbonylés, des acides aliphatiques et huile essentielle séché (Jerković et Mastelić, 2003).

Chapitre II :

Matériels et méthodes

---

### II. Matériel et méthodes

#### II.1. Matériel

##### II.1.1. Matériel végétal

Les plantes sélectionnées pour cette étude sont des plantes médicinales utilisées dans la pharmacopée algérienne. Les feuilles de *P.lentiscus* et les bourgeons du *P.nigra* ont été récoltés début septembre 2021 dans la forêt de tizi neftah, une zone humide, loin de la pollution, ce qui limite les risques de modification de la composition biochimique. Les parties de plantes ont été récoltées par le Professeur Atmani et identifiées dans le laboratoire de Botanique de l'université de Bejaia.

##### II.1.2. Animaux de laboratoire

Des femelles NMRI (Naval Medical Research Institute) (âgées de 6 - 7 semaines, 30 - 35 g), provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, Algérie, ont été utilisées pour cette étude. Avant les tests, les animaux ont été acclimatés pour s'adapter à leur nouvel environnement et réduire leur stress. Ils ont été logés dans des conditions standard ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  ; 50 % d'humidité, cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h) avec accès libre à l'aliment et l'eau. Les animaux ont été manipulés conformément aux recommandations du Comité international d'éthique (directive 2010/63/UE relative à l'expérimentation animale).

##### II.1.3. Matériels et réactifs

###### Instruments de mesure

Broyeur électrique (IKA WERKE), agitateur magnétique (AM4), centrifugeuse réfrigérée (sigma 2-16 PK, balance (AS 220/CI2), vortex (V-1 plus) BOECO, ultrason LT-100 PRO (100 W/ 40 Khz), bain-marie (Mettler), spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu UV-1800), lecteur de microplaques (BioTek Synergy HTX), incubateur de microplaques (Boeco), (Shimadzu FTRI-8400s), LC-MS (Shimadzu LCMS 8040), GC-MS (Shimadzu QP2010 type EI 70ev).

###### Produit et réactif chimique

Tous les réactifs et produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique : L'hydroxyde d'ammonium, le magnésium, ont été achetés à Biochem Chemopharma (USA), l'éthanol, le glycérol, l'acide L-lactique, le diméthylsulfoxyde, 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH), acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), cyclooxygénase (COX),

N,N,N'N'-tétraméthyl-1,4-phényl enedi- amine, acide arachidonique, hème, myéloperoxydase, l'o-anisidine, persulfate de potassium (99 %), salicylate de sodium. ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Allemagne), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, acide chlorhydrique (HCl), NaOH, AlCl<sub>3</sub>, albumine de sérum bovin (BSA), peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (95 %), tris-HCl (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub>), (Hydroxyméthyl)aminométhane proviennent d'Alpha Chemical (Inde), acide gallique, quercétine, catéchine, diosgénine, acide ascorbique, trolox, Folin Ciocalteu ont été obtenu auprès de Chim-oza (France), l'acide sulfurique, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, le bleu brillant G-250 de Coomassie, l'acide phosphorique, l'acide trichloracétique (TCA), polyvinylpyrrolidone, nitroprussiate de sodium, l'anaphtyléthylènediamine, acide sulfanilique ont été obtenus auprès de Prolab (France). FeSO<sub>4</sub>, anhydride acétique, ferrocyanure de potassium, chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> proviennent de Panreac (Espagne).

### II.2. Procédure d'extraction

#### II.2.1. Échantillonnage, broyage et tamisage

Les échantillons prélevés ont été soigneusement lavés à l'eau courante, puis séchés dans l'étuve à 40°C pendant 2 jours. L'échantillon séché est réduit en poudre puis tamisé pour obtenir une poudre homogène d'un diamètre inférieur à 63 µm, cette dernière est stockée à l'abri de la lumière à -20°C jusqu'à son utilisation.

#### II.2.2. Extraction

Dans la présente étude, la technique d'extraction assistée par ultrasons a été choisie. Brièvement, la poudre de plante (1 g) a été macérée dans l'acide lactique (10 ml), le mélange a été émergé dans un bain-marie à ultrasons (40 KHz), le mélange obtenu a été centrifugé à 8000 g pendant 20 minutes pour assurer une séparation complète du matériel végétal, la solution résultante a été transférée dans des tubes de 15 ml et stockée à -20°C.

#### II.2.3. Optimisation et validation du modèle

Sur la base d'une étude préliminaire à facteur unique, les principaux facteurs influençant le processus d'extraction des composés phénoliques ont été sélectionnés et introduits dans le plan de Box-Behnken (BBD) en utilisant la méthodologie de la surface de réponse (RSM) avec l'application de trois facteurs à trois niveaux (-1, 0 et +1) pour optimiser le pourcentage d'acide lactique X1 (45 - 90 %), la température X2 (35 - 45°C) et le temps d'extraction X3 (20 - 40 min). Pour chaque expérience, trois tests ont été réalisés et les résultats ont été traités par

le logiciel JMP (version 14). La formule de prédiction générale pour le modèle linéaire quadratique est décrite par l'équation suivante (Eq. (1)) :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (i \neq j) \quad (1)$$

### II.3. Screening phytochimique

Afin de mettre en évidence la présence de certains composés appartenant aux familles chimiques des métabolites secondaires, une étude phytochimique a été réalisée en se basant sur des réactions de révélation. À cet effet, des tests impliquant des réactions de coloration, de turbidité ou de précipitation ont été choisis en s'inspirant de la littérature pertinente (Gangwar et al., 2014 ; Khan et al., 2011 ; Daira et al., 2016 ; Haddouchi et al., 2016 ; Souley Kallo et al., 2018).

#### II.3.1. Détection des alcaloïdes

La formation d'un précipité brun-rougeâtre après l'addition de 1 ml de réactif de Dragendorffs à l'extrait indique la présence des alcaloïdes.

#### II.3.2. Détection des polyphénols

La présence de flavonoïdes a été mise en évidence par traitement de l'extrait (0,5 ml) avec 10 gouttes d'acide chlorhydrique concentré et 2 mg de tournures de magnésium. La coloration rose-rouge ou jaune se développe après 3 min d'incubation à température ambiante.

L'existence des tanins a été vérifiée par l'ajout de 8 gouttes d'une solution de chlorure ferrique (1 %) à 1 ml d'extrait. Le développement d'une coloration verdâtre indique la présence de tanins catéchiques et le bleu-noirâtre révèle les tanins galliques.

Les anthocyanes ont été révélés par le mélange de 5 ml d'extrait avec 5 ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) et 5 ml d'hydroxyde d'ammonium ( $NH_4OH$ ). Le changement de la couleur rouge vers le bleu violacé indique la présence des anthocyanes.

Pour tester la présence de leucoanthocyanes, 5 ml d'extrait et 4 ml d'alcool chlorhydrique (Ethanol/Pure HCl 3/1 v/v) ont été introduits dans un tube à essai puis chauffés au bain-marie à 50°C pendant 2 min. L'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leucoanthocyanes.

Pour tester la présence des coumarines, un volume de 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 10 % a été ajouté à 2 ml d'extrait. Après chauffage (50°C/ 5 min) suivi d'un

refroidissement. 4 ml d'eau distillée ont été ajoutés et la solution devient transparente comparativement au contrôle. La présence des coumarines est confirmée par l'apparition d'un trouble et un précipité après ajout du HCl.

La présence des quinones a été détectée par l'ajout de quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 10 % à l'extrait, La coloration jaune, rouge ou violette indique un résultat positif.

### II.3.3. Détection des glycosides

Pour détecter les saponines glycosides, 2 ml d'extrait ont été ajoutés à 8 ml d'eau avec agitation vigoureuse, la formation d'une mousse stable révèle leur présence. La présence de glycosides cardiaques dans l'extrait a été vérifiée par la pyridine avec une solution sodique alcaline de nitroprussiate qui a montré une couleur rouge vif.

### II.3.4. Détection des stéroïdes et des terpénoïdes

Les stéroïdes ont été détectés par un mélange avec un mélange de 5 ml d'anhydride acétique, 5 ml d'extrait et 0,5 ml d'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'apparition de coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive.

Les terpénoïdes ont été révélés par un mélange de 5 ml d'extrait avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau rouge-brun à l'interface indique leur présence.

### II.3.5. Détection des protéines

La coagulation des solutions d'extraits chauffés dans de l'eau bouillante indique la présence des protéines.

## II.4. Dosage des substances actives

Dans cette étude, le dosage des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, des saponines et des protéines de feuilles de *P.lentiscus* et des bougeons de *P.nigra* a été réalisé.

### II.4.1. Polyphénols totaux

La teneur des composés phénoliques a été déterminée selon la méthode de Folin Ciocalteu, basée sur la réduction en milieu alcalin du réactif follin ciocalteu qui est un mélange d'acide de phosphotungstène (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolybdène (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>4</sub>) par les groupements oxydables des composés phénoliques. Cette réaction se traduit par une

coloration bleue avec une absorbance maximale à 765 nm dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques oxydés de l'extrait (Singleton et al., 1999).

L'évaluation du contenu phénolique total a été déterminée par la méthode de Moldovan et al. 2021. Brièvement, 20 µl de l'extrait ont été mélangés à 100 µl de la solution de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10). Les solutions ont été mélangées et incubées à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. Après incubation, 80 µl de solution de carbonate de sodium à 7,5 % ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ont été ajoutés et incubés pendant 30 minutes. L'absorbance des mélanges réactionnels a été mesurée à 760 nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant une gamme de concentrations d'acide gallique et la teneur des extraits en phénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poudre sèche (mg EAG/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.4.2. Flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits a été réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium, ces derniers interagissent avec les flavonoïdes en formant un complexe de coloration jaunâtre dont l'intensité optique est mesurée à 430 nm (Djeridane et al., 2006).

Dans un tube à essai, un volume de 1 ml d'extrait a été additionné à 1 ml de solution d' $\text{AlCl}_3$  (2 % dans le méthanol). Après 15 min d'incubation, l'absorbance est enregistrée à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage a été obtenue en utilisant la quercétine comme standard et la teneur des extraits en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poudre sèche (mg EQ/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.4.3. Tanins condensés

En présence d'acide chlorhydrique concentré, les tanins condensés se dépolymérisent en catéchine, le carbone en position 6 du cycle A interagit avec le groupement aldéhydique de la vanilline en formant un complexe chromophore de couleur rouge qui donne une absorbance à 500 nm (Enneb et al., 2015).

Selon le protocole de Kaouamé et al. (2021), un volume de 50 µl d'extrait ont été mélangés avec 1,5 ml de la solution méthanolique de la vanilline (4 %) dans laquelle 750 µl de HCl concentré ont été ajoutés. Après une incubation de 20 min, les absorbances ont été mesurées à 550 nm.

Une courbe d'étalonnage a été obtenue en utilisant une gamme de concentrations de la catéchine et les résultats de dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme de poudre sec (mg EC/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.4.4. Tanins hydrolysables

Le dosage colorimétrique des tanins hydrolysable est basé sur l'interaction des tanins de l'extrait avec le réactif du trichlorure de fer qui induit la formation d'un complexe rouge violette dont la densité optique est mesurée à 660 nm (Dif et al., 2015).

La détermination des tanins hydrolysables a été réalisée selon le protocole de Mole et al. (1987). L'extrait (1 ml) a été ajouté à 3,5 ml de solution de FeCl<sub>3</sub> (0,01 M dans 1 mM d'acide chlorhydrique) puis incubé pendant 5 min suivi d'une lecture a une longueur d'onde de 660 nm.

Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant une gamme de concentrations de l'acide tannique et les teneurs des extraits en tanins hydrolysables ont été exprimés en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de poudre sèche (mg EAT/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.4.5. Saponines

La quantification des saponines est basée sur la formation d'un chromophore obtenu par l'interaction de la vanilline sulfurique avec la partie aglycane des saponines, détecté par spectrophotomètre (Hiai et al., 1975).

La quantification des saponines a été réalisée selon le protocole de Ncube et al. (2011). Un mélange réactionnel contenant 250 µl d'extrait, 250 µl de vanilline 8 % et 2,5 ml d'acide sulfurique (72%) ont été incubés à 60°C pendant 10 min, après refroidissement les absorbances ont été enregistrées à 544 nm.

Une courbe d'étalonnage a été obtenue en utilisant une gamme de concentrations de la diosgénine. Le contenu des extraits en saponine a été exprimé en milligramme d'équivalent de

diosgénine par gramme de poudre sèche (mg ED/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.4.6. Protéines totaux

Il est basé sur la réaction entre les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines avec le bleu de Coomassie G-250 dans un milieu acide qui se manifeste par un changement de couleur bleu mesurée à 595nm.

Le mécanisme réactionnel du test réside dans la liaison du colorant bleu brillant de coomassie G-250 dans un milieu acide aux résidus d'acides aminés basiques tels que l'arginine, l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane, les résidus de tyrosine et les interactions hydrophobes dans les protéines, ce qui entraîne un changement de couleur en bleu (Valipoor et al., 2015).

La teneur en protéines des extraits a été estimée par la méthode Bradford décrite par Valipoor et al. (2015). Brièvement, 50 µl de l'extrait ont été ajoutés à 200 µl du réactif de Bradford, après une incubation de 5 min, la densité optique a été mesurée à 595 nm.

Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant l'albumine et Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalente de sérum-albumine bovine par gramme de poudre sèche (mg EBSA/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.5. Détermination de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes ont été sélectionnées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des molécules pures ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

#### II.5.1. Activité scavenging du radical DPPH•

En présence des antioxydants, le DPPH (2-2-diphényle-1-picrylhydrazyl) qui est un radical libre et stable ayant une couleur violette est réduit en composé jaune qui est la forme d'hydrazine (non radical). L'absorbance de la solution est mesurée à 517 nm (Molyneux, 2004).

Le potentiel antioxydant contre le radical synthétique DPPH• a été mesuré selon la méthode de Ambarwati et al. (2021). Brièvement, 180 µl d'une solution éthanolique de

DPPH• (0,1 mM) ont été ajoutés à 20 µl d'extrait puis incubé à 37°C pendant 30 min, les absorbances ont été enregistrées à 515 nm.

Le potentiel scavenging des extraits a été exprimé en millimole d'équivalent de trolox par 100 grammes de poudre sèche (mmol ET/100 g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage de trolox (**Annexe I**).

### II.5.2. Activité scavenging du radical ABTS•+

Dans ce test, le radical monocation ABTS<sup>•+</sup> de coloration vert bleu est généré par l'oxydation du sel d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) avec du persulfate de potassium, en présence des antioxydants donneurs d'hydrogène, cette réduction est traduite par une décoloration d'ABTS<sup>•+</sup> qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm (Re et al., 1999).

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire d'ABTS<sup>•+</sup> a été mesurée suivant la méthode de Re et al. (1999). Un cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup> a été préparé par l'addition d'une solution mère d'ABTS de 7 mM avec 2,45 mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (1/1 ; V/V) conservée à l'obscurité pendant 12-16h. Une dilution dans du PBS (4 mM ; pH 7,4) a été effectuée pour obtenir une absorbance de 0,700 ± 0,02 de l'ABTS<sup>•+</sup> enregistrée à 734 nm. Après la dilution, 20 µl d'extrait ont été ajoutés à 180 µl d'une solution de radicaux libres d'ABTS<sup>•+</sup>. Après une incubation de 5 minutes, les absorbances ont été mesurées à 734 nm.

Le potentiel scavenging des extraits a été exprimé en millimole d'équivalent de trolox par 100 grammes de poudre sèche (mmol ET/100 g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage de trolox (**Annexe I**).

### II.5.3. Activité scavenging du radical hydroxyle

Ce test est basé sur la formation d'un complexe salicylate hydroxylé qui absorbe à 562 nm leur absorbance est proportionnelle à la quantité du radical hydroxyle dans le milieu (Rajamanikandan et al., 2011).

La capacité des extraits à piéger le radical hydroxyle (OH•) a été évaluée selon le protocole de Rajamanikandan et al. (2011). Un mélange réactionnel (3 ml) contenant : 1 ml de FeSO<sub>4</sub> (1,5 mM), 0,7 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM), 0,3 ml de salicylate de sodium (20

mM) et 1 ml d'extrait est incubé pendant 1 h à 37°C. Les absorbances du complexe salicylate hydroxylé a été mesurée à 562 nm.

Le potentiel scavenging des extraits a été exprimé en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de poudre sèche (mg EAA/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.5.4. Pouvoir réducteur de fer

Le pouvoir réducteur a été évalué pour déterminer la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique «  $Fe^{3+}$  » dans le complexe ferricyanure de potassium de couleur jaune en fer ferreux «  $Fe^{2+}$  » pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui absorbe à 700 nm (Bougandoura et Bendimerad, 2013).

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode recommandée par Menakh et al. (2020). L'extrait (10  $\mu$ l) a été incubé avec 40  $\mu$ l de tampon phosphate et 50  $\mu$ l de  $K_3Fe(CN)_6$  (1%) à 50°C pendant 20 min, 50  $\mu$ l de TCA (10%), 40  $\mu$ l de  $H_2O$  et 10  $\mu$ l de  $FeCl_3$  (0,1%) ont été additionnés et les absorbances ont été mesurées à 700 nm.

Le potentiel antioxydant lié au pouvoir réducteur des extraits a été exprimé en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de poudre sèche (mg EAA/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.5.5. Pouvoir réducteur de molybdate

Ce test est évalué par la méthode de phosphomolybdène. Il est basé sur la réduction de Molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $MoO_4^{2-}$  en molybdène Mo (V) sous la forme réduite  $MoO^{2+}$ , en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide (Prieto et al., 1999).

L'activité antioxydante totale a été évaluée selon le protocole de Prieto et al. (1999). Un volume (3 ml) du réactif (acide sulfurique 0,6 M ; phosphate de sodium 28 mM ; molybdate d'ammonium 4 mM) ont été ajoutés à 0,3 ml d'extrait puis incubé à 95°C pendant 90 min suivi d'une lecture à 695 nm.

L'activité antioxydante totale des extraits a été exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de poudre sèche (mg EAG/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.5.6. Pouvoir chélateur des ions ferreux

La mesure de la formation d'un complexe de Ferrozine-Fe<sup>+2</sup> se caractérise par une couleur violet mesurable à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ces complexes est diminuée, entraînant ainsi une réduction de la couleur (Gülçin, 2011).

La capacité de chélation des ions ferreux a été déterminée selon la méthode de Wang et al. (2009). Dans une microplaque à 96 puits, 100 µl d'extrait ont été mélangés avec 135 µl d'eau distillée et 5 µl de FeCl<sub>2</sub> (2 mM). La réaction a été initiée par l'ajout de 10 µl de ferrozine (5 mM). Les solutions ont été bien mélangées et laissées au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Après incubation, les absorbances ont été enregistrées à 562 nm.

Le pouvoir chélateur des extraits a été exprimé en milligramme d'équivalent acide éthylène diamine tétra-acétique par gramme de poudre sèche (mg EDTAE/g PS) en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### II.6. Détermination de l'activité anti-inflammatoire

#### II.6.1. Activité scavenging du radical d'oxyde nitrique

Dans cette étude le sodium nitroprusside a été utilisé comme source de production d'oxyde nitrique (NO·). En présence des composés anti radicalaires, ces derniers entrent en compétition avec le mono-oxyde d'azote qui interagit avec l'oxygène de l'eau et empêche la formation du nitrate et du nitrite. Ces derniers sont des produits stables révélés par le réactif de Griess en formant un complexe qui absorbe à 542 nm (Marcocci et al., 1994).

L'activité anti radicalaire des extraits contre le radical oxyde nitrique a été mesurée par la réaction de Griess décrite par Marcocci et al. (1994). Brièvement, 50 µl de nitroprussiate de sodium (10 mM) solubilisés dans du PBS (pH 7,4) ont été ajoutés à 50 µl de l'échantillon à différentes concentrations suivie d'une incubation à 25°C pendant 150 minutes en présence la lumière. La quantité de NO· produite par le nitroprussiate de sodium a été déterminée par le réactif de Griess (0,1 a-naphthyl-éthylènediamine % et 1 % d'acide sulfanilique dans H<sub>3</sub>PO 5 %) est mesurée à 564 nm.

L'activité anti oxyde nitrique des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante (Eq. (2)) :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(Ac-AS)}{Ac} \times 100 \quad (2)$$

$A_c$  : l'absorbance du contrôle

$A_s$  : l'absorbance d'extrait

### II.6.2. Activité anti-cyclooxygénase

Le principe de ce test consiste à mesurer la capacité de l'extrait à inhiber la dégradation de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase en présence de Tétraméthylparaphénylènediamine (TMPD) comme révélateur caractérisé par une coloration bleue lors de la dégradation d'acide arachidonique.

L'activité inhibitrice de la COX-1 par les extraits a été évaluée selon la méthode de Reddy et al. (2009). Le milieu réactionnel composé de 130  $\mu$ l de tampon Tris-HCl (100 mM), 10  $\mu$ l d'hème (15  $\mu$ M dans le DMSO), 10  $\mu$ l d'enzyme COX-1 (5 UI dans le tampon Tris-HCl) et 20  $\mu$ l d'extrait ont été transférés dans une microplaque à 96 puits. Après, agitation pendant 20 secondes, la microplaque a été incubée à 25°C pendant 10mn. Un volume de 20  $\mu$ l d'acide arachidonique (2,2 mM dans l'éthanol/DMSO v/v) et 20  $\mu$ l de TMPD (3 mg/ml dans le DMSO) ont été ajoutés sous agitation vigoureuse pour initier la réaction. Après incubation à 25°C pendant 10 minutes, l'absorbance de chaque puits a été mesurée à 603 nm.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition selon l'équation (Eq. (2)).

### II.6.3. Activité anti myéloperoxydase

Ce test repose sur la capacité d'un extrait à inhiber la formation d'un chromophore orange induit par la dégradation du substrat, dont la densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre.

La capacité de l'extrait à inhiber l'activité enzymatique de la myéloperoxydase a été étudiée selon le protocole de Momić et al. (2008). Un volume (10  $\mu$ l) d'enzyme (0,3 UI/ml) préparée dans un tampon phosphate de potassium (100 mM ; pH 6,4) ont été ajoutés à 40  $\mu$ l d'extrait suivie d'une incubation pendant 5 min à 25°C ensuite 200  $\mu$ l d'un substrat (0,04 mg/ml) préparé dans un tampon (10 mM) contenant 0,0008 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été ajoutés, après incubation pendant 20 min, la réaction enzymatique a été enregistrée à 450 nm et exprimée en pourcentage d'inhibition (Eq. (2)).

## II.7. Analyse infrarouge

L'analyse infrarouge est une méthode appliquée dans la détermination d'un composé en caractérisant leurs groupes fonctionnels (liaisons chimiques) dans un mélange d'extraits.

Les extraits de plantes ont été déposés entre deux plaques de KBr et les spectres ont été enregistrés dans la plage de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  par un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type Agilent Cary 640.

### II.8. Analyse par GC-MS

L'extrait a été analysé à l'aide d'un système de chromatographie (Shimadzu QP2010 type EI 70 ev) couplé à un spectromètre de masse quadripolaire utilisant une source d'ionisation électronique (EI). Un volume (2  $\mu\text{l}$ ) de l'échantillon a été injecté dans le GC-MS équipée d'un injecteur split et d'une colonne analytique de type SE 30 (25 m ; 0,25  $\mu\text{m}$ ) connectée au système réglé à 93,9 kPa initié à 50°C pendant 1 minute, puis chauffé à 125°C et 250°C à 5°C/min et maintenu pendant 10 minutes en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur (1 ml/min). La MS est utilisée en mode ACQ avec un balayage de  $m/z$  40 à 550,0 et en mode de balayage complet, les spectres de masse enregistrés dans la plage de 40 à 550 ( $m/z$ ) ont été identifiés en comparant avec la base de données de la bibliothèque GC-MS version NIST 08-S construit à partir des standards.

### II.9. Analyse par LC-MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour la caractérisation. Le chromatographe utilisé est le Shimadzu LC-MS 8040 couplé au spectromètre de masse Q-3 scan, utilisant la source d'ionisation Electrospray (ESI). Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon est injecté. La colonne utilisée est une phénomènex C18 à phase inversée. La température du four HPLC a été maintenue à 40°C avec un débit de 0,25 ml/min. La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau acidifiée (0,1 % HCOOH) (éluant A) et d'acétonitrile (éluant B) évoluant selon le gradient suivant : 0-3 min 10 % B ; 3-6 min 30 % B ; 6-10 min 50 % B ; 10-15 min 75 % B ; 15-20 min 100 % B ; 20-24 min 50 % B ; 24-28 min 30 % B ; 28-40 min 10 % B.

### II.10. Encapsulation et formulation à base de particules chargées d'extrait

Dans cette étude, la formulation préparée a été élaborée conformément aux normes et recommandations de la Directive européenne 67/548/CEE ainsi qu'aux lignes directrices établies par le SCCNFP (Comité scientifique pour les produits cosmétiques et les produits non alimentaires).

Le principe de cette formulation est de disperser un volume de la solution mère de l'extrait brut avec un volume d'une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 5 % sous

agitation pendant 30 min. La préparation obtenue est ensuite mélangée à 60 ml de glycérol et conservée dans un flacon opaque. Les paramètres physicochimiques tels que l'aspect, la couleur, le pH, la viscosité, la densité et l'aptitude à l'étalement ont été déterminés.

**Tableau I :** Compositions des formulations préparées.

Les composés	<i>P.lentiscus</i>	<i>P.nigra</i>
L'extrait	2,5 ml	5ml
Polyvinylpyrrolidone 5 %	37,5 ml	35 ml
Glycérol	60 ml	60 ml
Total	100 ml	

### II.10.1. Activité protectrice contre les rayons UVB

Pour évaluer l'activité protectrice de l'extrait contre le rayonnement UVB, la méthode de Mansur et al. (1986) a été adoptée. Brièvement, un volume de chaque formulation préparée a été mesuré par un spectrophotomètre à des longueurs d'onde comprises entre 290 et 320 nm avec des intervalles de 5 nm et les absorbances enregistrées ont été utilisées pour calculer la valeur du facteur de protection solaire selon l'équation suivante (Eq. (3)) :

$$\text{SPF: CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times (\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad (3)$$

EE : effet érythémogène (**Annexe 1**).

$\lambda$  : intensité du rayonnement (**Annexe 1**).

Abs : absorbance de l'extrait

CF : facteur de correction (=10)

### II.10.2. Toxicité cutanée

L'innocuité de formulations réalisées a été évaluée sur des souris de race albinos (n=6) par un test d'irritation primaire cutanée qui consiste à appliquer une dose unique de produit sur la peau et d'observer toutes manifestations pouvant survenir. Dans un premier temps, le dos et les flancs des souris ont été rasés à l'aide d'une tondeuse électrique, Vingt-quatre heures plus tard, un volume de 0,1 ml a été appliqué sur chacun des flancs des animaux sous pansement semi-occlusif.

L'indice d'irritation cutanée a été évalué sur les sites d'application selon l'échelle du test d'irritation cutanée de Draize permettant de coter les érythèmes et la formation d'œdème après 24h, 48h et 72h d'application, exprimée selon l'équation suivante (Eq. (4)) (Merdana et al., 2020).

$$I.P = \sum I.C_{moy} / n \quad (4)$$

I.P : indice d'irritation primaire

$\sum I.C$  : somme des indices moyens d'irritation cutanée obtenus à chaque période

n : nombre de périodes de lecture

**Tableau II** : Echelle du test de tolérance cutanée (l'échelle de draize).

Échelle numérique de lecture des irritations et des œdèmes				Classification des préparations cutanées en fonction de l'indice d'irritation cutanée primaire	
Érythème		Œdème		Classification	Indice d'irritation primaire
Pas d'érythème	0	Pas d'œdème	0	Non irritant	$IP < 0,5$
Léger l'érythème	1	Très léger l'œdème	1	Léger irritant	$0,5 < IP < 2$
Érythème bien visible	2	Léger l'œdème	2	Irritant	$2 < IP < 5$
Érythème important	3	Œdème moyen	3	Très irritant	$5 < IP < 8$
Érythème grave	4	Œdème grave	4		

### II.11. Analyse statistique

Toutes les données expérimentales ont été rapportées en tant que moyennes de trois répétitions  $\pm$  écart-type. Le logiciel GraphPad Prism 5 a été utilisé pour calculer les  $IC_{50}$ , comparé les résultats et les différences entre les moyennes à l'aide du test de la plus petite différence significative (LSD), en prenant la signification à  $p \leq 0,05$ . Les moyennes des traitements ont été comparées par le test t de student, et la différence la moins significative a été calculée pour  $\alpha = 0,05$ .

Pour l'optimisation par la méthodologie de la surface de réponse, la signification des modèles a été vérifiée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA). La signification statistique des coefficients de régression a été vérifiée en effectuant une analyse par le test t de Student. La valeur  $p$  de 0,05 a été fixée comme niveau de signification statistique.

Pour calculer plus précisément les conditions d'extraction et donner les réponses optimisées, le profileur de prédiction JMP a été utilisé.

Chapitre III :  
Résultats et discussions

---

### Résultat et discussion

L'objectif de cette étude était d'optimiser l'extraction des composés phénoliques de deux plantes médicinales, *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*, et d'évaluer les activités biologiques des extraits obtenus, notamment leur activité antioxydante, anti-inflammatoire et leur effet photoprotecteur. De plus, une analyse phytochimique a été réalisée pour identifier les composés présents dans les extraits.

La récolte a été réalisée en mois de mars et juin pour les bourgeons et les feuilles respectueusement, la période durant laquelle la teneur en composés phénoliques est maximale au niveau des feuilles de *P.lentiscus* et des bourgeons de *P.nigra*. Le site choisi est loin de toute pollution et perturbations pouvant changer la composition des échantillons.

#### III.1. Optimisation des variables par le plan de Box-Behnken

L'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal est une étape cruciale pour la valorisation de ces substances bioactives, cette étape dépend principalement du type de solvant ainsi que d'autre paramètre d'extraction à savoir la température et le temps d'extraction. En outre, pour mieux évaluer l'effet des paramètres d'extraction et l'influence des interactions entre ces paramètre sur le rendement d'extraction en composés phénoliques totaux, la méthodologie de surface de réponse générée par le plan de Box-Behnken a été introduit.

Les teneurs en polyphénols totaux (PPT) mesurées selon les essais expérimentaux ont été présentées dans le tableau III. Les taux obtenus varient  $100 \pm 1,87$  à  $117,73 \pm 1,12$  mg EAG/g PS dans les feuilles de *P.lentiscus* et  $30,58 \pm 2,48$  à  $37,51 \pm 1,89$  mg EAG/g PS dans les bourgeons de *P.nigra*. Autrement, ces données confirment que les différentes combinaisons des facteurs étudiés (concentration du solvant, température et temps) ont une influence sur l'extraction des composés phénoliques.

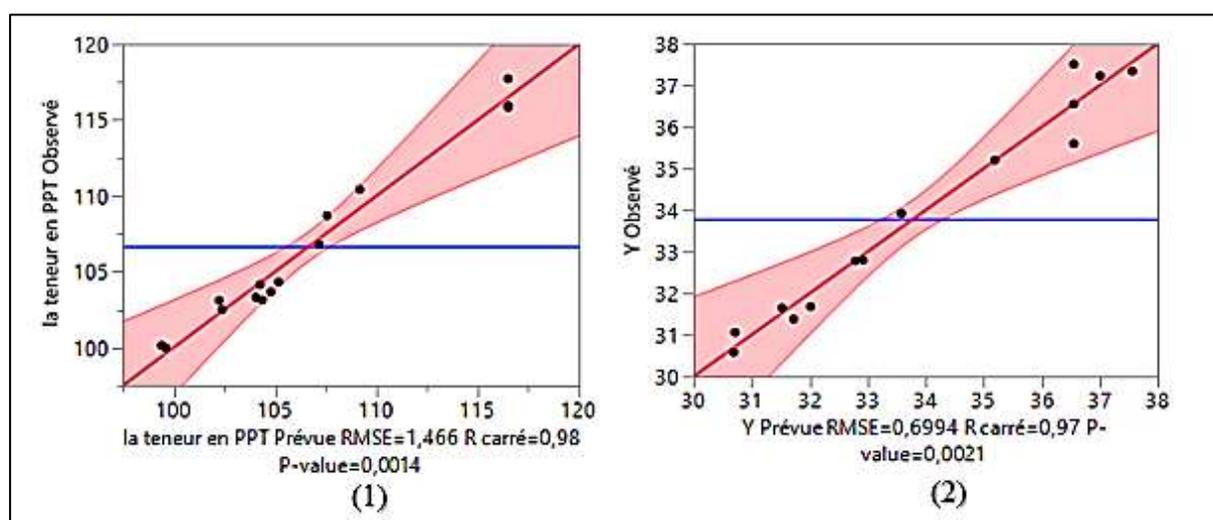
## Chapitre III : Résultats et discussions

**Tableau III :** Matrice du plan de Box-Behnken et valeurs de réponse pour le rendement d'extraction des composés phénoliques totaux.

Exp	<i>Pistacia lentiscus</i>				<i>Populus nigra</i>			
	X1 Solvant	X2 Température	X3 Temps	Y PPT	X1 Solvant	X2 Température	X3 Temps	Y PPT
1	90	45	20	100,15 ± 0,28	45	45	30	32,8 ± 0,54
2	45	50	30	104,16 ± 3,68	45	35	30	31,68 ± 1,8
3	67.5	45	30	115,84 ± 2,67	90	40	20	31,38 ± 0,39
4	67.5	45	30	115,95 ± 0,86	67.5	35	40	32,78 ± 1,58
5	67.5	40	40	108,7 ± 1,65	90	40	40	30,58 ± 2,48
6	90	45	40	103,14 ± 0,5	67.5	40	30	37,51 ± 1,89
7	45	45	40	103,32 ± 0,5	45	40	20	31,65 ± 0,4
8	45	45	20	110,43 ± 1,58	67.5	40	30	36,55 ± 1,34
9	90	50	30	100 ± 1,87	45	40	40	31,06 ± 0,57
10	90	40	30	102,51 ± 0,33	67.5	45	40	37,34 ± 2,069
11	67.5	45	30	117,73 ± 1,12	67.5	35	20	37,23 ± 2,79
12	67.5	50	20	103,68 ± 0,57	67.5	45	20	35,2 ± 0,1
13	67.5	40	20	104,33 ± 0,57	90	45	30	33,92 ± 0,69
14	67.5	50	40	103,11 ± 0,43	90	35	30	31,65 ± 0,86
15	45	40	30	106,8 ± 0,86	67.5	40	30	35,6 ± 0,82

### III.1.1. Modélisation et ajustement du modèle

Le coefficient de détermination  $R^2$  et le  $R^2$  ajusté sont largement utilisés dans l'analyse des données scientifiques pour estimer le pourcentage de réponse expliqué par le plan expérimental.



**Figure 15 :** Courbes graphiques des valeurs observées par rapport aux valeurs attendues, (1)

*P.lentiscus* et (2) *P.nigra*.

Dans la présente étude, le coefficient de détermination  $R^2$  du modèle construit à partir des données de l'extrait de *P.lentiscus* est égal à 0,98 (Figure 15), ce qui signifie que seulement 2 % des variables ne sont pas expliquées et que le modèle est hautement significatif ( $p \leq 0,01$ ). En parallèle, le modèle généré par les résultats d'extrait de *P.nigra* est hautement significatif ( $p \leq 0,01$ ) avec un  $R^2$  égal à 0,97 qui exclut 3 % des variables.

De plus, une valeur du coefficient de détermination ajustée d'ordre  $R^2 = 0,93$  et  $0,92$  est exprimée dans le modèle construit à partir des réponses des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra* respectivement, ce qui est suffisamment élevé pour confirmer la forte significativité du modèle. Sachant que le  $R^2$  ajusté représente la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  après élimination des termes inutiles (coefficient) du modèle. Cela suggère que le modèle était approprié pour décrire le comportement de ces réponses par rapport aux variables indépendantes.

En outre, le RMSE qui est une bonne mesure de précision qui indique l'ajustement absolu du modèle aux données, c'est-à-dire dans quelle mesure les points de données observés correspondent aux valeurs prédites du modèle. Dans cette étude, le RMSE est d'ordre 1,46 et 0,69 dans l'extrait de *P.lentiscus* et *P.nigra* respectivement. Ceci signifie une autre fois que le modèle obtenu est mieux adopté pour évaluer les données observées car des valeurs inférieures du RMSE indiquent un meilleur ajustement.

D'autre part, pour définir l'influence des variables sur le rendement en polyphénols, la méthode des moindres carrés a été appliquée pour calculer les coefficients de régression des paramètres quadratiques et leur interaction. Les effets de tous les facteurs examinés, ainsi que les résultats statistiques du test t de Student et de la probabilité observée (valeur p) servant à établir la signification des coefficients de chaque paramètre, sont synthétisés dans les tableaux IV et V.

Dans l'évaluation de l'influence des paramètres d'extraction sur la teneur en composés phénolique de *P.lentiscus*, Il a été démontré que l'effet linéaire du solvant (X1) était hautement significatif et influençait positivement la réponse. Cela suggère que l'augmentation du pourcentage de solvant produit une augmentation de l'extraction des composés phénoliques. De plus, les termes quadratiques pour le solvant (X1-X1), la température (X2-X2) et le temps (X3-X3) ont montré des effets très significatifs ( $p \leq 0,0001$ ). En outre, un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) a été observé dans l'effet interactif entre le solvant et le temps.

### Chapitre III : Résultats et discussions

L'étude de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des bourgeons de *P.nigra* a révélé que les effets linéaires de la concentration de l'acide lactique (X1) et de la température (X2) présentaient un effet significatif à  $p \leq 0,05$  et  $p \leq 0,001$  respectivement. Cela indique que la concentration du solvant et la température sont des facteurs influençant l'extraction des composés phénoliques des bourgeons de *P.nigra*. Il est à noter des effets significatifs dans les termes quadratiques du solvant (X1-X1) et le temps (X3-X3) pour une probabilité de  $p \leq 0,0001$  et  $p \leq 0,05$  respectivement. De plus, un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) a été rapporté pour l'effet interactif entre la température et le temps (X2-X3).

Il ressort des résultats obtenus que le solvant est un paramètre clé dans l'extraction des composés phénoliques, qui peut être influencé positivement par l'effet de la température et du temps d'extraction.

Selon les analyses de variance (ANOVA), les deux modèles développés étaient hautement significatifs ( $p \leq 0,01$ ) tandis que le manque d'ajustement n'était pas significatif attestant que les erreurs dans l'estimation des valeurs prédites par le modèle mathématique étaient insignifiantes. Cela indique la validation du modèle quadratique pour expliquer les résultats expérimentaux et confirme son utilisation dans l'optimisation des variables d'extraction.

**Tableau IV :** Estimation des coefficients de régression pour le modèle quadratique et analyses de variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux *P.lentiscus*.

Source	Degrée de liberté	Somme des carrés	Moyenne carrés	Rapport f	Prob. > f
Model	9	461,43614	51,27068	23,85750	0,0014*
X1	1	198,28214	198,2821	92,26552	0,0002*
X2	1	13,06691	13,0669	6,08035	0,0568
X3	1	4,20656	4,2066	1,95742	0,2207
X1 * X2	1	0,00422	0,0042	0,00197	0,9664
X1 * X3	1	25,5025	25,5025	11,86694	0,0183*
X2 * X3	1	6,1009	6,1009	2,8389	0,1528
X1 * X1	1	176,66231	176,6623	82,20528	0,0003*
X2 * X2	1	142,94519	142,9452	66,51588	0,0005*
X3 * X3	1	104,878	104,878	48,80229	0,0009*
Défaut d'ajustement	3	8,49433	2,83144		
Erreur pure	2	2,25087	1,12543	2,51587	0,2971
Erreur total	5	10,74519			

### Chapitre III : Résultats et discussions

**Tableau V :** Estimation des coefficients de régression pour le modèle quadratique et analyses de variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux *P.nigra*.

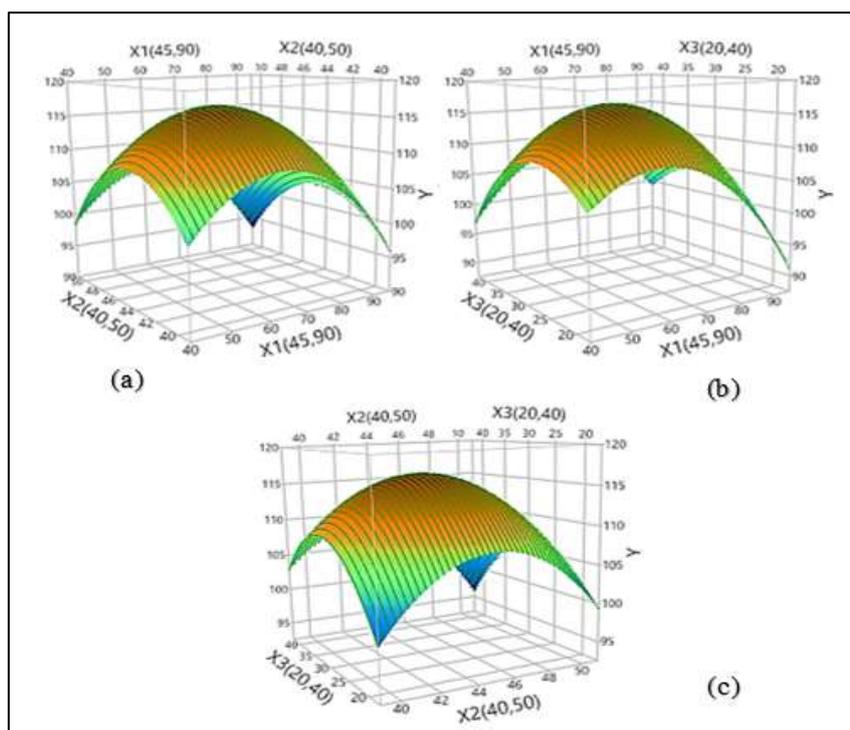
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne carrés	Rapport f	Prob. > f
Model	9	87,903857	9,76710	19,9694	0,0021
X1	1	31,825031	31,825031	65,0681	0,0005*
X2	1	4,572768	4,572768	9,3493	0,0282*
X3	1	1,508073	1,508073	3,0833	0,1395
X1 * X2	1	0,330625	0,330625	0,6760	0,4484
X1 * X3	1	0,011025	0,011025	0,0225	0,8865
X2 * X3	1	10,857025	10,857025	22,1978	0,0053*
X1 * X1	1	66,862416	66,862416	136,7041	<,0001*
X2 * X2	1	0,170016	0,170016	0,3476	0,5811
X3 * X3	1	4,718185	4,718185	9,6466	0,0267*
Défaut d'ajustement	3	0,6214500	0,207150		
Erreur pure	2	1,8240667	0,912033	0,2271	0,8719
Erreur total	5	2,4455167			

#### III.1.2. Analyse de surface de réponse

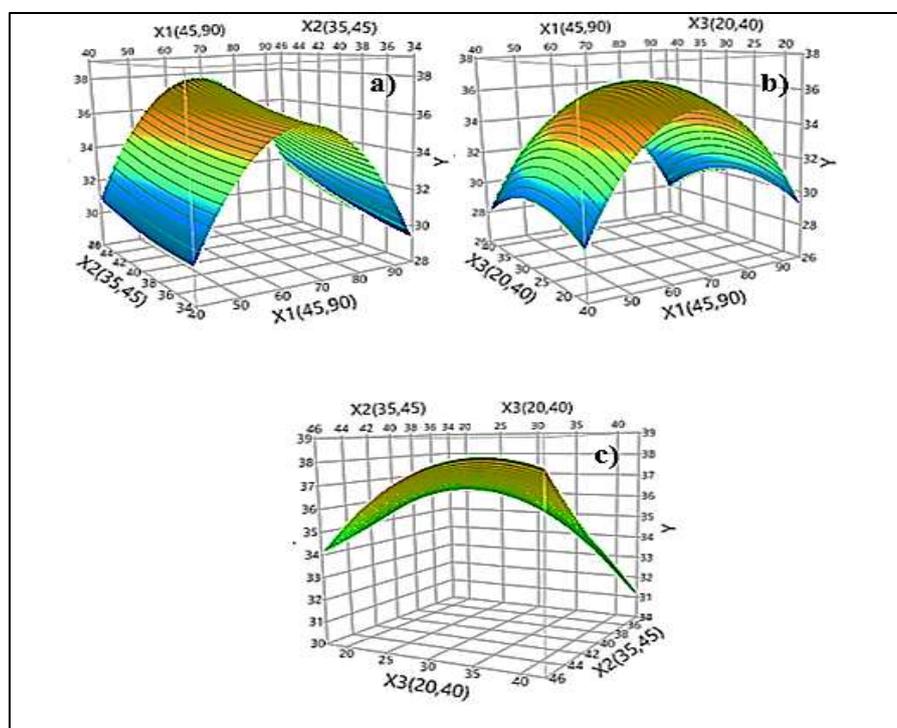
Pour étudier les effets interactifs des variables indépendantes et leur interaction sur le taux d'extraction, des profils de surface de réponse tridimensionnelle avec des modèles de régression non linéaire multiple ont été tracés à l'aide de l'équation suivante (Eq. (5 et 6)) :

$$PL = -0,01366x_1^2 - 0,24888x_2^2 - 0,05329x_3^2 + 0,000288x_1x_2 + 0,01122x_1x_3 - 0,0247x_2x_3 + 1,3898x_1 + 22,83625x_2 + 3,54775x_3 - 487,4195 \quad (5)$$

$$PN = -0,0084x_1^2 + 0,00853x_2^2 - 0,0113x_3^2 + 0,00255x_1x_2 - 0,00023x_1x_3 + 0,03295x_2x_3 + 1,0414x_1 - 1,6996x_2 - 0,6705x_3 + 43,1216 \quad (6)$$



**Figure 16 :** Surfaces des réponses des effets interactifs sur le taux d'extraction des composés phénoliques des feuilles de *P.lentiscus* solvant - température (a), solvant - temps (b) et température - temps (c).



**Figure 17 :** Surfaces des réponses des effets interactifs sur le taux d'extraction des composés phénoliques des bourgeons de *P.nigra*, solvant - température (a), solvant - temps (b) et température - temps (c).

Selon le profil de la surface de réponses générée, il ressort qu'une augmentation de la concentration de l'acide lactique de 45 % à 90 % (v/v), un temps d'extraction de 20 à 40 min avec une température de 40°C à 50°C ont amélioré la teneur en polyphénols dans l'extrait de *P.lentiscus* avec un maximum de  $117,73 \pm 1,12$  mg EAG/g PS récupéré à une concentration d'acide lactique de 67,5 % (v/v) avec une température de 45°C pendant 30 min.

Concernant *P.nigra*, l'analyse des surfaces de réponses montre que dans un intervalle de 45 % - 90 % d'acide lactique pour un temps de 20 - 40 min avec une température de 35°C à 45°C le rendement d'extraction est parfait avec un ordre maximum  $37,34 \pm 2,06$  mg EAG/g PS obtenu avec un pourcentage d'acide lactique 67,5 % pour une température de 45°C pendant 40 min.

Les extractions par solvant sont les procédures les plus utilisées pour préparer des extraits de matières végétales en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité et de leur large applicabilité. Dans la présente étude, l'évaluation de l'influence de la concentration du solvant sur la teneur en composés phénoliques a été estimée dans une gamme de 45 % à 90 % d'acide lactique dans laquelle une teneur maximale est obtenue à 67,5 % d'acide lactique pour les deux extraits. Ceci indique que le mélange acide lactique/eau à 67,5 % (v/v) présente une polarité adéquate qui a permis une solubilisation maximale des polyphénols avec une forte signification ( $p \leq 0,001$ ). En général, l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques dépend principalement de leur solubilité ainsi que de la nature chimique de l'échantillon végétal et de la polarité des solvants utilisés (Dai et Mumper, 2010).

Par ailleurs, l'influence du temps d'extraction sur le contenu des composés phénoliques a été clairement rapportée dans les figures 16 et 17. Les teneurs ont augmenté progressivement jusqu'à l'obtention d'un optimum à 30 min pour les deux extraits, puis une phase de déclin a été enregistrée au-delà de cette durée, ce qui indique qu'une extraction incomplète a été obtenue à un temps court, alors qu'un temps d'extraction plus long peut générer des réactions indésirables et une extraction moins sélective. En effet, des études antérieures ont montré qu'un temps trop long augmente l'oxydation des polyphénols. Ceci aurait pour conséquence une diminution du rendement d'extraction (Lavilla et Bendicho, 2017).

D'autre part, le rendement des composés phénoliques de *P.lentiscus* est significativement ( $p \leq 0,05$ ) augmenté de 40 à 50°C dont le meilleur rendement est obtenu à une température de 45°C, En revanche, la teneur en composés phénoliques de *P.nigra* a augmenté de 35°C à

45°C et le meilleur rendement a été observé à une température de 40°C. cela indique une forte solubilité du composé phénolique dans le solvant sous l'effet de la chaleur qui pourrait s'expliquer par la plus grande solubilité des polyphénols dans le solvant, la diffusivité élevée a permis un meilleur transfert de masse à une température de 40°C et 45°C. Il a été rapporté qu'une augmentation de la température d'extraction provoquait une rupture des liaisons matricielles de la structure membranaire des cellules végétales et ainsi faciliter le processus d'extraction. (Lavilla et Bendicho, 2017). En outre, la viscosité et la tension superficielle du solvant ont diminué à une température plus élevée, permettant au solvant d'atteindre les matrices d'échantillons (Dai et Mumper, 2010).

Bien qu'une augmentation de la température soit positive en termes de solubilité, un contrôle complet est nécessaire pour éviter tout problème de thermolabilité et de réactions indésirables et de contrôle de la cavitation. Généralement, des températures inférieures à 60°C sont utilisées cependant, dans certains cas, des températures plus élevées ont été appliquées, par exemple 85°C (Lavilla et Bendicho, 2017).

Ces résultats ont montré que le couple température-temps est un paramètre à une forte influence significative qui peut influencer la teneur en composés phénoliques dans le cas d'une extraction assistée par ultrasons.

### III.1.3. Validation et vérification du modèle prédictif

Selon les résultats de la surface de réponse et de la prédiction par les modèles construits, les conditions optimales obtenues sont : acide lactique 63,51 % (v/v), temps d'extraction 29,67 min, température 44,44°C avec une valeur prédite de 116,79 mg EAG/g PS pour l'extrait de *P.lentiscus* tandis que pour l'extrait de *P.nigra* une teneur prédite 37 mg EAG/g PS est obtenue dans les conditions suivantes acide lactique 66,54 % (v/v), temps d'extraction 20 min a température 35°C.

Pour s'assurer que le résultat prédit était cohérent avec la valeur pratique, une nouvelle vérification expérimentale a été effectuée en utilisant les conditions optimales déduites et le rendement d'extraction expérimental des composés phénoliques obtenu est de  $130,17 \pm 4,8$  mg EAG/g PS et  $42,64 \pm 0,16$  mg EAG/g PS chez *P.lentiscus* et *P.nigra* respectivement. Les valeurs réelles sont supérieures aux valeurs prédites, ce qui indique que la réponse du modèle de régression était adéquate pour refléter l'optimisation attendue.

### III.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique des extraits bruts optimisés a révélé la présence de certains composés bioactifs ayant un effet antioxydants et anti-inflammatoires tels que des flavonoïdes, des tanins galliques, des terpénoïdes, des saponines, des coumarines, des glycosides cardiotoniques, des quinones et des protéines. En outre ces résultats démontrent également que *P.lentiscus* se différencie de *P.nigra* par la présence des tanins catéchiques.

D'après les résultats représentés dans le tableau VI, l'utilisation de l'acide lactique comme solvant a montré une meilleure extraction des différentes familles chimiques comparativement aux résultats obtenus par Arab et al. (2015) et Merghache et al. (2018) respectivement dans les extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra*. Cette étude phytochimique montre que les familles de molécules extraites varient en fonction des solvants utilisés.

**Tableau VI :** Analyse phytochimique qualitative des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra*.

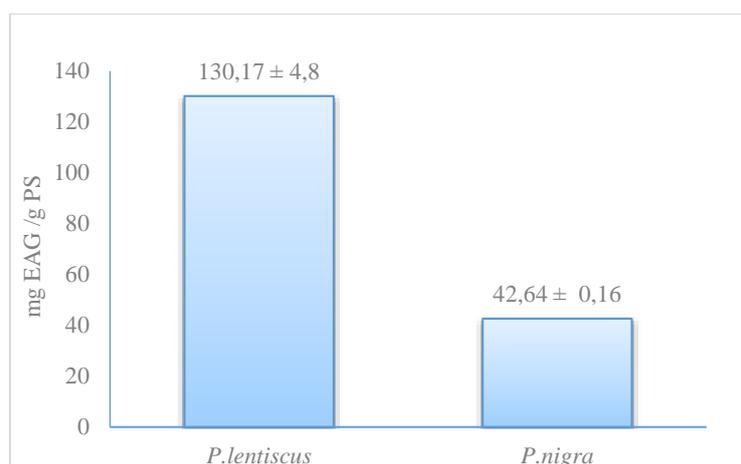
Constituants végétales	<i>P.lentiscus</i>	<i>P.nigra</i>
Alcaloïde	-	-
Flavonoïde	+	+
Tanins galliques	+	-
Tanins catéchiques	+	+
Anthocyane	-	-
Leuco Anthocyanine	-	-
Terpénoïdes	+	+
Saponines	+	+
Protéines	+	+
Coumarines	+	+
Glycosides Cardiotoniques	+	+
Quinones	+	+

### III.3. Détermination des teneurs en composés bioactifs

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tanins et flavonoïdes) sont les éléments phytochimiques qui présentent les effets pharmacologiques les plus importants, ils sont largement utilisés en médecine traditionnelles pour leurs propriétés anti-inflammatoires et protectrices contre les effets délétères de l'irradiation solaire. Leur capacité à contrer les symptômes du vieillissement et à améliorer l'activité antioxydante de l'épiderme les rendent intéressants pour des applications en cosmétologie (Soto et al., 2015).

### III.3.1. Composés phénoliques

Dans la présente étude, les résultats des dosages des composés phénoliques par la méthode de Folin Ciocaltu sont représentés dans la figure 18. Les valeurs obtenues montrent que l'extrait de *P.lentiscus* possède la plus haute teneur en polyphénols d'ordre de  $130,17 \pm 4,8$  mg EAG/g PS par rapport à *P.nigra* ayant montré une teneur de  $42,64 \pm 0,16$  mg EAG/g PS. Cette variation de la teneur en polyphénol varie en fonction de l'espèce.



**Figure 18 :** Teneur en polyphénol totaux des extraits.

La teneur enregistrée par l'extrait de *P.lentiscus* est légèrement inférieure à celle obtenue par Dahmoune et al. (2015) d'ordre  $142,76 \pm 19,98$  mg EAG/g PS. Cette différence peut être expliquée par la variation du solvant utilisé (éthanol 30,99%) comme solvant d'extraction. Une autre étude menée par Detti et al. (2020) en utilisant la combinaison éthanol-ultrasons a révélé une faible teneur d'ordre  $51,3 \pm 1,8$  mg EAG/g PS.

Les teneurs obtenues dans cette étude sont meilleures que celles obtenues par macération dans de l'éthanol des feuilles de *P.lentiscus* ( $95,89 \pm 1,88$  mg EAG/g ps) (Azib et al., 2019). De même, ils sont supérieurs à ceux de Elez et al. (2020) qui ont rapporté des taux de polyphénols de  $108,14 \pm 2,12$  mg EAG/g PS et  $42,71 \pm 0,93$  mg EAG/g PS) à partir des feuilles et fruits de *P.lentiscus* en utilisant la méthode d'extraction assistée par les micro-ondes.

En parallèle, la méthode adoptée pour l'extraction des composés phénoliques de *P.nigra* s'est révélée plus efficace comparativement aux méthodes conventionnelles ( $10,43 \pm 0,20$  mg EAG/g PS et les méthodes classiques ( $31,09$  mg EAG/g PS) (Pietrzak et al., 2017 ; Kus et al., 2018).

De plus, la teneur en composés phénoliques obtenue significativement plus élevée que celle enregistrée dans le bois et l'écorce obtenues par la méthode d'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique (scCO<sub>2</sub>) d'ordre  $17,30 \pm 0,94$  mg EAG/g PS et  $7,00 \pm 0,11$  mg EAG/g PS respectivement. Aussi, le taux obtenu est meilleur que celui obtenu par macération dans les racines et les feuilles à  $17,5 \pm 1,2$  mg EAG/g PS et  $12,1 \pm 0,8$  mg EAG/g PS respectivement (Hachani et al., 2019 ; Ostolski et al., 2021).

Les résultats trouvés dans la bibliographie sur d'autres espèces de *Populus* ont révélé l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée. Golubkina et al. (2022) et Popovic et al. (2016) ont obtenu des taux d'extraction inférieurs à celui obtenu dans cette étude. Des teneurs de 35,7 mg EAG/g PS ont été rapportées pour l'extrait hydroalcoolique de *P.tremula cortex*, 20,93 mg EAG/g PS et 5,18 mg EAG/g PS pour l'extrait hydroalcoolique des feuilles et des racines de *Populus spp* respectivement et 33,1 mg EAG/g PS pour *Salix alba*.

En effet, cette variation du contenu phénolique chez la même espèce peut s'expliquer par plusieurs facteurs, tels que le type du solvant utilisé qui est l'un des facteurs influençant le rendement d'extraction. Bien que les polyphénols sont très solubles dans l'alcool, l'utilisation de l'acide lactique a permis d'exprimer des teneurs plus significative, suggérant l'efficacité de l'application d'acide lactique comme alternative aux solvants organiques. De plus, l'acide lactique est un solvant polaire qui possède de nombreux sites pour établir des liaisons hydrogène avec les composés phénoliques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité. En outre la solubilité des phénols augmente avec l'augmentation de la force acide de la solution. Ce qui permet ainsi à la solution d'acide lactique de dissoudre sélectivement les composés phénoliques. Selon Atayoglu et al. (2023) l'utilisation de l'acide lactique a permis une meilleure extraction des composés phénolique par rapport à l'éthanol dans un échantillon de propolis.

En outre, le contenu obtenu est étroitement lié aussi à la méthode d'extraction. Il a été démontré que l'augmentation du rendement du produit en composés phénolique est due à l'effet des ultrasons. Cet effet est lié aux ondes ultrasonores traversant un milieu liquide induisant une cavitation qui génère une rupture de la paroi végétale et une libération de composés bioactifs permettant ainsi d'enrichir l'extrait (Chemat et al., 2017).

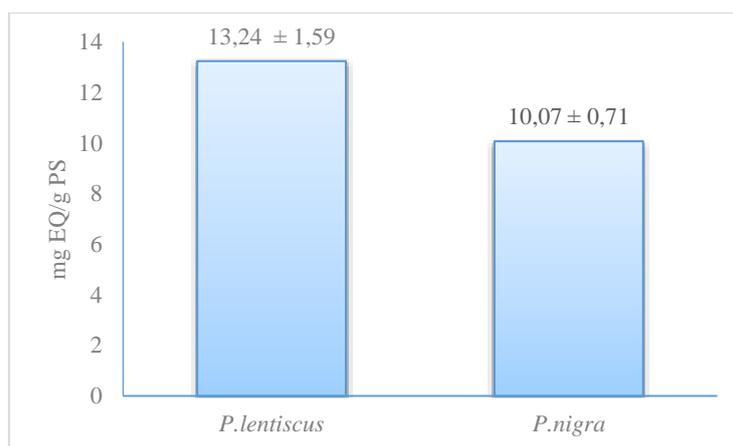
De même, d'autres facteurs peuvent influencer la variabilité du rendement d'extraction tel que la qualité de l'extrait avec la pureté des principes actifs (Tabart et al., 2007), l'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte, la structure chimique, la taille

des particules ainsi que la présence d'interférants (Naczk et Shahidi, 2004). Ainsi qu'il a été rapporté que la durée et les conditions de conservation des extraits influencent la quantité des polyphénols (Özgüven et Tansi, 1998). Pour une meilleure conservation des principes actifs, l'extrait a été conservés à  $-4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### III.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants, anti-inflammatoire et immunosuppresseurs, leur application topique est efficace pour inhiber l'érythème, ils ont été utilisés comme composants de formulations cosmétique pour prévenir ou traiter des érythèmes liés aux UV (Soto et al., 2015).

Les résultats de quantification des flavonoïdes illustré dans la figure 19 ont montré que l'extrait de *P.lentiscus* présente une teneur légèrement supérieur par rapport à l'extrait de *P.nigra* d'ordre  $13,24 \pm 1,59$  mg EQ/g PS et  $10,07 \pm 0,71$  mg EQ/g PS respectivement.



**Figure 19** : Teneur en flavonoïde des extraits.

La teneur obtenue dans l'extrait de *P.lentiscus* est plus élevée que celle rapportée par Dahmoune et al. (2015) obtenue par une extraction assistée par microonde, ultrasons et accélérée par le solvant ( $5,16 \pm 0,22$  mg EQ/g PS ;  $4,61 \pm 0,02$  mg EQ/g PS et  $4,79 \pm 0,03$  mg EQ/g PS). De plus cette méthode d'extraction en utilisant l'acide lactique est plus efficace comparativement aux méthodes d'extraction conventionnelles rapportée par Azib et al. (2019) ; Hajji-Hedfi et al. (2019) ; Cheurfa et Allem, (2015) ; Djebari et al. (2021) d'ordre  $5,18 \pm 0,05$  mg EQ/g PS ;  $18,743 \pm 11,87$   $\mu\text{g}$  EQ/g PS ;  $3,107 \pm 0,014$  ;  $8,218 \pm 0,009$  mg EQ/g PS et  $12,6 \pm 4,1$  mg EQ/g PS respectivement.

Les valeurs enregistrées par Yemmen et al. (2017) pour les fruits et la tige d'ordre  $1,53 \pm 0,40$  à  $9,2 \pm 1,19$  mg EQ/g PS respectivement sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude.

Par ailleurs, le contenu en flavonoïdes dans l'extrait de *P.nigra* est meilleure que celui exprimée dans l'extraits aqueux d'ordre  $5,54 \pm 0,002$  mg EQ/g PS et  $1,52$  mg EQ/g PS rapportés par Pasca et al. (2016) et Olba-Ziety et al. (2022) respectivement. De plus, nos résultats obtenus par la méthode d'extraction assistée par ultrasons sont meilleurs que ceux rapportés par Olba-Ziety et al. (2022) avec la méthode d'extraction supercritique ( $1.33$  EQ/g PS) et ceux rapportés par Ostolski et al. (2021) à partir du bois et l'écorce de *P.nigra* obtenus par scCO<sub>2</sub>  $0,88 \pm 0,04$  ;  $10,28 \pm 0,13$  mg EQ/g PS, scCO<sub>2</sub>-eau  $1,85 \pm 0,03$  ;  $0,95 \pm 0,01$  mg EQ/g PS et eau  $0,49 \pm 0,02$  ;  $1,12 \pm 0,01$  mg EQ/g PS respectivement.

Ces résultats indiquent l'efficacité des ultrasons pour extraire cette classe de métabolites secondaires, la richesse observée peut s'expliquer par la méthode d'extraction, les conditions de conservation et principalement par l'influence du solvant d'extraction, Il a également été démontré que l'efficacité d'extraction de cette classe de métabolite peut être influencée par le degré de polarité du solvant ainsi que la diversité structurale et la nature chimique des composants de la matrice végétale (Dai et Mumper, 2010). En outre, de nombreux flavonoïdes présentent une solubilité et une stabilité dépendantes du pH, ce qui peut être l'une des raisons pour lesquelles nous avons obtenu une meilleure extraction dans la solution acide lactique comparativement aux méthodes d'extraction par l'éthanol citées précédemment. Selon une étude récente menée par Atayoglu et al. (2023) l'analyse LC-MS/MS de l'extrait obtenu avec l'acide lactique a révélé des teneurs significativement plus élevées en flavonoïdes par rapport à celle obtenu par l'éthanol

Les valeurs de différentes parties renouvelables (bourgeons de *P.nigra* et feuilles de *P.lentiscus*) ont montré que ces dernières sont une source précieuse de flavonoïdes.

### III.3.3. Tanins

Les tanins sont l'un des polymères les plus étudiés et suscitent un intérêt croissant de la part des chercheurs en raison de leurs diverses activités connus comme inhibiteurs de la pigmentation et du stress oxydatif déclenché par les UVB (Sun et al., 2021).

L'étude phytochimique, a révélé la présence des tanins hydrolysables et les tanins catéchiques ( $129,09 \pm 3,23$  mg EAT/g PS ;  $52,25 \pm 0,78$  mg EC/g PS) dans les feuilles de *P.lentiscus*. Alors que l'extrait de *Populus nigra* contient des tanins hydrolysables ( $6,75 \pm 0,77$  mg EAT/g PS).

**Tableau VII :** Teneur en tanins des extraits.

Espèces	Tanins hydrolysables (mg EAT/g PS)	Tanins condensés (mg EC/g PS)
<i>P.lentiscus</i>	129,09 ± 3,23	52,25 ± 0,78
<i>P.nigra</i>	6,75 ± 0,77	-

La teneur des tanins hydrolysables de *P.lentiscus* obtenue est significativement différentes à celles exhibées par les méthodes conventionnelles pour les différentes parties (feuilles, fruits, tige) utilisant des solvants méthanol, éthanol et eau qui varie de  $0,88 \pm 0,70$  à  $10,10 \pm 1,53$  mg EAT/g PS (Yemmen et al., 2017). Ces résultats confirmant d'une part l'efficacité de la méthode d'extraction et montrent l'intérêt d'une exploitation des feuilles comme sources de tanins en cosmétologie.

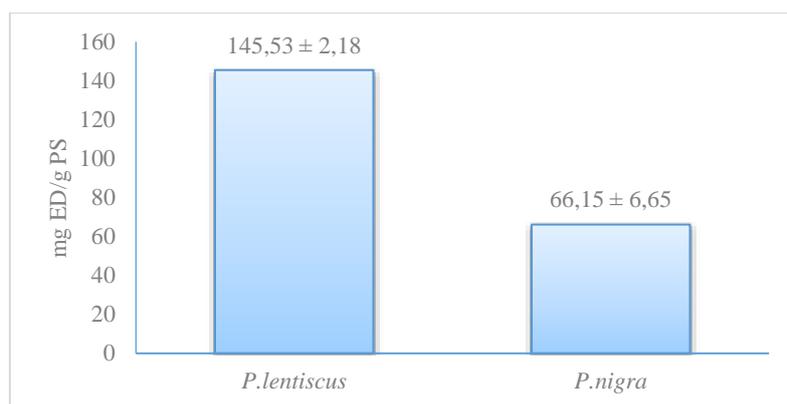
Cependant, l'extrait de *P.nigra* a révélé un contenu en tanins hydrolysable inférieure à celui exprimée par Hachani et al. (2019) dans les extraits aqueux de différentes parties de *P.nigra*, les feuilles ( $10,9 \pm 0,6$  mg EAT/g PS), l'extrait de racine ( $11,7 \pm 0,8$  mg EAT/g PS) et l'extrait de litière ( $15,9 \pm 1,1$  mg EAT/g PS).

La variation du contenu en tanins peut être attribuée à plusieurs facteurs, on cite, le solvant d'extraction, les conditions d'extraction, la nature chimiques des composés, la sensibilité des tanins à l'oxydation et à la lumière, le cultivar, les conditions culturelles, les caractéristiques de site de croissance (climatiques, pédologiques ou le stress de prédation) ainsi que le stade de maturité (Mahmoudi et al., 2013).

En effet, il a été démontré que les teneurs en tanins diminuent progressivement avec la maturation, cette diminution peut être expliquée par les changements des composés phénoliques entre les étapes de maturité (Alarcão-E-Silva et al., 2001).

### III.3.4. Saponines

Outre les composés phénoliques, le dosage en saponine est exprimée dans la figure 20 en milligramme d'équivalent de diosgénine par gramme de poudre sèche avec un rendement élevé dans l'extrait de *P.lentiscus* d'environ  $145,53 \pm 2,18$  mg ED/g PS par rapport à l'extrait de *P.nigra* ( $66,15 \pm 6,65$  mg ED/g PS).



**Figure 20 :** Teneur en saponine totaux des extraits.

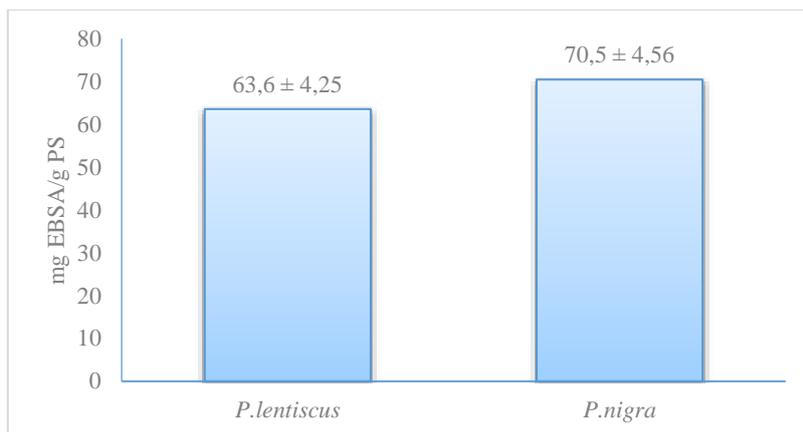
L'importance biologique de cette classe de composés naturels réside dans l'activité anti-inflammatoire. Il a été démontré que les saponines accélèrent la néovascularisation dans les brûlures de la peau de souris et augmentent le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire avec l'activation de l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , qui est l'une des cytokines inflammatoires connues pour induire l'accumulation des macrophages dans les plaies cutanées, impliquant une cicatrisation rapide (Kim et al., 2011). Dans ce contexte, la richesse de l'extrait en saponine favorise ses applications dermo-cosmétiques, voir contre les brûlures induites par les UV. Les résultats obtenus sont supérieurs à ceux trouvés dans la bibliographie par Mebirouk-Boudechiche et al. (2014) et Bettaieb et al. (2012) dans l'extrait de *P.lentiscus* (16,38 mg ED/g PS) et *P.nigra* (19,5 mg ED/g PS) respectivement.

### III.3.5. Protéines totaux

L'hydrolysat de protéines est un autre métabolite utilisé depuis longtemps dans les produits de soins personnels pour la peau et les cheveux, et il a été démontré que l'application topique peut améliorer l'hydratation, l'élasticité et l'apparence de la peau (Barba et al., 2008).

Les résultats de dosage des protéines par la méthode Bradford représentés dans la figure 21 et exprimés en milligramme d'équivalent de sérum bovine albumine par gramme de poudre sèche ont montré que les bourgeons de *P.nigra* et les feuilles de *P.lentiscus* sont riches en protéines (70,50  $\pm$  4,56 mg EBSA/g PS et 63,60  $\pm$  4,25 mg de EBSA/g PS respectivement). Ce qui plaide en faveur d'une valorisation en cosmétologie.

De plus, les échantillons récoltés peuvent être considérés comme un déchet de biomasse riche en protéines par rapport aux déchets alimentaires comme les pelures de *Cucumis sativus* (63,59  $\pm$  0,13 mg EBSA/g PS), pelures de *Solanum tuberosum* (46,50  $\pm$  0,20 mg EBSA/g PS), pelure d'oignon (38,07  $\pm$  0,86 mg EBSA/g PS) et le zeste d'ail (33,17  $\pm$  0,33 mg EBSA/g PS) (Biswas et al., 2021 ; Saha et al., 2022).



**Figure 21** : Teneur en protéine des extraits.

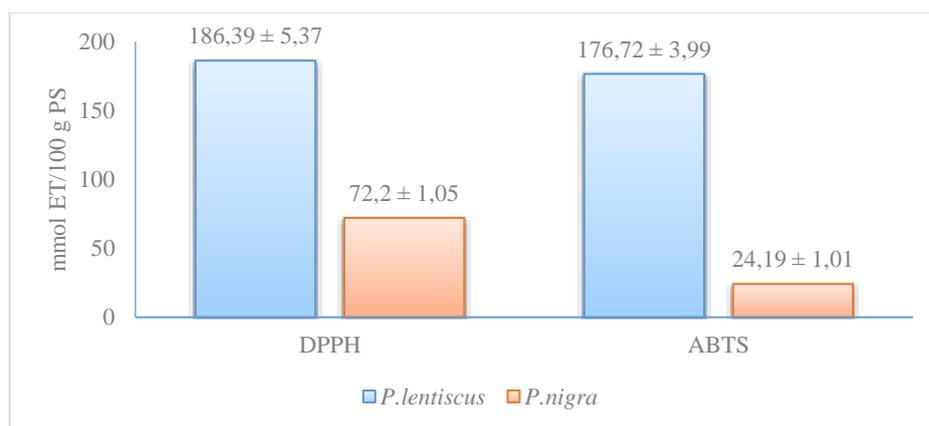
### III.4. Activité antioxydante

La recherche de la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important, pour lutter contre les effets du stress oxydant, pour cela beaucoup de tests standardisés qui sont simples, peu coûteux et rapides permettant l'évaluation de l'activité antioxydant ont été mis en œuvre. Dans le cadre de cette étude, plusieurs tests *in vitro* ont été sélectionnés pour évaluer l'activité antioxydant des extraits.

#### III.4.1. Activité scavenging du radical DPPH• et ABTS•+

DPPH• et ABTS•<sup>+</sup> sont des radicaux largement utilisés pour évaluer l'activité antioxydante. La capacité à éliminer ces radicaux libres est proportionnelle à la concentration de la substance antioxydante contenue dans l'extrait brut. Dans ce test en présence de tels antioxydants donneurs d'hydrogène ou d'électron, la réduction de ces radicaux se traduit par une décoloration détectée par un spectrophotomètre et les potentiels des extraits contre ces radicaux sont représentés dans la figure 22 en milligramme d'équivalent de trolox par 100 grammes de poudre sèche.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire indique que les deux extraits possèdent une bonne capacité de neutralisation du radical libre DPPH• et ABTS•<sup>+</sup> avec un potentiel d'inhibition plus importante exprimé dans l'extrait de *P.lentiscus* d'ordre 186,39 ± 5,37 mmol ET/100g PS et 176,72 ± 3,99 mmol ET/100g PS respectivement. Cependant les bourgeons de *P.nigra* ont montré un potentiel qui correspond à 72,20 ± 1,05 mmol ET/100 g PS et 24,19 ± 1,01 mmol ET/100 g PS contre le radicale DPPH• et ABTS•<sup>+</sup> respectivement. Bien que les extraits sont riches en composés phénoliques responsables du potentiel antioxydant. La variation du potentiel anti radicalaire dans les tests DPPH et ABTS est due à la variation de la teneur et la nature des composés phénoliques de chaque extrait.



**Figure 22 :** Activité anti radicalaire des extraits.

Selon Dawidowicz et al. (2006), cette activité est étroitement liée aux substances antioxydantes, en particulier au nombre de groupes hydroxyles sur le cycle phénolique via un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène qui neutralise les radicaux libres. En outre, les données rapportées dans la littérature ont affirmé que le potentiel anti-radicalaire est lié à la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons, une double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Van Acker, 1996).

La capacité anti radicalaire enregistré par l'extrait de *P.lentiscus* est meilleures que celle obtenue par Piluzza et al. (2011) avec un potentiel d'environ  $164,37 \pm 18,35$  mmol ET/100g PS et  $131,14 \pm 2,22$  mmol ET/100g PS mais restent inférieur à celle rapporté par Bullitta et al. (2013) avec un potentiel de  $214,91 \pm 15,85$  mmol ET/100g PS et  $201,44 \pm 5,76$  mmol ET/100g PS contre le radical DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> respectivement.

Les bourgeons de *P.nigra* sont la source principale de la propolis, des échantillons de la propolis ont montré une faible activité antioxydante ( $4,92 \pm 0,01$  et  $12,16 \pm 0,20$  (mmol ET/100g PS) contre le DPPH<sup>•</sup> et l'ABTS<sup>•+</sup> respectivement

Cette variabilité de l'activité anti-radicalaire au sein de la même espèce peut être associée à la méthode et à la nature du solvant d'extraction. Il a été démontré par Saifullah et al. (2020) que la nature du solvant dans l'extraction assistée par ultrasons peut influencer significativement la teneur en composés phénoliques et permet un enrichissement des extraits en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux contrairement à d'autre méthode d'extraction. De plus, l'activité de ces molécules est étroitement liée à leur structure. Ainsi, la capacité du phénol à céder un atome H dépend de la délocalisation électronique du radical phénol,

l'encombrement stérique des groupements substituant des atomes d'hydrogène du noyau aromatique et de l'énergie de dissociation homolytique, sachant que plus l'énergie de dissociation homolytique d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'hydrogène est élevé (Dangles, 2006).

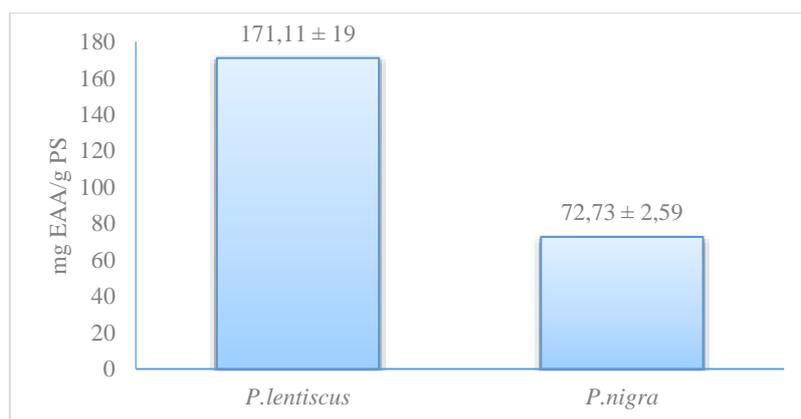
Précédemment il a été rapporté que cette variabilité peut être liée à la différence de polarité du solvant utilisé. Ainsi, Pérez-Jiménez et Saura-Calixto, (2006), ont rapporté que le type et la polarité de solvant peuvent affecter le transfert des électrons et le transfert des atomes d'hydrogène impliqués dans les réactions d'oxydo-réductions qui présentent des aspects essentiels de la mesure de la capacité antioxydante des échantillons.

Selon Boeing et al. (2014) les capacités antioxydantes des extraits sont fortement associées au solvant utilisé principalement et dépend de la polarité des composés. De plus, Wijekoon et al. (2011) ont montré également que la modification de la polarité du solvant, entraîne une modification du type d'antioxydant dissout dans celui-ci.

Ces résultats suggèrent que les extraits obtenus exhibent un potentiel antioxydant capable d'inhiber les espèces réactives de l'oxygène et à améliorer le système de défense contre le stress oxydatif causé par les photo-dommages. Dans cette étude, la méthode d'extraction adoptée est un processus alternatif pour préserver les propriétés antioxydantes de l'extrait. Ces composés doivent être explorés comme de nouveaux antioxydants naturels capables de prévenir le stress oxydant induit par les UVB.

#### III.4.2. Activité scavenging du radical hydroxyle

L'inhibition du radical hydroxyle par les extraits (Figure 26) a montré un potentiel antioxydant de l'extrait de *P.lentiscus* ( $171.11 \pm 19$  mg EAA/g PS) supérieur à celui exhibé par l'extrait *P.nigra* ( $72.73 \pm 2.59$  mg EAA/g PS). Des études antérieures ont déjà soulignées la capacité antioxydante des *P.lentiscus* (Gori et al., 2020) et *P.nigra* (Debbache et al., 2014).



**Figure 23 :** Activité d'inhibition du radical hydroxyle.

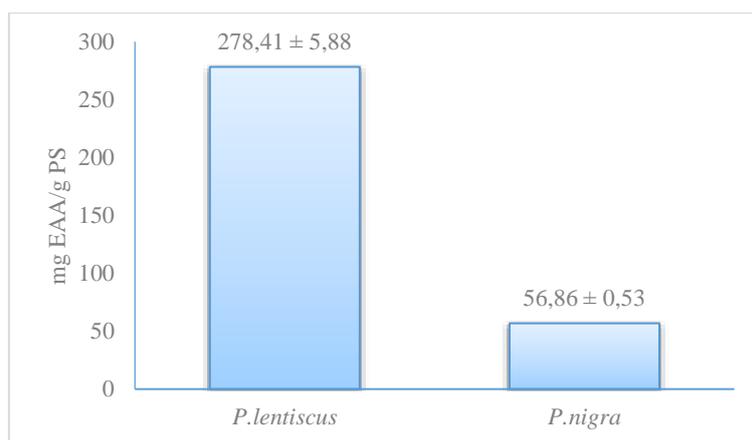
Selon les données rapportées dans la littérature, la capacité des composés phénolique à piéger les radicaux hydroxyles dépend de la mobilité de l'hydrogène phénolique. De ce fait, les antioxydants efficaces ont des liaisons à faible énergie au niveau du groupe donneur d'hydrogène.

Les résultats obtenus ont révélé une activité chélatrice des extraits et un potentiel inhibiteur du radical hydroxyle. Ainsi les extraits sont capables d'inhiber ou interférer avec les réactions de peroxydation lipidique.

### III.4.3. Pouvoir réducteur de fer

Le pouvoir réducteur de Fe (III) est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance et l'un des mécanismes d'actions des antioxydants. Cette activité peut être mesurée par une réaction d'oxydoréduction provoquant la réduction de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . La quantité du complexe de  $Fe^{2+}$  peut être surveillée en mesurant la formation de la coloration bleue à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation des capacités réductrices (Oyaizu, 1986).

Le potentiel réducteur des extraits a été exprimé en milligramme d'équivalent acide ascorbique par gramme de poudre sèche (Figure 23) avec une meilleure efficacité enregistrée dans les feuilles de *P.lentiscus* ( $278,41 \pm 5,88$  mg EAA/g PS), cependant l'extrait de *P.nigra* a montré un potentiel qui correspond à  $56,86 \pm 0,53$  mg EAA/g PS.



**Figure 24 :** Pouvoir réducteur des extraits.

Les valeurs obtenues sont meilleures comparées à celle rapportées par Yemmen et al. (2017) pour les extraits de feuilles, les fruits et les tiges de *P.lentiscus* ( $35,42 \pm 1,61$  ;  $15,32 \pm 0,87$  et  $6,03 \pm 0,68$  EAA mg/g PS) respectivement. Aussi, les résultats de notre étude sont plus élevés que ceux obtenus par Popović et al. (2016) pour les feuilles et les racines de *P.nigra* hybridé qui varie de 7,64 à 10,51 mg EAA/g PS et 2,15 à 2,69 mg EAA/g PS respectivement.

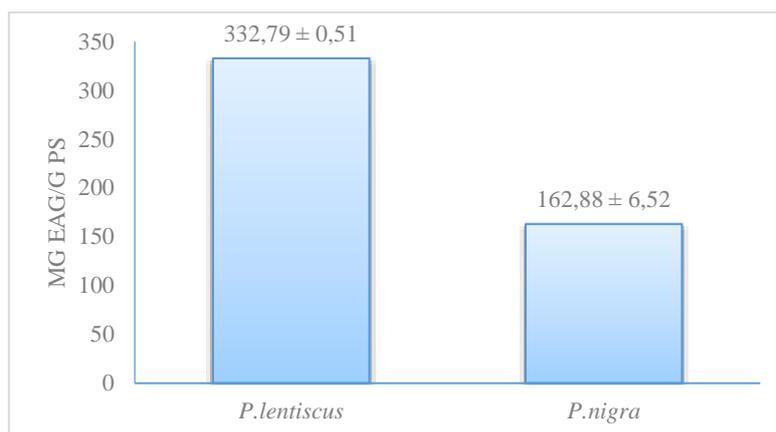
Ces différences d'activité pourraient être liées à la richesse des extraits obtenus dans cette étude en composés phénoliques et flavonoïdes doués d'un potentiel réducteur et antioxydant.

De même, Yen et al. (1993) ont associé l'activité antioxydante à l'effet réducteur des extraits. Parallèlement, Siddhurajub et al. (2007) ont montré que les plantes riches en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont exhibé un grand pouvoir réducteur. L'activité antioxydante est liée à la présence de groupements donneurs d'électrons comme OH qui réduisent le potentiel redox des composés phénoliques. Il a été rapporté que les composés riches en composés à noyaux aromatiques substitués par des groupements OH exhibaient un potentiel antioxydant très significatif. En outre, le potentiel d'ionisation est un caractère déterminant du pouvoir réducteur, sachant que plus le potentiel d'ionisation d'un phytochimique est faible, plus son caractère réducteur est élevé qui permet ainsi de subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant (Perron et al., 2008)

#### III.4.4. Pouvoir réducteur de molybdate

L'activité antioxydante totale des extraits testés est évaluée par la réduction de phosphate-Mo (VI) en phosphate Mo (V) traduit par la formation subséquente d'un complexe phosphate/Mo (V) coloré en vert bleuâtre à un pH acide (Yemmen et al., 2017). Les résultats exprimés dans la figure 24 en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de

poudre sèche indiquent que l'extrait de feuille a une capacité antioxydante significativement plus élevée ( $332,79 \pm 0,51$  mg EAG/g PS) comparé à l'extrait des bourgeons de *P.nigra* qui a montré une capacité antioxydante de  $162,88 \pm 6,52$  mg EAG/g PS. Ces résultats sont plus importants comparés à ceux rapportés par Yemmen et al. (2017) dans les extraits de feuilles, les fruits et les tiges de *P.lentiscus*  $113,23 \pm 1,08$  ;  $39,81 \pm 0,91$  et  $13,03 \pm 0,77$  mg EAG/g PS respectivement.



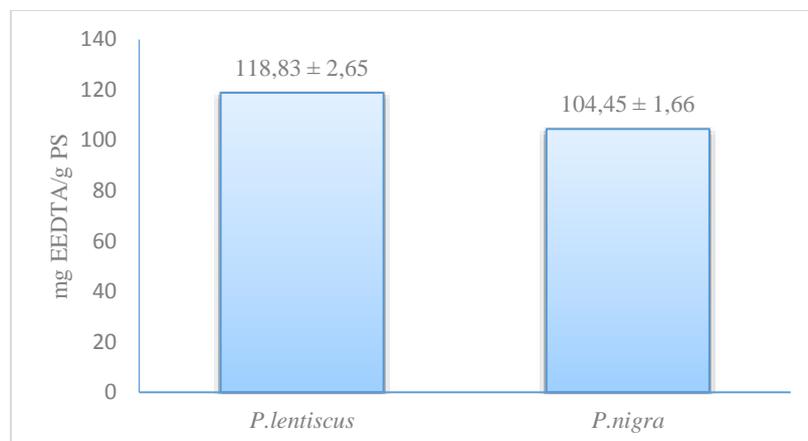
**Figure 25 :** Activité antioxydante totale des extraits.

En effet, cette variation est étroitement liée à la teneur en composés phénoliques, Selon Razali et al. (2008), les plantes avec des niveaux élevés en composés phénoliques ont exhibé un potentiel antioxydant élevé. Les résultats sont comparables aux résultats obtenus, l'extrait de *P.lentiscus* qui a révélé une capacité antioxydante significative contient une teneur élevée en composés phénoliques. Cette activité est étroitement liée à un mécanisme de transfert d'électrons vers le complexe oxydant (phosphomolybdate). En outre, ce transfert d'électron dépend principalement du potentiel redox, du pH du milieu et de la teneur et la structure des composés antioxydants, en particulier le degré et la position des groupements hydroxyles sur le noyaux aromatiques (Prieto et al., 1999).

#### III.4.5. Pouvoir chélateur des ions ferreux

Pour évaluer le potentiel antioxydant d'un extrait de plante ou molécule, plusieurs méthodes doivent être utilisées, on cite le pouvoir chélateur des ions métalliques pour prévenir les oxydations liées au radical hydroxyle autant un puissant inducteur de la peroxydation lipidique qui est un facteur de cause des pathologies humaines comme l'inflammation, athérosclérose et le vieillissement (Shahidi et al., 2015).

Dans cette étude, le pouvoir chélateur (Figure 25) de l'extrait de *P.lentiscus* ( $118,83 \pm 2,65$  mg EEDTA/g PS) a montré un potentiel plus élevé comparativement à celui de l'extrait de *P.nigra* ( $104,45 \pm 1,66$  mg EEDTA/g PS).



**Figure 26 :** Activité chélatrice du fer par les extraits.

Les résultats obtenus sont meilleurs à ceux rapportés par certaines plantes utilisées dans l'industrie cosmétique comme les noyaux d'olive ( $8,14 \pm 0,41$  mg EEDTA/g PS), cannelle ( $1,32 \pm 0,05$  mg EEDTA/g PS) ; clou de girofle ( $3,37 \pm 0,08$  mg EEDTA/g PS), anis étoilé ( $0,63 \pm 0,15$  mg EEDTA/g PS), curcuma ( $2,16 \pm 0,08$  mg EDTAE/g PS), (Djemaa -Landri et al., 2021 ; Ali et al., 2021).

En effet, l'activité exprimée par nos extraits peut être attribuée à la présence des composés phénoliques principalement et les flavonoïdes. Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques médié par les groupements hydroxyle et carboxylate (Brown et al., 1998). Tandis que les flavonoïdes leur mode d'action est médié par la présence du noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Van Acker, 1996). En outre, Il a été rapporté que les composés avec des structures a deux ou plusieurs des groupes fonctionnels : -OH,-SH,-COOH,-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>,- C=O,-NR<sub>2</sub>,-S- et -O- dans une configuration favorable structure-fonction peut montrer une activité chélatrice de métal (Gülçin et al., 2010).

L'analyse des résultats de l'activité antioxydante a révélé que les extraits ont exercé une activité réductrice du molybdate et du fer. Ils ont également présenté une importante activité antiradicalaire vis-à-vis de plusieurs radicaux libres à savoir : le radical DPPH, le radical ABTS, le radical hydroxyle.

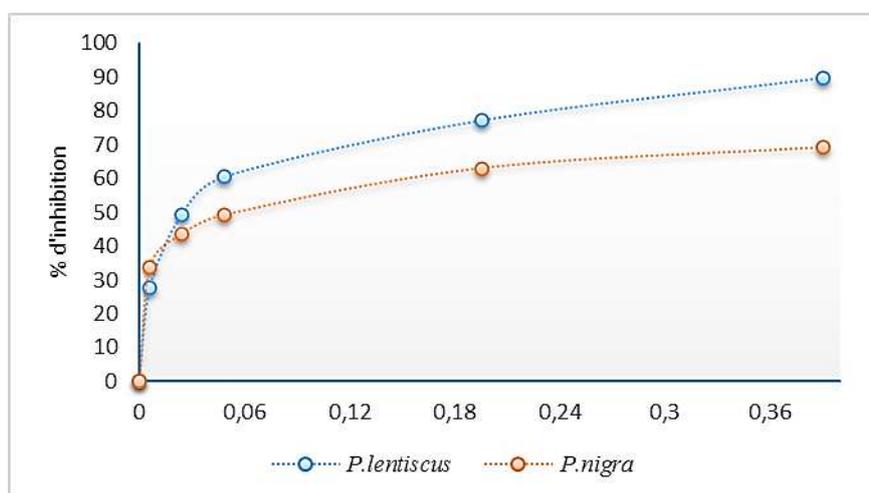
### III.5. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse immunitaire de l'hôte liée à une surproduction des espèces réactives oxygénées entraînant ainsi des lésions cellulaires et tissulaires, cette dernière est initiée par des médiateur pro-inflammatoire tel l'oxyde nitrique et les enzymes inflammatoire (cyclooxygénase et myéloperoxydase).

#### III.5.1. Activité scavenging du radical d'oxyde nitrique

Le radical oxyde nitrique est un médiateur chimique pro-inflammatoire qui peut être impliqué dans le développement de dommages physiopathologiques. Selon Mowbray et al. (2008), il a été montré que l'expression de quantités significativement plus élevées et plus soutenues d'oxyde nitrique suite à une stimulation par des agents tels que des cytokines inflammatoires ou une exposition aux rayonnements UV pouvait être impliquée dans des inflammations cutanées telles que les dermatoses inflammatoires : psoriasis, dermatite atopique et lupus érythémateux.

La figure 27 illustre l'activité scavenging du radical  $\text{NO}^*$  par les extraits (0,0061 à 0,4%). Les résultats révèlent un potentiel d'inhibiteur du radical  $\text{NO}^*$  (27,88 à 89,82 %) pour les feuilles de *P.lentiscus* ( $\text{IC}_{50} = 0,029 \pm 0,005\%$ ) significativement plus élevée que l'activité obtenue par l'extrait de *P.nigra* (33,78 à 69,23%) relatif à une  $\text{IC}_{50}$  de  $0,122 \pm 0\%$ .



**Figure 27** : Pourcentage d'inhibition du radical oxyde nitrique par les extraits.

Les résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Amessis-Ochemouk et al. (2014) pour l'extrait méthanolique de *Pistacia lentiscus* et l'extrait de *Populus nigra* (Debbache al., 2013)

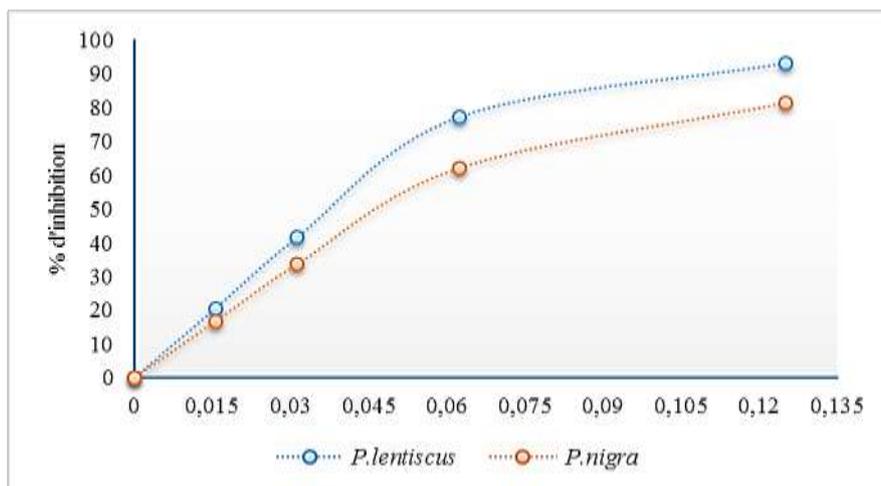
Cette capacité des extraits à réduire la génération du radical NO<sup>•</sup> peut être partiellement attribuée à une action scavenging directe du NO<sup>•</sup> (Balakrishnan et al., 2009) ou liée à la présence de composés inhibant ainsi la formation du nitrite (Sumanont et al., 2004).

En outre, la variation des résultats obtenus peut être expliquée par plusieurs facteurs à savoir la structure des composants chimiques, Selon l'étude rapporté par Cai et ses collaborateurs (2006), sur l'effet des différentes substitutions de structure de base des flavonoïdes sur l'activité scavenging du radical NO<sup>•</sup>, Il a été constaté que certaines modifications structurales, notamment la glycosylation et l'ométhylation de groupe hydroxyle des flavonoïdes, peuvent réduire leurs activités antioxydantes. De plus, l'absence des molécules spécifiques à grande capacité de piégeage du radical ou l'effet pro-oxydant de certaines molécules peuvent influencer d'une manière significative sur l'activité anti oxyde nitrique.

### III.5.2. Activité anti-myéloperoxydase

La myéloperoxydase est une peroxydase héminique de mammifère exprimée principalement dans les granules azurophiles des neutrophiles où elle constitue 2 à 5 % du contenu total en protéines cellulaires (Duclos et al., 2017). Cette enzyme catalyse de manière unique l'oxydation du chlorure en acide hypochloreux en présence du peroxyde d'hydrogène et agit également comme une peroxydase classique à effet anti-microbien par la génération des espèces réactives de l'oxygène et contribue à des processus physiopathologiques comme le stress oxydatif et l'inflammation (Wurtz et al., 2018), qui favorisent le stress oxydatif et l'inflammation, contribuant ainsi à plusieurs processus pathophysiologiques (De Almeida et al., 2023). Par conséquent, la MPO est considérée comme une cible potentielle pour la recherche de nouveaux agents anti-inflammatoires.

Le pourcentage d'inhibition de la myéloperoxydase des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra* testés (0,015 % à 0,125%) est représenté dans la figure 28. Il apparaît clairement que nos extraits exercent une forte activité inhibitrice évalué d'une manière dose dépendante. Cette activité est traduite par un pourcentage d'inhibition de 20,64 à 93,13 % pour les feuilles de *P.lentiscus* (IC<sub>50</sub> = 0,03459 ± 0,0002%) et 16,78 % à 81,29 % pour les bourgeons de *P.nigra* (IC<sub>50</sub> = 0,084 ± 0,0013%).



**Figure 28 :** Inhibition de la myéloperoxydase par les extraits.

Des études antérieures ont démontré que certains médicaments anti-inflammatoires peuvent inhiber l'activité de la MPO (Vieira et al., 2011). Par conséquent, la capacité inhibitrice de la MPO par les extraits montre que ces derniers peuvent être utilisés dans des formulations à potentiel anti-inflammatoire.

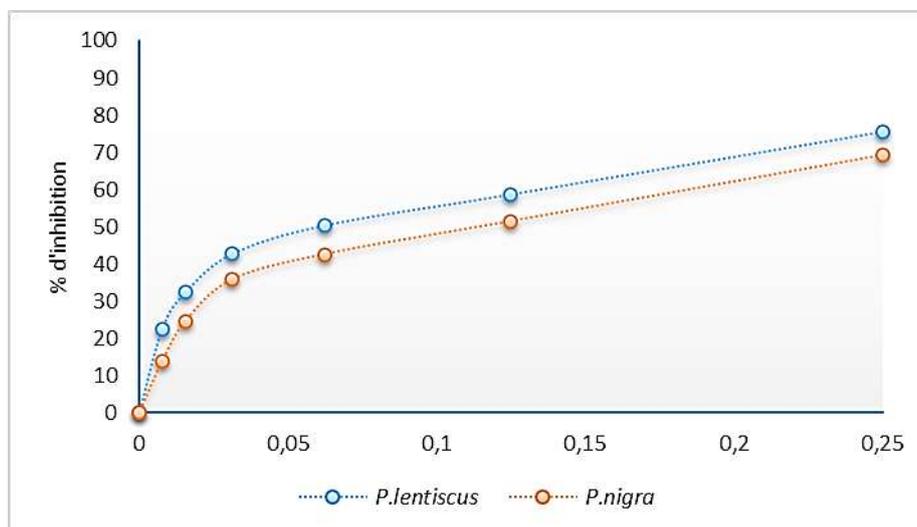
Des composés phénoliques comme la quercétine, la curcumine, l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide gallique caractérisés dans les extraits des feuilles de *P.lentiscus* et les bourgeons de *P.nigra* ont montré un puissant effet anti-inflammatoire sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* (Kato et al., 2003). Ces composés ont été déjà caractérisés dans les extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra* ce qui permet d'attribuer l'activité obtenue à la présence des composés phénoliques.

### III.5.3. Activité anti-cyclooxygénase

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes de la famille des myéloperoxydase qui représente une cible moléculaire de choix pour le traitement de l'inflammation. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme de l'AA qui est libéré de la membrane plasmique par les phospholipases et majoritairement par la PLA2 en produisant ainsi des endoperoxyde cyclique par leur fonction cyclooxygénase puis forment de la PGH2 grâce à la fonction peroxydase de l'enzyme. Également appelées prostanoïdes, sont des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et physiopathologiques qui jouent des rôles divers dans l'inflammation, la fièvre, la douleur ou l'angiogenèse (Chandrasekharan et Simmons, 2004 ; Gonzalez-Periz et al., 2007 ; Howe, 2007).

Anti-COX des extraits évalués à des concentrations allant de 0,007 à 0,25 % est illustrée dans la figure 29. Un effet inhibiteur a été exprimé en pourcentage avec un constat de 22,62

% à 75,64 % pour l'extrait de *P.lentiscus* ( $IC_{50} = 0,1575 \pm 0,0024\%$ ) et 13,95% à 69,19 pour l'extrait de *P.nigra* ( $IC_{50}$  de  $0,1788 \pm 0,0004\%$ ). Encore une fois l'extrait de *P.lentiscus* a exhibé une activité anti-COX plus élevée que celle enregistrée par *P.nigra*.



**Figure 29** : Inhibition de la cyclooxygénase par les extraits.

Les résultats obtenus sont soutenus par l'étude réalisée par Amessis et al. (2014) sur un extrait méthanolique de feuilles de *P.lentiscus*. De plus, L'effet de l'extrait de *P.nigra* s'accord avec les résultats obtenus par Poblocka-Olech et al. (2019) sur trois espèces de *Populus* (*P.nigra* L. *P.berolinensis* et *P.lasiocarpa*).

La variation de l'effet anti-inflammatoire entre l'extrait testés et ceux rapportés dans la bibliographie peut s'expliquer par la méthode et/ou le solvant d'extraction. Des études de relation structure-activité anti-inflammatoire des flavonoïdes ont montré que la double liaison C-2/C-3 et la fonction carbonyle à la position 4 sont des éléments structuraux déterminant l'action inhibitrice de la COX-2 (Aziz et al., 2018). Aussi, des études de modélisation in silico ont rapporté que les flavonoïdes de type flavanones, flavones, flavonols ou isoflavones et dont la structure est pourvue de fonctions hydroxyles se lient aux sites actifs de la COX-2 via des interactions ioniques comparables aux interactions des inhibiteurs synthétiques (Kim et al., 2004).

De plus, les flavonoïdes avec un ortho di-hydroxyl (fragment catéchol) dans les cycles A et B sont de puissants inhibiteurs de la COX-2 comparativement aux flavonoïdes ayant un groupement 3-OH libre. La présence d'une double liaison C2-C3 semble être un déterminant majeur de l'inhibition de la COX (Jachak et al., 2006).

Les résultats obtenus valident l'utilisation traditionnelle des extraits de *P.nigra* comme onguents anti-inflammatoire liée à la présence de flavanones et acides phénoliques. De plus, il a été démontré que les propriétés anti-inflammatoires de *P.lentiscus* pourraient être liées à la richesse des feuilles en polyphénols impliqués dans la cascade inflammatoire, principalement démontrée en relation avec les macrophages en inhibant plusieurs régulateurs clés de la réponse inflammatoire (Milia et al., 2021).

### III.6. Analyse infrarouge

L'analyse infrarouge dans la plage de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$  a révélé de nombreux pics moléculaires correspondant aux bandes d'absorption et de transmission qui répondent à la fréquence des vibrations entre les atomes dans l'extrait (Figure 30 et 31). Les bandes enregistrées dans l'extrait de *P.lentiscus* et *P.nigra* sont représentées dans le tableau VIII et IX respectivement.

Selon les fréquences enregistrées, les composants des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra* présentent des bandes caractéristiques en commun correspondant à différents groupements fonctionnels : le groupement époxy, le groupement C=C, la fonction C=O, le carbonyle et l'alcool, le groupement CH-CH<sub>2</sub>, l'étirement du groupement C=C aromatique, le groupement ester C=O, l'étirement du groupement C=O avec une petite contribution du NH, la fonction C=O, l'étirement du groupe C-H des acides carboxyliques et l'étirement du NH<sub>3</sub> du groupe d'acides aminés libres, et les vibrations liées à l'hydrogène et à l'étirement du groupe hydroxy.

A la base de cette analyse, les extraits issus de cette recherche présentent de nombreux pics d'absorption. La majorité des bandes FTIR ont montré des groupes fonctionnels caractérisés comme phénol, flavonoïdes, alcool, cétone et amine qui jouent un rôle important dans la bioreduction des radicaux libres.

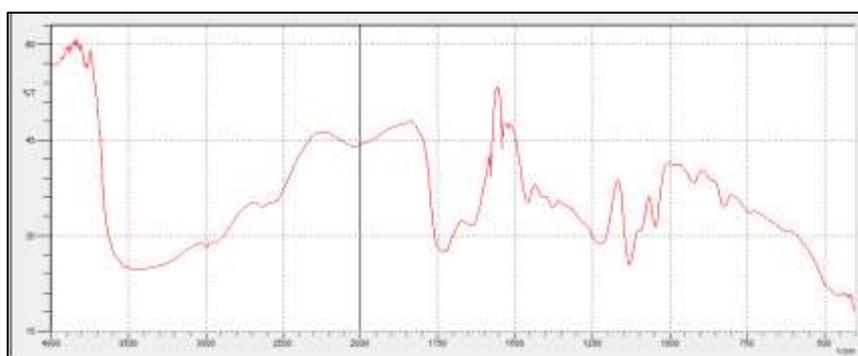
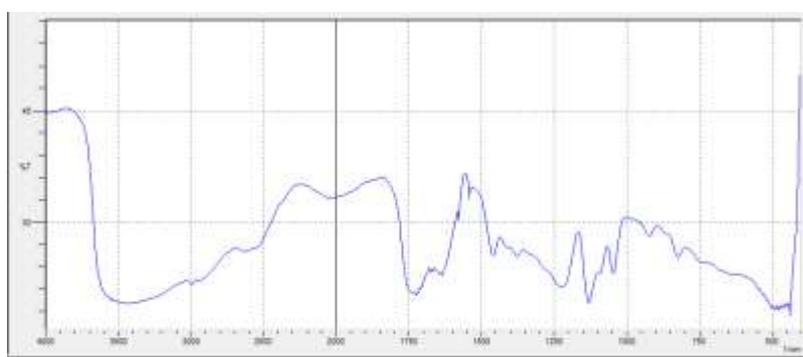


Figure 30 : Spectre infrarouge de l'extrait brut de *P.lentiscus*.

## Chapitre III : Résultats et discussions

**Table VIII :** Résultat des spectres infrarouge d'extrait de *P.lentiscus*.

Fréquences	Transmittance (%)	Groupements
824.31 cm <sup>-1</sup>	34.54	824.3 cm <sup>-1</sup> (C–O–C)
923.81 cm <sup>-1</sup>	38.20	923.85 cm <sup>-1</sup> (C=C)
1044.38 cm <sup>-1</sup>	31.56	1044 cm <sup>-1</sup> (C = O)
1128.79 cm <sup>-1</sup>	25.45	1124.94 cm <sup>-1</sup> carbonyl ou alcool
1222.24 cm <sup>-1</sup>	28.71	1224.33 cm <sup>-1</sup> (CH-CH2)
1379 cm <sup>-1</sup>	34	1379 cm <sup>-1</sup> (C=C) étirement des aromatiques
1460.39 cm <sup>-1</sup>	35.08	1462 cm <sup>-1</sup> (C=O)
1636.24 cm <sup>-1</sup>	31.69	1636 cm <sup>-1</sup> et 1639 cm <sup>-1</sup> (C–O) ou (NH)
1734.72 cm <sup>-1</sup>	27.62	1732.65 cm <sup>-1</sup> C=O
2991.12 cm <sup>-1</sup>	28.08	3000-2800 cm <sup>-1</sup> (C–H) ou (NH3)
3492.72 cm <sup>-1</sup>	24.77	3 500-3 300 cm <sup>-1</sup> (O-H)



**Figure 31 :** Spectre infrarouge de l'extrait brut de *P.nigra*.

**Table IX :** Résultat des spectres infrarouge d'extrait de *P.nigra*.

Les fréquences	La transmittance (%)	Les groupements
824,31	25,14	824,3 cm <sup>-1</sup> (C–O–C)
920,78	28,08	920.39 cm <sup>-1</sup> (C=C)
1044,38	23,27	1044 cm <sup>-1</sup> (C= O)
1131,81	19,16	1124.94 cm <sup>-1</sup> carbonyl ou alcool
1231,29	21,27	1235 cm <sup>-1</sup> (C-O)
1379	25,26	1379 cm <sup>-1</sup> (C=C) étirement des aromatiques
1638,25	22,92	1636 cm <sup>-1</sup> et 1639 cm <sup>-1</sup> (C–O) ou (NH)
1731,71	20,45	1731.9 cm <sup>-1</sup> (C=O)
2991,12	21,74	3000-2800 cm <sup>-1</sup> (C–H) ou (NH3)
3498,76	19,28	3 500-3 300 cm <sup>-1</sup> (O-H)

### III.7. Analyse GC-MS

Dans l'analyse GC-MS, le chromatogramme des composés identifiés est présenté dans les figures 31 et 32, tandis que les pics de masse, les temps de rétention et les composés identifiés

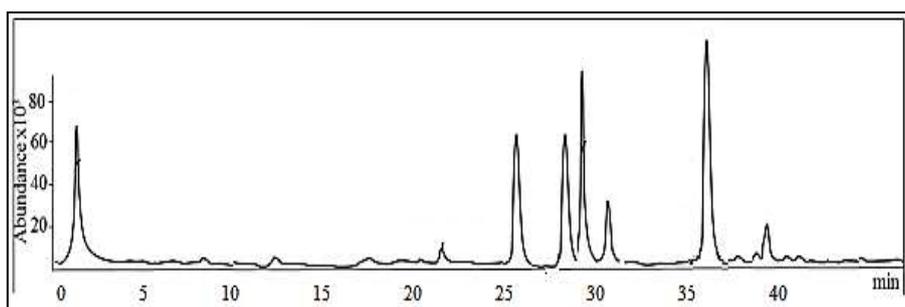
à partir de la base de données de la bibliothèque GC-MS ont été présentés dans les tableaux X et XI.

L'analyse GC-MS de l'extrait des bourgeons de *P.nigra* a mis en évidence la présence de 6 composés phytochimiques tandis que l'extrait de *P.lentiscus* a montré 10 composés avec 5 composés en commun (Figure 31 et 32).

Les principaux composés identifiés par *P.nigra* sont l'acide 1,2-benzènedicarboxylique, l'ester mono(2éthyl-hexyl) (60,82 %), l'ester méthylique de l'acide 9-octadécénoïque (z) (32,80 %), l'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque (4,02 %), ester méthylique de l'acide 8,11-octadécénoïque (z) (1,12 %), ester méthylique de l'acide octadécénoïque (0,85 %), hexatriacontane (0,39 %).

Concernant l'extrait de *P.lentiscus*, es principaux composés identifiés sont l'ester mono(2-éthylhexyl) de l'acide 1,2-benzènedicarboxylique (36,4 %), l'ester méthylique de l'acide 11-octadécénoïque (26,71 %), l'ester méthylique de l'acide (z)-9-octadécénoïque (22,95 %), ester méthylique de l'acide hexadécanoïque (5,18 %), acide 9-octadécénoïque, ester méthylique, (E)- (3,56 %), ester méthylique de l'acide octadécanoïque (1,98 %), acide 1-(+)-ascorbique 2, 6-dihexadécanoate (1,49 %), 1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-, (all-E)- (0,77 %), Acide octadécanoïque (0,55 %), 1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-, (all-E)+ (0,23 %).

Cette étude est le premier rapport caractérisant la présence d'acides organiques dans les bourgeons de *P.nigra* et les feuilles de *P.lentiscus* en utilisant l'acide lactique comme solvant d'extraction. Ceci suggère que l'acide lactique pourrait être un bon solvant vert pour extraire les acides organiques. En outre ces acides organiques identifiés ont déjà démontré de multiples propriétés thérapeutiques telles qu'antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques, nématiques, antivirales, activité anti-inflammatoire et antiproliférative qui mis en évidence la valeur biologique des extraits étudiés.

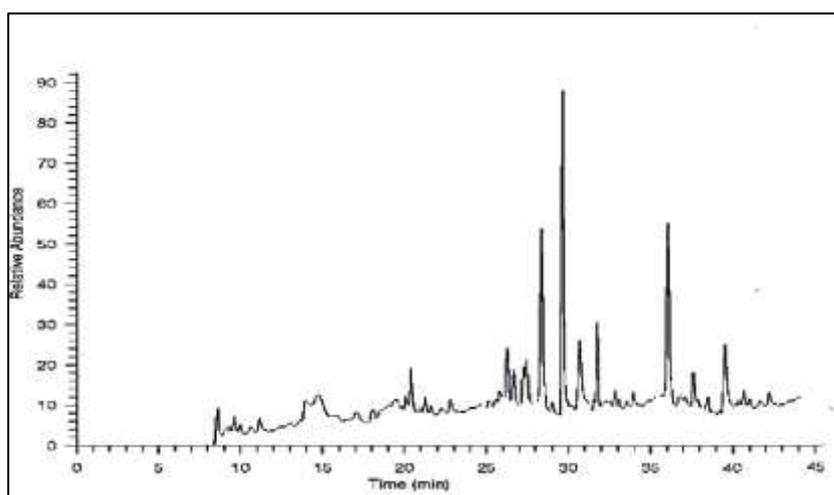


**Figure 32 :** Chromatogramme GC-MS de l'extrait brut de *P.nigra*.

### Chapitre III : Résultats et discussions

**Tableau X** : Identification des composés de l'extrait de *P.nigra* par GC-MS.

Pic	m/z	t <sub>R</sub> (min)	Composés	Bio-activité
1	74	26,367	Ester méthylique de l'acide hexadécanoïque	Activité antifongique, antioxydante et antibactérienne (Ali et al., 2017).
2	67	29,340	Acide 8,11-octadécénoïque (z)- ester méthylique	Non identifier
3	55,05	29,537	l'acide 9 - octadécénoïque ( Z )-, ester méthylique	Antimicrobien et nématocide (Ali et al., 2017).
4	74	30,105	Ester méthylique de l'acide octadécénoïque	Anti-viral, anti-microbien (Linton et al., 2013).
5	148,95	36,517	Acide 1,2-benzènedicarboxylique, ester mono(2éthyl-hexyle)	Antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire et antiviral (Ali et al., 2017).
6	57,05	39,461	Hexatriacontane	Activité antimicrobienne, antioxydante, antiproliférative (Arun et al., 2017).



**Figure 33** : Chromatogramme GC-MS de l'extrait brut de *P.lentiscus*.

### Chapitre III : Résultats et discussions

**Tableau XI** : Identification des composés de l'extrait de *P.lentiscus* par GC-MS.

Pic	m/z	t <sub>R</sub> (min)	Composés	Bio-activité
1	74	21,344	Ester méthylique de l'acide hexadécanoïque	Activité antifongique, antioxydante et antibactérienne (Ali et al., 2017).  Traitement et prévention d'un grand nombre de troubles tels que le diabète, la cataracte, le glaucome, la dégénérescence maculaire, l'athérosclérose, les maladies cardiaques et le cancer. (Iqbal et al., 2004).
2	73	26,187	L-(+)-ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	Antimicrobien et nématocide (Ali et al., 2017).  Anti-inflammatoire, prévention du cancer, hépatoprotecteur, hypercholestérolémique, antiacnéique, insecticide, nématocide, antistaminique, antieczémique, antiandrogène, anticoronarien, antiarthritique. (Chinnasamy et al., 2018).
3	55,05	27,360	Ester méthylique de l'acide (Z) -9-octadécénoïque	Anti viral (Linton et al., 2013).
4	55,05	28,621	Ester méthylique de l'acide 11-octadécénoïque	Activité anticancérogène (Asghar et al., 2011).  Anti-inflammatoire, hypocholestérolémique, anticancéreux, hépatoprotecteur, nématocide, insectifuge, antihistaminique, antieczémique, antiacnéique, antiarthritique, anticoronarien, antipsychotique et insectifuge. (Dandekar et al., 2015).
5	74	29,102	Ester méthylique de l'acide octadécanoïque	Antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, antiviral (Ali et al., 2017).
6	55,05	31,372	Ester méthylique de l'acide (E)- 9-octadécénoïque	Antimicrobien, antiarthritique, anti-inflammatoire, cytotoxique, insecticide et chimio-préventif (Haider Khan et al., 2020).
7	55,05	32,781	Acide octadécanoïque	
8	149	36,564	Ester mono(2-éthylhexyle) de l'acide 1 2-benzènedicarboxylique	
9	69,05	38,597	1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	
10	69,05	39,895	1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)+	

### III.8. Identifications structurales de composés bioactifs à l'aide de l'analyse LC-ESI-MS

D'après le chromatogramme LC-MS des extraits analysés, un nombre de composants avec leurs pics principaux identifiés sont présentés dans les tableaux XII à XV. Les données MS ont été acquises en modes d'ionisation positive et négative (Fig. 33 et 34). Chaque attribution a été faite après comparaison des spectres UV et MS des composés détectés avec la base de données MS rapportée dans la littérature et les bases de données pertinentes basées sur les mesures de masse des ions pseudo moléculaires [M-H].

L'extrait de *P.lentiscus* a montré la présence de 15 molécules, dont Les pics 1 et 2 indiquaient la présence de l'ion [M+H]<sup>+</sup> à m/z 331,5, ce qui suggère une structure de C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>, ce qui pourrait être provisoirement associé à l'isomère de la 3,7-Diméthylquercétine.

Le pic 3 et 4 a révélé la présence d'un ion précurseur [M+H]<sup>+</sup> à m/z 389 et d'un fragment à m/z 274, engendré par la suppression d'une unité méthyle (15 u). En conséquence, les pics 3 et 4 ont été caractérisés comme des isomères de flavonoïdes polyméthoxylés qui peuvent être provisoirement des 6-hydroxy-5, 7,8,3',4'-pentamethoxy-flavone, 4'-hydroxy-5,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone, ou monohydroxy- pentamethoxyflavone (Lei et al., 2017).

Le pic 8 a montré un ion moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z 299 relatif Acide ( Z)-N - Coumaroyl - 5 – hydroxyanthranilique en comparaison aux données MassBank.

Le pic 9 et 10 présente un ion moléculaire à m/z 713 avec un pic de base caractéristique [M+H]<sup>+</sup> à m/z 494 qui mis en évidence l'identification d'un dérivé du myricetin-O-glucuronide (MassBank data).

Le pic 11 a produit un ion précurseur à m/z 283 [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) et sa fragmentation a donné lieu à l'ion produit à m/ z 268 en raison de la perte de groupement méthyl (15 Da). En référence aux informations fournies, cette molécule a été provisoirement identifiée comme flavonoïde methyl (Wogonine ou Oroxyline A) (Islam et al., 2013).

Le pic 13 avait un [M-H]<sup>-</sup> à m / z 977 et des ions fragments à m / z 801 (perte de 176 amu pour l'acide férulique-H-H<sub>2</sub>O), 783 (perte de 194 amu pour l'acide férulique) et 345 de l'aglycone, la spinacétine (perte de 632 amu pour le feruloylglucosyl-apiosyl-glucoside). Par conséquent, le 11 a été attribués au spinacétine 3- O- (2''-feruloylglucosyl)-(1 → 6)-[apiosyl-(1 → 2)]-glucoside (Yuk et al., 2019).

### Chapitre III : Résultats et discussions

Les pics 14 et 15 ont montré un ion précurseur [M-H]<sup>-</sup> avec m/z 339 correspondant à des isomères de l'esculoside en comparaison avec les données de MassBank.

Le pic 17 a été attribué au dérivé de résveratrol sur la base de la présence d'un ion précurseur [M-H]<sup>-</sup> à m/z 227, qui s'est fragmenté pour générer plusieurs ions produits distinctifs à m/z. 185 (Hashim et al., 2020).

Les pic 18 et 19 montres un ion moléculaire [M-H]<sup>-</sup> a m/z 181 qui caractérise ainsi l'isomère d'acide dihydrocaféique selon les données de MassBank.

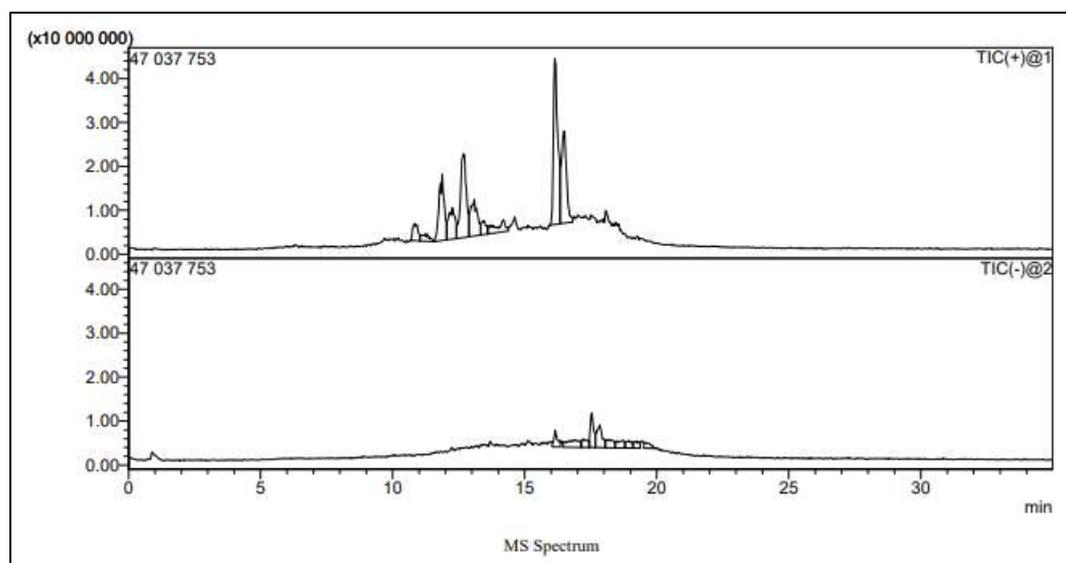
Le pic 20 a été provisoirement identifié comme étant Trans acide caftarique en raison de l'ions précurseur à [M-H]<sup>-</sup> m/z 311 avec la présence d'un fragment à m/z 179 qui correspondant à l'acide caféique produit par la perte d'un acide tartrique (132 Da) (Khoza et al., 2016).

**Tableau XII** : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de feuilles de *P.lentiscus* en mode d'ionisation positive par LC-MS.

Pic	tr (min)	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS <sup>+</sup>	Identification
1	10,9	331	331	3,7-Dimethylquercetine
2	11,3	331	331, 310, 165	Dérivé 3,7-Dimethylquercetine
3	11,9	389	389, 374	pentmethoxyflavone
4	12,3	389	389, 374, 244	Dérivé pentamethoxyflavone
5	12,7	447	447	Non identifié
6	13,2	448	448, 309, 232, 165	Non identifié
7	13,5	249	249, 227, 181	Non identifié
8	14,2	299	299, 277, 221, 181	Acide ( Z)-N - Coumaroyl - 5 - hydroxyanthranilique
9	16,1	626	625, 581, 450, 405	Quercetine di-glucoside
10	16,5	626	625, 581, 450, 405, 361	Dérivé Quercetine di-glucoside

**Tableau XIII** : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de feuilles de *P.lentiscus* en mode d'ionisation négative par LC-MS.

Pic	t <sub>R</sub> (min)	[M-H]-	MS/MS-	Identification
11	16,15	283	268	Flavonoïde méthyle
12	16,70	801		Non identifié
13	17,21	977	801, 632, 297, 249, 232, 191	Spinacetin 3-O-(2''-feruloylglucosyl)(1->6)-[apiosyl(1->2)]-glucoside
14	17,53	339	339	Esculoside
15	17,84	339	339, 297	Esculoside isomer
16	18,24	297	239, 218, 159	Non identifié
17	18,71	297	227, 181	Dérivé resveratrol
18	18,93	297	249, 198, 181	Acide dihydrocaffeique
19	19,30	297	181	Acide dihydrocaffeique
20	19,69	311	311, 179	Acide Trans caftarique



**Figure 34** : Chromatogramme des ions totaux (TIC) des composés phénoliques identifiés dans les extraits de *P.lentiscus* par la méthode LC-ESI-MS en mode négatif et positif.

En parallèle, 10 composés ont été identifiés dans l'extrait de *P.nigra*, le pic 1 présentait l'ion  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  331, qui était l'ion d'adduction de sodium du résidu disaccharide (Glu-RHA) ( $[308+Na]^+$ ) (Jia et al., 2017).

Le pic 2 a montré que l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  389 a subi une perte d'unité méthyle (15 u) qui a généré des ions produits à  $m/z$  374. Le pic 3 présentait l'ion moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  411 et l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  389, avec des ions fragments à  $m/z$  374. Par conséquent, les pics 2 et 3 ont été identifiés comme des flavonoïdes polyméthoxylés et des isomères de flavonoïdes

polyméthoxylés respectivement, qui peuvent être provisoirement des 6-hydroxy-5, 7,8,3',4'-pentamethoxy-flavone, 4'-hydroxy-5,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone, ou monohydroxy-pentamethoxyflavone (Lei et al., 2017).

Le pic 6 a montré un ion précurseur  $[M+CH_3+Na]^+$  à  $m/z$  521, 506  $[M+Na]^+$  et  $m/z$  484  $[M+H]^+$ , l'ion précurseur à  $m/z$  317 correspondant à la rhamnétine, le pic a donc été identifié comme un dérivé de la rhamnétine (base de données MassBank).

Le composé 11 a présenté un ion  $[M-H]$  à  $m/z$  377 avec des fragmentations à  $m/z$  198 et 161 identifié comme un dérivé d'aglycone d'oleuropéine (Fu et al., 2009).

Le pic 14 a montré un ion  $[M-H]$   $m/z$  479 avec un fragment à  $m/z$  333 et, compte tenu de la différence de 146u, une perte de neutralité de la fraction rhamnosyl a été supposée. L'aglycone a été provisoirement identifié comme étant de la myricétine et pourrait probablement être identifié comme étant du myricétine-galactoside ou du myricétine-glucoside (base de données MassBank).

Le pic 17 présentait l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  649 et subissait ensuite des pertes neutres de 146u (unité rhamnose) pour produire les ions fragments de l'ion  $[M-H- rhamnose]^-$  à  $m/z$  503, l'ion produit à  $m/z$  325 indiquait une perte de 2 molécules de la partie glucosyle, l'ion fragment à  $m/z$  301 correspondait au fragment caractéristique de la quercétine. Ainsi, le pic 17 a été suggéré comme étant de la rhamnosyl-hexosyl-acyl-quercetin (Ben Said et al., 2017).

Les pics 18 et 19 ont montré un ion  $[M-H]$  avec  $m/z$  339 correspondant à des isomères d'esculoside en comparaison avec les données de MassBank.

Le pic 20 a présenté  $[M-H]^-$  à  $m/z$  791, ce composé pourrait être attribué à l'acide glucuronique déshydraté de l'hédragénine, l'ion à  $m/z$  498 produit après la perte de 2 résidus de rhamnoside (146X2), a ensuite subi la perte neutre de 165 u pour produire l'ion fragment à  $m/z$  333 (Grati et al., 2022).

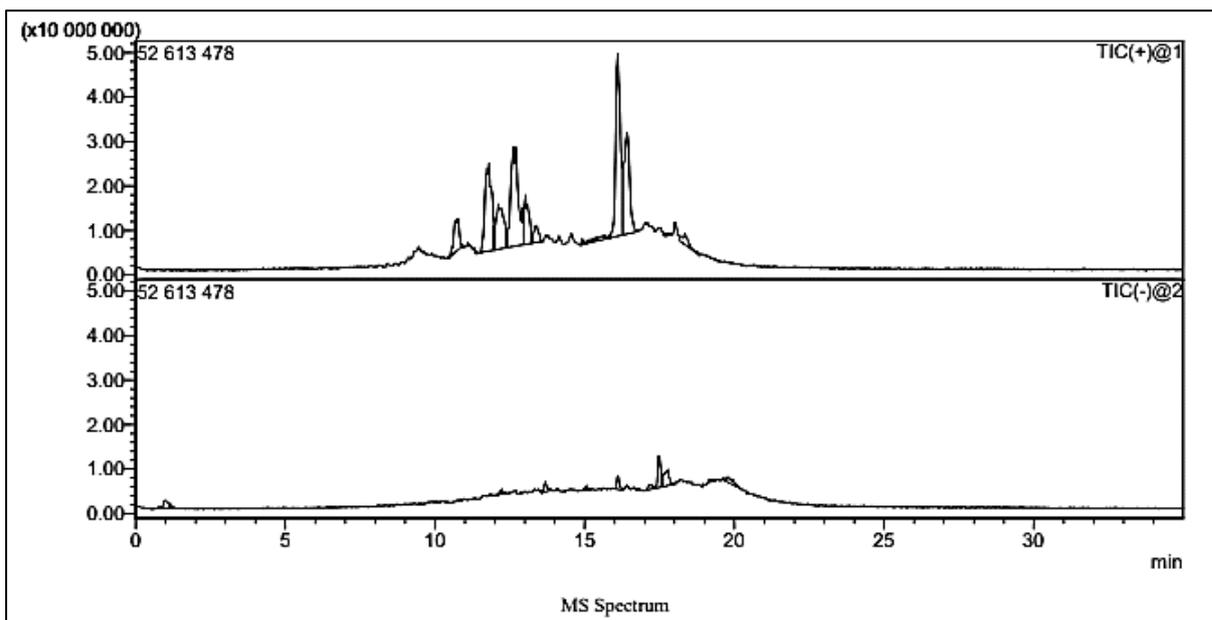
### Chapitre III : Résultats et discussions

**Tableau XIV** : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de bourgeons de *P.nigra* L. en mode d'ionisation positive par LC-MS.

Pic	t <sub>R</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS <sup>+</sup>	Identification
1	10,756	331	331, 309	Disaccharide (glu-rha)
2	11,802	389	389, 374	Pentmethoxyflavone
3	12,117	411	411, 389, 374	Pentmethoxyflavone
4	12,690	447	447, 426	Non identifié
5	13,088	447	447, 426	Non identifié
6	13,464	506	506, 484, 401, 317, 249, 227, 165	Rhamnétine
7	14,917	561	561, 455, 448, 365, 331, 284, 255, 197, 165	Non identifié
8	16,100	670	670, 626, 582, 538, 533, 494,449, 405, 361	Isomer
9	16,414	670	670, 626, 582, 538, 533, 494,449, 405, 361	
10	18,343	684	684, 459, 413, 406, 354, 313, 199, 174	Non identifié

**Tableau XV** : Identification des composés phénoliques dans l'extrait de bourgeons de *P.nigra* en mode d'ionisation négative par LC-MS.

Pic	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS <sup>-</sup>	Identification
11	0,981	377	377, 198, 161	Dérivé d'aglycone d'oleuropéine
12	1,150	726	726, 603, 453, 434, 377, 303, 273, 198, 187	Non identifié
13	12,229	395	395, 289, 242, 221	Non identifié
14	13,684	479	479, 401, 333, 293, 270, 194	Myricetin-galactoside ou myricetin-glucoside
15	15,061	634	634, 534, 269	Non identifié
16	16,109	946	946, 735, 691, 531, 463, 419, 317, 269, 227, 191	Non identifié
17	17,178	649	649, 589, 571, 503, 435, 367, 325, 297	Rhamnosyl-hexosyl-acyl-quécetine
18	17,485	339	339	Esculoside
19	17,770	339	339	Esculoside isomer
20	19,765	791	791, 498, 333, 311	Hédragénine de l'acide gluco-glucuronique déshydraté



**Figure 35** : Chromatogramme des ions totaux (TIC) des composés phénoliques identifiés dans les extraits de *P.nigra* par la méthode LC-ESI-MS en mode négatif et positif.

En résumé, les molécules identifiées sont principalement des flavonoïdes, à l'exception de l'acide gluco-glucuronique déshydraté hedragenin qui est une saponine. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires qui appartiennent à la classe des polyphénols. Dans la nature, ces composés se présentent principalement sous la forme de structures glycosidiques. Ils offrent une protection contre les UV et possèdent de puissantes propriétés antioxydantes, antimutagènes, anticancérigènes et anti-inflammatoires qui sont essentielles pour les applications pharmaceutiques et cosmétiques (Dai et Mumper, 2010).

### III.9. Formulations à base de plantes

La formulation d'agents de protection solaire, visant à améliorer l'effet protecteur contre les UV est un sujet de grande importance qui représente un véritable défi pour l'industrie cosmétique. L'efficacité de ces produits est principalement liée au principe actif et au degré de pénétration dans les couches de la peau qui dépend fortement des supports utilisés.

Dans la présente étude, des particules chargées d'extrait ont été synthétisées par un système de dispersion utilisant le PVP comme matrice, un support hydrophile largement utilisé dans les sciences pharmaceutiques. Il permet une stabilité et une dissolution accrues des molécules. La figure 30 montre que l'extrait est intégré avec succès dans le PVP sous forme sphérique, cette intégration est médiée par la liaison hydrogène intermoléculaire entre

### Chapitre III : Résultats et discussions

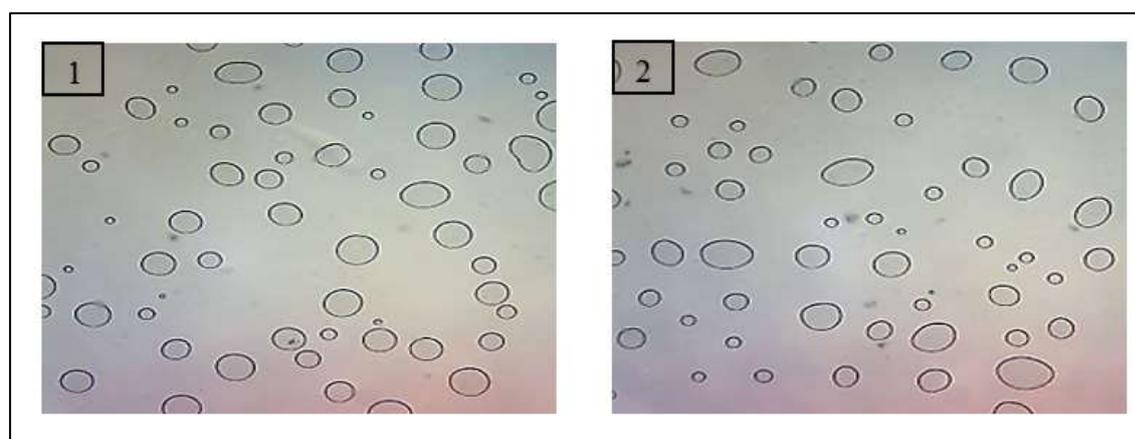
les groupes hydroxyles terminaux des composés extraits et les groupes carbonyle du PVP (Zhao et al., 2014).

Cependant, la formulation préparée en dispersant les particules dans du glycérol présentait des indices de qualité satisfaisant les besoins du client (Tableau VIII), dont un pH acide de 1,95 et 2,13 dans la formulation à base de *P.nigra* et *P.lentiscus* respectivement. En effet, un pH relativement acide limite la prolifération bactérienne et renforce le film hydrolipidique protecteur à la surface de l'épiderme.

De plus, la densité et la viscosité, qui interviennent dans la texture de l'application ont montré un indice de 1,168 et 0,035132 Pa.s avec une capacité d'étalement de 859,67 cm<sup>2</sup>/g pour la préparation à base de *P.nigra*. Tandis que la formulation à base d'extrait *P.lentiscus* a montré des indices de 1,165 et 0,035132 Pa.s avec une capacité d'étalement de 1920,37 cm<sup>2</sup>/g qui permet la formation d'un film occlusif sur l'épiderme et la surface de la peau qui facilite la diffusion des principes actifs.

**Tableau XVI :** Résultats des paramètres d'évaluation physicochimique de la formulation.

Formulation	pH	Viscosité (Pa.s)	Densité	Capacité d'étalement (cm <sup>2</sup> /g)	Aspect	Couleur
<i>P.lentiscus</i>	2,13	0,035132	1,165	1920,37	Homogène visqueux	Blanche
<i>P.nigra</i>	1,95	0,035132	1,168	859,67	Homogène visqueux	Jaune-vert clair



**Figure 36 :** Observation au microscope optique des particules de PVP chargées d'extrait, (1) *P.lentiscus*, (2) *P.nigra*.

### III.10. Activité protectrice contre les UVB

Il a été prouvé que le rayonnement ultraviolet (UV), en particulier les UVB à ondes courtes (280 - 315 nm), interagissent avec de nombreux types de macromolécules cellulaires, entraînant la formation de photo-produits après absorption d'énergie. Ces photoproduits peuvent affecter négativement l'équilibre redox cellulaire, augmentant la libération des ERO et entraînant un stress oxydatif et une inflammation qui contribuent aux lésions cutanées. Cependant, l'utilisation appropriée d'un produit doté d'un indice de protection solaire est nécessaire pour réduire l'exposition cutanée et aux UV reçue (Batista et al., 2018).

L'indice de protection solaire (IPS) est généralement reconnu comme l'indicateur universel de l'efficacité d'un produit en matière de protection solaire, notamment contre les rayons UVB. Les formulations préparées ont montré un FPS élevé avec une valeur de  $35,97 \pm 0,93$  pour l'extrait de *P.lentiscus* et  $34,81 \pm 0,07$  pour l'extrait de *P.nigra*. Ceci suggère que les extraits peuvent être considérés comme un efficace agents photoprotecteurs et peuvent être utilisés comme ingrédient naturel dans les formulations de protection solaire topique ainsi que comme une alternative moins chère et plus sûre comparé aux écrans solaires chimiques nocifs utilisés aujourd'hui en cosmétologie.

De plus, le FPS obtenu dans cette étude est prometteur car la protection obtenue dépasse celle rapportée dans d'autres études utilisant des extraits de plantes. Wagemaker et al. (2011) ont rapporté un facteur de protection solaire variant de 0,0 à 4,1 à partir d'extraits de 10 espèces de *Coffea*. Maske et al. (2013) ont évalué les facteurs de protection solaire in vitro d'un extrait brut de pétales de *Rosa kordesii* et d'une formulation en gel, obtenant respectivement des valeurs de FPS de 20,15 et 3,25. Lohézic et al. (2013) ont obtenu un FPS d'environ 5 avec l'extrait de *Lasallia pustulata*. En ce qui concerne Badea et al. (2015), la conception de vecteurs lipidiques nanostructurés contenant diverses huiles végétales telles que l'huile de graines de grenade, l'huile de germe de blé, l'huile de graines de cassis, l'huile de sésame, l'huile de carotte, l'huile de graines de framboise et l'huile de son de riz, ainsi que leurs combinaisons, a démontré une efficacité améliorée, notamment avec la crème à base d'huile de graines de grenade, qui avait un facteur de protection solaire de 4,1. De plus, la combinaison d'huile de graines de grenade et d'huile de germe de blé a obtenu un FPS encore plus élevé, atteignant 5,1.

En effet, cette capacité pourrait être liée à la présence de métabolites secondaires ayant des propriétés antioxydantes, qui pourraient être responsables de l'absorption intense des

rayons UV. Sur la base des résultats des activités biologiques précédentes, l'extrait peut présenter un effet photoprotecteur ou chimiopréventif contre les dommages cutanés induits par les UVB en réduisant ou en inhibant le stress oxydatif et la réponse inflammatoire. De plus, l'effet photoprotecteur des extraits est principalement liée aux composés identifiés et en particulier au glycoside de myricétine et aux dérivés de la quercétine, qui ont déjà été rapportés dans la littérature comme des antioxydants capables de piéger les radicaux libres responsables du photovieillissement de la peau et de prévenir les dommages induits par les ultraviolets B (UVB) sur les kératinocytes (Huang et al., 2010 ; Choquenot et al., 2008).

### III.11. Tolérance cutanée

Dans le cadre de cette étude, l'innocuité des formulations préparées a été évaluée à une dose unique appliquée sur la peau. Les réactions caractéristiques enregistrées aux intervalles de 24, 48 et 72 heures sont consignées dans le tableau IX. Conformément à l'indice d'irritation primaire calculé, aucune manifestation cutanée n'a été observée, indiquant ainsi l'absence d'effet irritant de l'extrait. Dans cette perspective, l'innocuité des extraits valide son utilisation comme écran total.

**Tableau XVII :** Observation des manifestations cutanées de la formulation à base d'extrait.

Période	<i>P.lentiscus</i>				<i>P.nigra</i>			
	Erythème	Œdème	IC	IP	Erythème	Œdème	IC	IP
24h	0	0	0	0	0	0	0	0
48h	0	0	0	0	0	0	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0

De plus, de nombreuses études antérieures ont affirmé que les extraits de feuilles de *P.lentiscus* ne sont pas cytotoxiques en utilisant plusieurs modèles expérimentaux (Milia et al., 2021). En outre des études précédente, que des souris traitées par une dose de 200mg/Kg d'extrait éthanolique de *P.nigra* n'ont montré aucune toxicité (Debbache et al., 2013). Ainsi que, il a été établi qu'une préparation de *P.nigra* à 0,1 % testé sur l'épiderme humain reconstitué a montré une faible toxicité (Maack et Pegard, 2016). Ce qui révèle l'innocuité de l'extrait végétal riche en composés phénoliques.

## Conclusion et perspectives

La présente étude avait pour objectifs l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de deux plantes médicinales *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*, l'évaluation de des activités biologiques des extraits obtenus, à savoir l'activité antioxydante, l'anti-inflammatoire et l'effet photoprotecteur, ainsi que à l'analyse phytochimique.

Les résultats de la présente étude révèlent que l'utilisation de l'extraction assistée par ultrasons s'avère efficace pour extraire les polyphénols, en utilisant l'acide lactique comme solvant d'extraction. En outre, l'intégration d'un plan d'expériences s'est avérée être un moyen efficace d'anticiper et d'optimiser les rendements d'extraction.

L'examen phytochimique a mis en évidence une plus grande abondance de composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tanins et saponines dans les feuilles de l'espèce *P.lentiscus*, tandis que les bourgeons de *Populus nigra* ont montré une concentration plus élevée en protéines, ainsi ces résultats confirment l'usage traditionnel de ces espèces végétales.

L'évaluation des activités biologiques des extraits de *P. lentiscus* et *P. nigra* a mis en évidence un potentiel antioxydant notable, attesté par divers tests anti-oxydants qui ont révélé une capacité réductrice du molybdate et du fer. De surcroît, ces extraits ont démontré une activité antiradicalaire significative contre plusieurs types de radicaux libres, incluant le radical DPPH, le radical ABTS, ainsi que le radical hydroxyle.

Par ailleurs, l'extrait de *P. lentiscus* a démontré une activité anti-inflammatoire notable, se traduisant par une inhibition des médiateurs inflammatoires, notamment l'oxyde nitrique, une inhibition de l'activité enzymatique de la cyclooxygénase et de la myéloperoxydase.

En outre, l'évaluation de l'effet photoprotecteur de la formulation réalisée a montré un excellent facteur de protection solaire, fortement lié à la présence de composés phénoliques. De plus, le potentiel antioxydant et l'activité anti-inflammatoire révélés pourraient constituer un mode d'action alternatif et une stratégie à double effet pour renforcer l'effet photoprotecteur et de prévenir ou de ralentir les dommages cellulaires en inhibant les radicaux libres et les médiateurs pro-inflammatoires qui sont impliqués dans le stress oxydatif et les lésions cellulaires induites par les UVB.

Dans cette perspective et dans le but de compléter ce travail, les résultats obtenus nous permettent de poursuivre cette étude dans des essais cliniques. Aussi, il serait intéressant d'isoler et de caractériser tous les composés phénoliques des deux extraits, pour une meilleure

compréhension des mécanismes moléculaire responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

## Liste des références

- Akash, M.S., Rehman, K., Chen, S. (2015). Natural and synthetic polymers as drug carriers for delivery of therapeutic proteins. *Polymer Reviews*. 55(3):371-406.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa calyces*: kinetic modelling and process intensification. *Industrial Crops and Products*. 137:528-535.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Ukaegbu, C.I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. 4:200-214.
- Alarcão-E-Silva M.L.C.M.M., Leitão A.E.B., Azinheira H.G., Leitão M.C.A. (2001). The *Arbutus berry*: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14:27-35.
- Al-Halabi, R., Bou Chedid, M., Abou Merhi, R., El-Hajj, H., Zahr, H., Schneider-Stock, R., Bazarbachi, A., Gali-Muhtasib, H. (2011). Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biology and Therapy*. 12:59-68.
- Ali, A., Javaid, A., Shoaib, A. (2017). GC-MS analysis and antifungal activity of Methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*. *Planta Daninha*. 35:1-8.
- Ali, A., Wu, H., Ponnampalam, E.N., Cottrell, J.J., Dunshea, F.R., Suleria, H.A. (2021). Comprehensive profiling of most widely used spices for their phenolic compounds through LC-ESI-QTOF-MS2 and their antioxidant potential. *Antioxidants*. 10(5):721-744.
- Ambarwati, N.S.S., Elya, B., Mahayasih, P.G.M.W., Awang, M.S.N., Omar, H. (2021). Antioxidant activity of *Litsea petiolata* Hk. F. *Journal of Physics: Conference Series*. 1869:1-5.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L., Serralheiro, M.L., Araújo, M.E.M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. 53:6-15.
- Amhamdi, H., Aouinti, F., Jean Paul Wathelet, J.P., Elbachiri, Ali. (2009). Chemical Composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from eastern Morocco. *Records of Natural Products*. 3:90-95.

- Annegowda, H.V., Anwar, L.N., Mordi, M.N., Ramanathan, S., Mansor, S.M. (2010). Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* L. leaves. *Pharmacognosy Research*. 2:368-373.
- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2015). Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 6(1):77-91.
- Arun, k.M., Umamaheswari, U., Rajesh, K.G., Preethy, P.R., Elumalai, S., Sangeetha, T. (2017). Studies on the extraction and analysis of polyunsaturated fatty acids (pufa) from marine macroalgae. *The International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*. 9(3):30715-30741.
- Asghar, S.F., Rehman, H.U., Choudahry, M.I., Rahman, A.U. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of petroleum ether extract (oil) and bio-assays of crude extract of *Iris germanica*. *International Journal Genetics Molecular Biology*. 3(7):95-100.
- Atayoglu, A. T., Atik, D. S., Bölük, E., Gürbüz, B., Ceylan, F. D., Çapanoğlu, E., Atayolu, R., Paradkar, A., Fearnley, J., Palabiyik, I. (2023). Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of the propolis extract prepared with l-lactic acid: An alternative solvent to ethanol for propolis extraction. *Food Bioscience*. 53:102756-102764.
- Azib, L., Debbache-Benaida, N., Costa, G.D., Atmani-Kilani, D., Saidene, N., Ayouni, K., Atmani, D. (2019). *Pistacia lentiscus* L. leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Industrial Crops and Products*. 137:576-584.
- Aziz, N., Kim, M.Y., Cho, J.Y. (2018). Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 225, 342–358.
- Badea, G., Lăcătușu, I., Badea, N., Ott, C., Meghea, A. (2015). Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*. 67:18-24.
- Bakli, S., Daoud, H., Amina, Z., Nouari, S., Asma, B., Soufiane, G., Oumaima, N. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Flavonoids Extracted from *Pistacia lentiscus* L., Leaves. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 10:83-89.

- Balakrishnan, N., Panda, A.B., Raj, N.R., Shrivastava, A., Prathani, R. (2009). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha indica* Linn root. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2(2):148-150.
- Barba, C., Méndez, S., Roddick-Lanzilotta, A., Kelly, R., Parra, J.L., Coderch, L. (2008). Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. *Skin Research and Technology*. 14(2):243-248.
- Batista, C.M., Alves, A.V.F., Queiroz, L.A., Lima, B.S., Araújo, A.A.S., De Albuquerque-Júnior, R.L.C., Cardoso, J.C. (2018). The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 18:198-207.
- Belouad, A. (2001). Plantes médicinales d'Algérie. Edition Office des Publications Universitaires. 162-163.
- Ben Said, R., Arafa, I.H., Usam, A.M., Abdullah Sulaiman, A.A., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Stochmal, A. (2017). Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(3):512-530.
- Benedec, D., Oniga, I., Muresan, B., Mot, A.C., Damian, G., Nistor, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Hanganu, D., Duma, M., Vlase, L. (2014). Contrast between Water- and Ethanol-Based Antioxidant Assays: Aspen (*Populus tremula*) and Black Poplar (*Populus nigra*) Extracts as a Case Study. *Journal of Food Quality*. 37:259-267.
- Bettaieb, A., Moujahed, N., Ksouri, R. (2012). Secondary compounds characterization in some autochthonous species from a North-Eastern region of Tunisia. *Options Méditerranéennes*. 102:371-374.
- Biswas, S., Ghosh, P., Dutta, A., Biswas, M., Chatterjee, S. (2021). Comparative analysis of nutritional constituents, antioxidant and antimicrobial activities of some common vegetable wastes. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 9(1):62-74.
- Boeing, J.S., Barizão, É.O., e Silva, B.C., Montanher, P.F., De Cinque Almeida, V., Visentainer, J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*. 8:1-9.

- Botineau, M. (2015). Guide des plantes à fruits charnus comestible et toxique. Lavoisier Tec & doc. Paris. p:174.
- Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. 9:14-19.
- Bouriche, H., Khalfaoui, S., Meziti, H., Senotor, A. (2013). Anti-inflammatory activity of acetonic extract of *Pistacia lentiscus* fruits. *The Online Journal of Science and Technology*. 3:40-48.
- Boyer, J., Liu, R.H., (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 3:1-15.
- Briganti, S., Picardo, M. (2003). Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *Journal of the European Academy of Dermatology*. 17:663-669.
- Brouillard, R., Dangles, O., (1994). Flavonoids and flower colour, in: J.B. Harborne (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, UK. 565-588.
- Brown, E.J., Khodr, H., Hider, C.R., Rice-Evans, C.A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*. 330(3):1173-1178.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4ème éditions Lavoisier Toc & Doc. Paris. 1234.
- Bühler, V. (2005). Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone and copovidone. Springer Science & Business Media.
- Bullitta, S., Piluzza, G., Manunta, M. (2013). Cell-based and chemical assays of the ability to modulate the production of intracellular Reactive Oxygen Species of eleven Mediterranean plant species related to ethnobotanic traditions. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 60:403-412.
- Caderni, G., Remy, S., Cheynier, V., Morozzi, G., Dolara, P. (1999). Effect of complex polyphenols on colon carcinogenesis. *European Journal of Nutrition*. 38:126-132.

- Cai, Y., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 78:2872-2888.
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P., Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*. 197:266-272.
- Chaabani, E., Vian, M.A., Dakhlaoui, S., Bourgou, S., Chemat, F., Ksouri, R. (2019). *Pistacia lentiscus* L. edible oil: Green extraction with bio-based solvents, metabolite profiling and in vitro anti-inflammatory activity. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*. 26:25.
- Chandrasekharan, N. V., Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome biology*. 5:1-7.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food chemistry*. 92(3):491-497.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 41:357-377.
- Cheurfa, M., Allem, R. (2015). Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 25:142-144.
- Chinnasamy, P.S., Parimala, S., Kandhasamy, M. (2018). Phytochemical evaluation of seed and fruit pulp extracts of *Passiflora foetida* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 7(7):1924-1932.
- Choquenot, B., Couteau, C., Papis, E., Coiffard, L.J. (2008). Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products*. 71(6):1117-1118.
- Chun, M.K., Bhusal, P., Choi, H.K. (2013). Application of Carbopol/PVP interpolymer complex to prepare mucoadhesive floating granule. *Archives of pharmacal research*. 36:745-751.

- Claux, O., Santerre, C., Abert-Vian, M., Touboul, D., Vallet, N., Chemat, F. (2021). Alternative and sustainable solvents for green analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 31:100510.
- Clifford, M.N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Science and Food Agriculture*. 80:1118-1125.
- Clifford, M.N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7):1033-1043.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*. 25(5):469-495.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):564-582.
- Dahmoune, A., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Moussi, K., Bouaoudia, N., Adjeroud, N., Kadri, N., Lefsih, K., Boughani, L., Mouni, L., Balunkeswar, N., Madani, K. (2015). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P.lentiscus* leaves : comparative study of artificial neural network versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops and Products*. 77:251-261.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15(10):7313-7352.
- Daira, N., Maazi, M.C., Chefrou, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 85:276-290.
- Dandekar, R., Fegade, B., Bhaskar, V.H. (2015). GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(1):149-154.
- Dangles, O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. Paris. 29-54.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*. 43(4):348-361.
- D'Archivio, A. A., Maggi, M. A., Ruggieri, F. (2018). Extraction of curcuminoids by using ethyl lactate and its optimization by response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 149:89-95.
- Dawidowicz, A.L., Wianowska, D., Baraniak, B., (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *WT - Food Science and Technology*. 39(3):308-315.
- De Almeida, V.M., Dias, Ê.R., De Souza, B.C., Leite, F.H.A., Biondi, I., Vieira, I. J. C., Filho, R.B., Queiroz, R.F., Branco, A. (2023). Myeloperoxidase Inhibition and In Silico Evaluation of Phenolics from *Vellozia dasypus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 33(2):344-352.
- Debbache-Benaid, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirth, V.B., Djebbli, N., Atmani, D., Shahwar, D. (2013). Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3:697-704.
- Debbache-Benaid, N., Atmani, D., Atmani, D. (2014). Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial Crops and Products*. 53:85-92.
- Debbache-Benaid, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Cheraft, N., Boudaoud, H., Djebli, N., Atmani, D. (2018). Anti-hyperuricemic and neuroprotective effects of *Populus nigra* L. (Saliaceae) flower buds used in Algerian folk medicine. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 6:471-482.
- De Camargo, A.C., Regitano-d'Arce, M.A., Biasoto, A.C., Shahidi, F. (2016). Enzyme assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*. 212:395-402.
- De Zordi, N., Cortesi, A., Kikic, I., Moneghini, M., Solinas, D., Innocenti, G., Portolan, A., Baratto, G., Dall'Acqua, S. (2014). The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: a central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*. 95:491-498.

- Deti, C., Santos-Nascimento, L.B., Brunetti, C., Ferrini, F., Gori, A. (2020). Optimization of a green ultrasound assisted extraction of different polyphenols from *Pistacia lentiscus* L. leaves using a response surface methodology. *Plants*. 9:1482-1499.
- Dif, M.M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., Bouterfas, K. (2015). Quantification study of polyphenols in different organs of *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*. 13(5):314-319.
- Di Stasi, L.C. (2021). Coumarin derivatives in inflammatory bowel disease. *Molecules*. 26(2):422.
- Djebari, S., Wrona, M., Boudria, A., Salafranca, J., Nerin, C., Bedjaoui, K., Madani, K. (2020). Study of bioactive volatile compounds from different parts of *Pistacia lentiscus* L. extracts and their antioxidant and antibacterial activities for new active packaging application. *Food Control*. 107514-107522.
- Djemaa-Landri, K., Hamri-Zeghichi, S., Belkhiri-Beder, W., Krisa, S., Cluzet, S., Richard, T., Valls, J., Kadri, N., Madani, K., (2021). Phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of some Algerian olive stone extracts obtained by conventional solvent and microwave-assisted extractions under optimized conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15(5):4166-4180.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stoker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. (79):654-660.
- Doherty, C., York P. (1987). Mechanisms of dissolution of frusemide/PVP solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 34:197-205.
- Doughari, J.H., Human, I.S., Bennade, S., Ndakidemi, P.A. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plant Research*. 3:839-848.
- Dramane, S., Witabouna, K.M., Kagoyire, K. (2010). Evaluation of Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of Some Bioactif Taxons from Côte D'ivoire. *European Journal of Scientific Research*. 9:307-317.
- Duclos, F., Abell, L.M., Harden, D.G., Pike, K., Nowak, K., Locke, G.A., Duke, G.J, Liu, X., Fernando, G., Shaw, S.A., Vokits, B.P., Wurtz. N.R., Viet, A., Valente, M.N., Stachura, S.,

- Sleph, P., Khan, A., Gao, J., Dongre, A.R., Zhao, L., Wexler, R.R., Gordon, D.A., Kick, E.K. (2017). Triazolopyrimidines identified as reversible myeloperoxidase inhibitors. *Medchemcomm.* 8(11):2093-2099.
- Dudley, G.B., Richert, R., Stiegman, A.E., (2015). On the existence of and mechanism for microwave specific reaction rate enhancement. *Chemical Science.* 6:2144-2152.
- Dupérat, M. Polese, J.M. (2008). Encyclopédie visuelle des arbres & arbustes. Artémis. France. p187.
- Eberhard, T., Robert, A., Annelise, L. (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France. 27.
- Elez Garofulić, I., Kruk, V., Martić, A., Martić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2020). Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. leaves and fruit extract obtained by optimized microwave-assisted extraction. *Foods.* 9(11): 1556-1571.
- Eng, E.T., Ye, J., Williams, D., Phung, S., Moore, R.E., Young, M.K., Gruntmanis, U., Braunstein, G., Chen, S. (2003). Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. *Cancer Research.* 63:8516-22.
- Enneb, H., Belkadhi, A., Cheour, F., Ferchichi, A. (2015). Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of New Sciences.* 20(2):788-793.
- Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology.* 49:1592-1597.
- Farooque, S., Rose, P. M., Benohoud, M., Blackburn, R. S., Rayner, C. M. (2018). Enhancing the potential exploitation of food waste: Extraction, purification, and characterization of renewable specialty chemicals from blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 66(46):12265-12273.
- Ferrer, P., Asensi, M., Segarra, R., Ortega, A., Benlloch, M., Obrador, E., Varea, M. T., Asensio, G., Jorda, L., Estrela, J. M. (2005). Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia.* 7:37-47.

- Fu, S., Arraez-Roman, D., Menendez, J.A., Segura-Carretero, O., Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 23(1):51-59.
- Gadkari, P.V., Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*. 93:122-138.
- Gangwar, M., Gautam, M.K., Sharma, A.K., Tripathi, Y.B., Goel, R.K., Nath, G. (2014). Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich *Mallotus philippinensis* Fruit Extract on Human Erythrocytes : An In Vitro Study. *The Scientific World Journal*. 1-12.
- Gatea, F., Matei, A.O., Teodor, E.D., Radu, G.L. (2015). Antioxidant properties and polyphenols composition of some roumanian propolis samples. *Revue Roumaine de Chimie*. 60 (1):65-74.
- Ghenima, A.I., Idir, M., Nadjat, M.G., Samia, M.A., Mihoub, Z.M., Karim, H. (2015). In vitro evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7:133-139.
- Ghitescu, R.E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A.M., Gilca, I.A., Popa, V.I. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*. 22:535-541.
- Giftson Senapathy, J., Jayanthi, S., Viswanathan, P., Umadevi, P., Nalini, N. (2011). Effect of gallic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis in Wistar rats-a chemopreventive approach. *Food Chemistry and Toxicology*. 49887-49892.
- Giftson, J.S., Jayanthi, S., Nalini, N. (2010). Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*. 28:251-259.
- Golubkina, N., Ulyana Plotnikova, U., Laptchenko, V., Laptchenko, H., Sheshnitsan, S., Amagova, Z., Matsadze, V., Naumenko, T., Bagrikova, N., Logvinenko, L., Sakhno, T., Chevtchouk, O., Pirogov, N., Caruso, G. (2022). Evaluation of factors affecting tree and shrub bark's antioxidant status. *Plants*. 11(19):2609-2625.

- Gómez-García, R., Martínez- Avila, G.C.G., Aguilar, C.N. (2012). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *Biotech.* 3(2):297-300.
- Gonzalez-Periz A., Claria J. (2007). New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 7(3):297-309.
- Gori, A., Nascimento, L.B., Ferrini, F., Centritto, M., Brunetti, C. (2020). Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: what is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts ?. *Molecules.* 25(4):956.
- Grati, W., Samet, S., Bouzayani, B., Ayachi, A., Treilhou, M., Tene, N., Mezghani-Jarraya, R. (2022). HESI-MS/MS analysis of phenolic compounds from *Calendula aegyptiaca* fruits extracts and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules.* 27(7):2314.
- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology.* 86(3):345-391.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry.* 3(1):43-53.
- Haaf, F., Sanner, A., Straub, F. (1985). Polymers of N-vinylpyrrolidone: synthesis, characterization and uses. *Polymer Journal.* 17(1):143-152.
- Hachani, C., Abassi, M., Lazhar, C., Lamhamedi, M.S., Bejaoui, Z., 2019. Allelopathic effects of leachates of *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. and *Populus nigra* L. on germination and seedling growth of *Triticum durum* Desf. under laboratory conditions. *Agroforestry Systems.* 93:1973-1983.
- Haddouchi, F. Chaouche, T.M. Halla, N. (2018). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie.* 16(1):254-262.
- Haider-Khan, I., Javaid, A. (2020). Anticancer, antimicrobial and antioxidant compounds of quinoa inflorescence. *Advancements in Life Sciences.* 8(1):68-72.
- Hajji-Hedfi, L., Larayedh, A., Chihani Hammas, N., Regaieg, H., Horrigue-Raouani, N. (2019). Biological activities and chemical composition of *Pistacia lentiscus* in controlling

Fusarium wilt and root-knot nematode disease complex on tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 155:281-291.

Hashim, S.N., Boysen, R I., Yang, Y., Schwarz, L.J., Danylec, B., Hearn, M.T. (2020). Parallel enrichment of polyphenols and phytosterols from Pinot noir grape seeds with molecularly imprinted polymers and analysis by capillary high-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Talanta*. 208:120397.

Heber, D. (2008). Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*. 269:262-268.

Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2012). Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. 4:159-180.

Hiai, S., Oura, H., Odaka, Y., Nakajima, T. (1975). A colorimetric estimation of ginseng saponins. *Planta Medica*. 28(08):363-369.

Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétales*. 2<sup>ème</sup> éditions de boeck. Belgique. 267-268.

Howe, L.R. (2007). Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Research*. 9(4):210.

Huang, J.H., Huang, C.C., Fang, J.Y., Yang, C., Chan, C.M., Wu, N.L., Kang, S.W., Hung, C.F. (2010). Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicology in Vitro*. 24(1):21-28.

Iqbal, K., Khan, A., Ali-Khan, M., Khattak, M.A. (2004). Biological significance of ascorbic acid (vitamin c) in human health – a review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3(1):5-13.

Isidorov, V.A., Vinogorova, V.T. (2003). GC-MS Analysis of Compounds Extracted from Buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 58:355-260.

Islam, M.N., Downey, F., Ng, C.K.Y. (2013). Comprehensive profiling of flavonoids in *Scutellaria incana* L. using LC-Q-TOF-MS. *Acta Chromatographica*. 25(3):555-569.

Jachak, S. M. (2006). Cyclooxygenase inhibitory natural products: current status. *Current Medicinal Chemistry*. 13(6):659-678.

Jeganathan, B., Punyasiri, P.A., Kottawa-Arachchi, J.D., Ranatunga, M.A., Abeysinghe, I.S.B., Gunasekare, M.T., Bandara, B.M. (2016). Genetic variation of flavonols quercetin,

myricetin, and kaempferol in the Sri Lankan tea (*Camellia sinensis* L.) and their health-promoting aspects. *International Journal of Food Science*. 2016:6057434.

Jerković, I., Mastelić, J. (2003). Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L.(*Salicaceae*). *Phytochemistry*. 63(1):109-113.

Jia, C., Zhu, Y., Zhang, J., Yang, J., Xu, C., Mao, D. (2017). Identification of glycoside compounds from tobacco by high performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion-trap tandem mass spectrometry coupled with electrospray ionization orbitrap mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 28:629-640.

José, C.V., Ma, L.B., Ines, C., Justen, B.W., Eduardo, N. (2015). On flavonoid accumulation in different plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*). *Frontiers in Plant Science*. 6:939.

Kato, Y., Nagao, A., Terao, J., Osawa, T. (2003). Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(5):1136-1139.

Katz, D.L., Doughty, K., Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants Redox Signal*. 15:2779-2811.

Kaur, H., Kaur, G. (2014). A critical appraisal of solubility enhancement techniques of polyphenols. *Journal of pharmaceuticals*. 1-14.

Kazarian, S.G., Martirosyan, G.G. (2002). Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP. *International journal of pharmaceuticals*. 232(1-2):81-90.

Khan, A.M., Qureshi, R.A., Ullah, F., Gilani, S.A., Nosheen, A., Sahreen, S., Laghari, M.K., Laghari, M.Y., Rehman, S.U., Hussain, I., Murad, W. (2011). Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(25):6017-6023.

Khiari, M., Kecherid, Z., Klibet, F., Elfeki, A., Shaarani, S., Krishnaiah, D. (2018). NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of *Pistacia lentiscus* essential oil. *Toxicology Reports*. 5:480-488.

- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*. 61(1):1361779.
- Khoza, B.S., Gbashi, S., Steenkamp, P.A., Njobeh, P.B., Madala, N.E. (2016). Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *South African Journal of Botany*. 103:95-100.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96(3):229-245.
- Kim, Y.S., Cho, I.H., Jeong, M.J., Jeong, S.J., Nah, S.Y., Cho, Y.S., Bae, C.S. (2011). Therapeutic effect of total ginseng saponin on skin wound healing. *Journal of Ginseng Research*. 35(3):360.
- Kirollos, F.N., Elhawary, S.S., Salama, O.M., Elkhawas, Y.A. (2019). LC-ESI-MS/MS and cytotoxic activity of three Pistacia species. *Natural Product Research*. 33(12):1747-1750.
- Kis, B., Avram, S., Pavel, I.Z., Lombrea, A., Buda, V., Dehelean, C.A., Danciu, C. (2020). Recent Advances Regarding the Phytochemical and Therapeutic Uses of *Populus nigra* L. Buds. *Plants*. 9(11):1464-1481.
- Kis, B., Pavel, I. Z., Avram, S., Moaca, E. A., Herrero San Juan, M., Schwiebs, A., Radeke, H.H., Muntean, D., Diaconeasa, Z., Minda, D., Oprean, C., Bojin, F., Dehelean, C.A., Soica, C., Danciu, C. (2022). Antimicrobial activity, in vitro anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of *Populus nigra* L. buds extract. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 22(1):74.
- Koczur, K.M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., Skrabalak, S.E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton transactions*. 44(41):17883-17905.
- Kooi-Yeong, K., Marie-Odile, P., Paul Nicholas, S., James, R.F. (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. *Molecules*. 22:1186.
- Kouamé, T.M., Siaka1, S., KASSI, A.B., SORO, Y. (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de

*Piliostigma thonningii* (Caesalpiniaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 15(1):97-105.

Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013:162750.

Kuś, P., Jerković, I., Jakovljević, M., Jokić, S. (2018). Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO<sub>2</sub> and its optimization by response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 152:128-136.

Kurakula, M., Rao, G.K. (2020). Moving polyvinyl pyrrolidone electrospun nanofibers and bioprinted scaffolds toward multidisciplinary biomedical applications. *European Polymer Journal*. 136:109919.

Lamblin, F., Hano, C., Fliniaux, O., Mesnard, F., Fliniaux, M.A., Lainé, E. (2008). Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *Médecine/Sciences*. 24(5):511-520.

Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P., Jiang, W.G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Investigated New Drugs*. 23:121-122.

Lavilla, I., Bendicho, C. (2017). Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. *Water Extraction of Bioactive Compounds*. 291-316.

Lee, Y.S., Cui, C.B., Kim, J.K., Bae, Y.S., Lee, J.Y., Kang, I.J., Lim, S.S. (2010). Inhibitory effect of populoside from the bark of *Populus nigra* on aldose reductase. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 53:729-733.

Lei, J., Xue, Y., Liu, Y.M., Liao, X., 2017. Characterization of major metabolites of polymethoxylated flavonoids in *Pericarpium Citri reticulatae* using liver microsomes immobilized on magnetic nanoparticles coupled with UPLC/MSMS. *Chemistry Central Journal*. 11(1):1-10.

Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125(2):288-306.

Letreuch-Belarouci, N. (1991). Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir. Ed. Office des Publications Universitaires. Alger. 1:618.

- Liazid, A., Barbero, G., Azaroual, L., Palma, M., Barroso, C. (2014). Stability of anthocyanins from red grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction conditions. *Molecules*. 19:21034.
- Lima, M.D.C., De Sousa, C.P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., De Souza, E.L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*. 130:259-270.
- Linton, R.E.A., Jerah, S.L., Bin Ahmad, I. (2013). The effect of combination of octadecanoic acid, methyl ester and ribavirin against measles virus. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 2(10):181-184.
- Lizarraga, D., Vinardell, M.P., Noe, V., Van Delft, J.H., Alcarraz-Vizan, G., Van Breda, S.G., Staal, Y., Gunther, U.L., Reed, M.A., Ciudad, C.J., Torres, J.L., Cascante, M.A. (2011). Lyophilized red grape pomace containing proanthocyanidin-rich dietary fiber induces genetic and metabolic alterations in colon mucosa of female C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition*. 141:1597-1604.
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chemistry*. 112:35-40.
- Lohézic-Le Dévéhat, F., Legouin, B., Couteau, C., Boustie, J., Coiffard, L. (2013). Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 120:17-28.
- Maack, A., Pegard, A. (2016). *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia*. 111:95-101.
- Macáková, K., Kolečkář, V., Cahlíková, L., Chlebek, J., Hošťálková, A., Kuča, K., Opletal, L. (2014). Tannins and their influence on health. *In Recent Advances in Medicinal Chemistry*. 1:159-208.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Allemand, C.J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Suisse. 1-185.

- Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut : *Cynara scolymus* L, *Nature & Technologie*. 9(2013):35-40.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5):727-747.
- Mansour-Djaalab, H., Kahlouche-Riachi, F., Djerrou, Z., Serakta-Delmi, M., Hamimed, S., Trifa, W., Djaalab, I., Hamdi Pacha, Y. (2012). In vitro evaluation of antifungal effects of *Lawsonia inermis*, *Pistacia lentiscus* and *Juglans regia*. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2(2):263-268.
- Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D. (1986). Determination of sun protection factor by spectrophotometry. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 61(3):121-124.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.T., Sekaki, A., Gardes-Albert, M. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. *Methods of Enzymology*. 234:462-475.
- Martín, J., Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., Asuero, A.G. (2017). Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. *Phenolic compounds-natural sources, importance and applications*. 117-152.
- Maske, P.P., Lokapure, S.G., Nimbalkar, D., Malavi, S., D'souza, J.I. (2013). In vitro determination of sun protection factor and chemical stability of *Rosa kordesii* extract gel, *Journal of Pharmacy Research*. 7:520-524.
- Mebirouk-Boudechiche, L., Cherif, M., Boudechiche, L., Sammar, F. (2014). Levels of primary and secondary compounds of foliage from fodder shrubs of Algerian wet area. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 165(11-12):344-352.
- Mehenni, C., Atmani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., Atmani, D. (2016). hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of food and drug analysis*. 24(3):653-669.
- Menakh, M., Mahdi, D., Boutellaa, S., Zellagui, A., Lahouel, M., Bensouici, C. (2020). In vitro antioxidant activity and protective effect of *Hertia cheirifolia* L. n-butanol extract against liver and heart mitochondrial oxidative stress in rat. *Acta Scientifica Naturalis*. 7(1):33-45.

- Merdana, I., Arjana, A.A.G., Widyastuti, S.K., Tetrana, T., Budiasa, K., Sudimartini, L.M., Sudira, I.W. (2020). Assessment of the dermal acute irritation potential of natural veterinary medicine minyak rajas in albino rabbits. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 32(10):17-24.
- Merghache, D., Boucherit-Otmania, Z., El Haci, I., Merghache, S., Chikhid, I., Boucherit, K. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Populus nigra* L. buds extracts. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. 1(1):1-8.
- Milia, E., Bullitta, S. M., Mastandrea, G., Szotáková, B., Schoubben, A., Langhansová, L., Quartu, M., Bortone, A., Eick, S. (2021). Leaves and fruits preparations of *Pistacia lentiscus* L.: a review on the ethnopharmacological uses and implications in inflammation and infection. *Antibiotics*. 10(4):425.
- Moldovan, C., Frumuzachi, O., Babot, M., Menghini, L., Cesa, S., Gavan, A., Sisea, C.R., Tanase, C., Dias, M.I., Pereira, C., Ferreira, I.C.F.R., Crişan, G., Mocan, A., Barros, L. (2021). Development of an optimized drying process for the recovery of bioactive compounds from the autumn fruits of *Berberis vulgaris* L. and *Crataegus monogyna* Jacq. *Antioxidants*. 10:1579-1600.
- Mole, S., Waterman, P.G. (1987). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*. 72:137-147.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2):211-219.
- Momić, T., Vujčić, Z., Vasić, V. (2008). Kinetics of inhibition of peroxidase activity of myeloperoxidase by quercetin. *International Journal of Chemical Kinetics*. 40(7):384-394.
- Morkhade, D.M. (2017). Evaluation of gum mastic (*Pistacia lentiscus*) as a microencapsulating and matrix forming material for sustained drug release. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 12(5):424-432.
- Mowbray, M., Tan, X., Wheatley, P.S., Morris, R.E., Weller, R.B. (2008). Topically Applied Nitric Oxide Induces T-Lymphocyte Infiltration in Human Skin, but Minimal Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*. 128(2):352-360.

- Nahida, A.S., Siddiqui, A.N. (2012). *Pistacia lentiscus* : A review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(4):16-20.
- Naczek M., Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1523-1542.
- Ncube, B., Ngunge, V.N.P., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2011). A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 134(3):775-780.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marce, R.M. (2010). Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. 29:752-764.
- Noreen, Y., Ringbom, T., Perera, P., Danielson, H., Bohlin, L. (1998). Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and-2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*. 61(1):2-7.
- Olba-Zięty, E., Stolarski, M.J., Krzyżaniak, M., Roj, E., Tyskiewicz, K., Luczynski, M.K. (2022). Supercritical production of extract from poplar containing bioactive substances and economic analysis. *Industrial Crops and Products*. 184:115094.
- Osamuyimen, O.I., Isoken, H.I., Vincent, N.C., Olohirere, E.U., Sunday, O.O., Emmanuel, E.O., Anthony, I.O., Etinosa, O.I. (2011). Polyphenolic contents and antioxidant potential of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *International Journal of Molecular Science*. 12:2958-2971.
- Ostolski, M., Adamczak, M., Brzozowski, B., Wiczowski, W. (2021). Antioxidant activity and chemical characteristics of supercritical CO<sub>2</sub> and water extracts from willow and poplar. *Molecules*. 26(3):545-560.
- 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.
- Özgüven, M., Tansi, S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turkish journal of Agriculture and Forestry*. 22(6):537-542.

- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2:270-278.
- Pasca, C., M, arghitas, L.A., Bobis, O., Dezmirean, D.S., Margaoan, R., Muresan, C. (2016). Total content of polyphenols and antioxidant activity of different melliferous plants. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*. 73(1):1-7.
- Peng, S., Wei, P., Lu, Q., Liu, R., Ding, Y., Zhang, J. (2018). Beneficial Effects of Poplar Buds on Hyperglycemia, Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Streptozotocin-Induced Type-2 Diabetes. *Journal of Immunology Research*. 2018:7245956.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*. 39:791-800.
- Perron, N.R., Hodgesj, N., Jenkins, M., Brumaghim, J.L. (2008). Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry*. 47(14):6153-6161.
- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M.K., Rzeski, W. (2017). LC-ESI-MS/ MS identification of biologically active phenolic compounds in *Mistletoe berry* extracts from different host trees. *Molecules*. 22(4):624-639.
- Piluzza, G., Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*. 49(3):240-247.
- Plaza, M., Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in Analytical Chemistry*. 71:39-54.
- Poblocka-Olech, L., Inkielewicz-Stepniak, I., Krauze-Baranowska, M. (2019). Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: Role of bioflavanones. *Phytomedicine*. 56:1-9.
- Popović, B.M., Stajner, D., Zdero-Pavlovic, R., Tubas-Saponjac, V., Canadanovic-Brunet, J., Orlovic, S. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus spp.*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 105:242-250.

- Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I., Kohen, R. (2007). Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 61:412-422.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. (269):337-341.
- Pritor, R.L., Liwei, G. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*. 66:2264-2280.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. 30:37-44.
- Rajamanikandan, S., Sindhu, T., Durgapriya, D., Sophia, D., Ragavendran, P., Gopalakrishnan, V.K. (2011). Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Mollugo nudicaulis* by In vitro Assays. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 45(4):310-316.
- Rameau, J.C., Mansion, D., Dumé, G., Gauberville, C. (2008). Flore forestière française tome 3, région méditerranéenne : Guide écologique illustré. France. p809.
- Ravi, H.K., Breil, C., Vian, M.A., Chemat, F., Venskutonis, P.R. (2018). Biorefining of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace using microwave hydrodiffusion and gravity, ultrasound-assisted, and bead-milling extraction. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 6(3):4185-4193.
- Razali, N., Razab, R., Junit, S.M., Aziz, A.A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food chemistry*. 111(1):38-44.
- 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.
- Reddy, D.B., Reddy, T.C.M., Jyotsna, G., Sharan, S., Priya, N., Lakshmi pathi, V., Reddanna, P. (2009). Chebulagic acid, a COX-LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 124(3):506-512.

- Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*. 7:274-286.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Natural Product Communications*. 10:1869-1876.
- Saha, M., Mukherjee, S., Das, S., Chowdhury, M., Das, M., Sarkar, S., Chatterjee, S. (2022). Phytonutrient screening and evaluation of in-vitro antibacterial activity of onion and garlic peels: a comparative study with the prospects of waste to wealth. *International Journal of Herbal Medicine*. 10(6):39-44.
- Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., Vuong, Q. (2020). Comparison of conventional extraction technique with ultrasound-assisted extraction on recovery of phenolic compounds from lemon scented tea tree (*Leptospermum petersonii*) leaves. *Helyon*. 6(4):3666.
- Salhi, A., Bellaouchi, R., El Barkany, S., Rokni, Y., Bouyanzer, A., Asehrou, A., Amhamdi, H., Hammouti, B. (2019). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Pistacia lentiscus* leaves. *Caspian Journal of Environmental Sciences*. 17:189-198.
- Sehaki, C., Jullian, N., Ayati, F., Fernane, F., Gontier, E. (2023). A Review of *Pistacia lentiscus* Polyphenols: Chemical Diversity and Pharmacological Activities. *Plants*. 12(2):279.
- Sengwa, R.J., Choudhary, S. (2014). Structural characterization of hydrophilic polymer blends/montmorillonite clay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*. 131(16): 40617-40628.
- Sergent, T., Piront, N., Meurice, J., Toussaint, O., Schneider, Y.J. (2010). Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. *Chemico-Biological Interactions*. 188(3):659-667.
- Sethia, S., Squillante, E. (2004). Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *International journal of pharmaceutics*. 272(1-2):1-10.

- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 18:757-781.
- Shams, K.A., Abdel-azim, N.S., Saleh, I.A., Hegazy, M.F., El-missiry, M.M., Hammouda, F.M., Bohouth, E., Tahrir, E. (2015). Green technology: economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7:1050-1074.
- Sharma, B.C. (2013). In vitro antibacterial activity of certain folk medicinal plants from Darjeeling Himalayas used to treat microbial infections. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4:1-4.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods engineering and technology. *Food Reviews International*. 21:139-166.
- Shindo, Y., Witt, E., Packer, L. (1993). Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3): 260-265.
- Shirzad, H., Niknam, V., Taheri, M., Ebrahimzadeh, H. (2017). Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. *Journal of Food Science and Technology*. 54:2361-2371.
- Siano, F., Cutignano, A., Moccia, S., Russo, G.L., Volpe, M.G., Picariello, G. (2020). Phytochemical characterization and effects on cell proliferation of lentisk (*Pistacia lentiscus*) berry oil: a revalued source of phenolics. *Plant Foods for Human Nutrition*. 75:487-494.
- Siddhurajub, P., Beckera, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp. Seed extracts. *Food Chemistry*. 101:10-19.
- Siler, B., Skoric, M., Misic, D., Kovacevic, B., Jelic, M., Patenkovic, A., Novicic, Z.K. (2014). Variability of European Black Poplar (*Populus nigra* L.) in the Danube Basin. Public Enterprise Vojvodinašume: Novi Sad. 9-28.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.

- Sizílio, R.H., Galvão, J.G., Trindade, G.G.G., Pina, L.T.S., Andrade, L.N., Gonsalves, J. K.M.C., Nunes, R.S. (2018). Chitosan/pvp-based mucoadhesive membranes as a promising delivery system of betamethasone-17-valerate for aphthous stomatitis. *Carbohydrate polymers*. 190:339-345.
- Sobiesiak, M. (2017). Chemical structure of phenols and its consequence for sorption processes. In Phenolic compounds-natural sources, importance and applications. *IntechOpen*. 4-28.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y. (2011). Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12(3):282-287.
- Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J. (2013). Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed Research International*. 2013:1-23
- Soto, L.M., Falque, E., Domingez, H. (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics*. 2(3):259-276.
- Souquet J.M., Cheyner V., Brossaud F., Moutounet M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*. 43(2):509-512.
- Souilah, N., Benabdallah, A., Bendif, H., Miara, M.D., Daoud, N., Mustafa, A.M., Yilmaz, M.A., Öztürk, M., Caprioli, G., Maggi, F. (2023). Ethnobotanical investigation of *Pistacia lentiscus* L. grown in El Kala (Algeria), and phytochemical study and antioxidant activity of its essential oil and extracts. *Natural Product Research*. 37(9):1583-1588.
- Souley Kallo, M., Adamou, R., Sawadogo, J., Ayouba Mahamane, A., Maman Maarouhi, I., Ikhiri, K. (2018). Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 12(2):867-880.
- Stuetz, W., Prapamontol, T., Hongsibsong, S., Biesalski, H.K. (2010). Polymethoxylated flavones, flavanone glycosides, carotenoids, and antioxidants in different cultivation types of tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. *Sainampueng*) from Northern Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26:6069-6074

Suksaeree, J., Siripornpinyo, P., Chaiprasit, S. (2017). Formulation, characterization, and in vitro evaluation of transdermal patches for inhibiting crystallization of mefenamic acid. *Journal of drug delivery*. 1-7.

Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2004). Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(2):170-173.

Sun, W., Chen, X., Nan, X., Zhang, J., Dong, L., Ji, W., Sheng, H., Zhou, Q. (2021). Inhibition of persimmon tannin extract on guinea pig skin pigmentation. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 20(8):2648-2656.

Swier, T.L., Chauhan, K., Paul, P.K., Mukhim, C. (2016). Evaluation of enzyme treatment conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *International Journal of Biology Macromolecules*. 92:867-871.

Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. (2007). Optimization of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*. 105:1268-1275.

Tanner, G.J., Moate, P.J, Davis, L.H., Laby, R.H, Yuguang, L., Larkin, P.J. (1995). Proanthocyanidins (condensed tannins) destabilise plant protein foams in a dose-dependent manner. *Australian journal of Agricultural Research*. 46:1101-1109.

Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*. 1217:2484-2494.

Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Science Food and Agriculture*. 80:1024-1032.

Trabelsi, H., Cherif, O.A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukchina, S., Mayer, P. (2012). Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry*. 131:2-6.

Tyśkiewicz, K., Konkol, M., Roj, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*. 23:2625.

- Valipour Noroozi, R., Valipour Noroozi, M., Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *International Electronic Journal of Medicine*. 4(1):11-17.
- Van Acker, S.A.B.E., Van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20:331-342.
- Vardar-Ünlü, G., Sibel, S., Unlu, M. (2007). Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1011-1017.
- Vieira, T.O., Seifriz, I., Charão, C.C., Oliveira, S.Q.D., Creczynski-Pasa, T.B. (2011). Antioxidant effects of crude extracts from Baccharis species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21:601-607.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8:303-313.
- Wagemaker, T.A.L., Carvalho, C.R.L., Maia, N.B., Baggio, S.R., Guerreiro Filho, O. (2011). Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. *Industrial Crops and Products*. 33:469-473.
- Wang, L., Li, D., Bao, C., You, J., Wang, Z., Shi, Y., Zhang, H. (2008). Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15:738-746.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116(1):240-248.
- Wang, Q., Ge, X., Tian, X., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, P. (2013). Soy isoflavone: the multipurpose phytochemical (Review). *Biomedical Reports*. 1:697-701.
- Wang, K., Zhang, J., Ping, S., Ma, Q., Chen, X., Xuan, H., Shi, J., Zhang, C., Hu, F. (2014). Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus×canadensis*). *Journal of Ethnopharmacology*. 155:300-311.

- Wijekoon, M.M.J.O., Bhat, R., Karim, A.A. (2011). Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior Jack.*) inflorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:615-619.
- Wurtz, N.R., Viet, A., Shaw, S.A., Dilger, A., Valente, M.N., Khan, J.A., Jusuf, S., Narayanan, R., Fernando, G., Lo, F., Liu, X., Locke, G.A., Kopcho, L., Abell, L.M., Sleph, P., Basso, M., Zhao, L., Wexler, R.R., Duclos, F., K. Kick, E.K. (2018). Potent Triazolopyridine Myeloperoxidase Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 9(12):1175-1180.
- Xu, B.J., Chang, S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*. 72:159-166.
- Yemmen, M., Landolsi, A., Ben Hamida, J., Mégraud, F., Trabelsi-Ayadi, M. (2017). Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia. *Molecular and Cellular Biology*. 63(9):87-95.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, C.L. (1993). Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(1):67-70.
- Yen, F.L., Wu, T.H., Tzeng, C.W., Lin, L.T., Lin, C.C. (2010). Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(12):7376-7382.
- Yuk, H.J., Ryu, H.W., Kim, D.Y., Park, M.H., Seo, W.D., Jeong, S.H., Oh, S.R. (2019). Comparison of flavonoid and policosanol profiles in Korean winter-spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivated in different regions. *Food Chemistry*. 279:202-208.
- Zhao, C., Cheng, H., Jiang, P., Yao, Y., Han, J. (2014). Preparation of lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer. *Food Chemistry*. 156:123-128.
- Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W., Khayata, W. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from Pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3):675-682.
- Zargham, H., Zargham, R. (2008). Tannin extracted from Sumac inhibits vascular smooth muscle cell migration. *Mcgill Journal of Medecine*. 11:119-123.

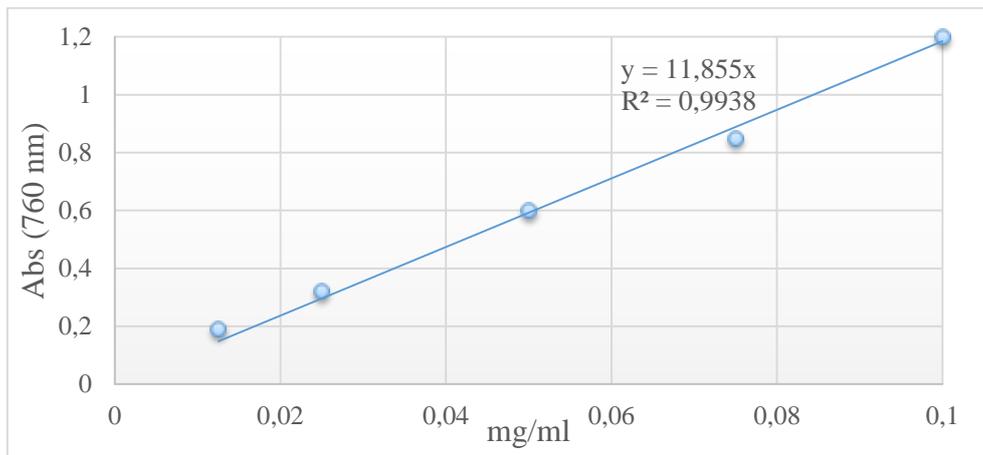
Zhang, H.F., Yang, X.H., Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology*. 22:672-688.

Zhang, Q., Lin, L., Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*. 13:1-26.

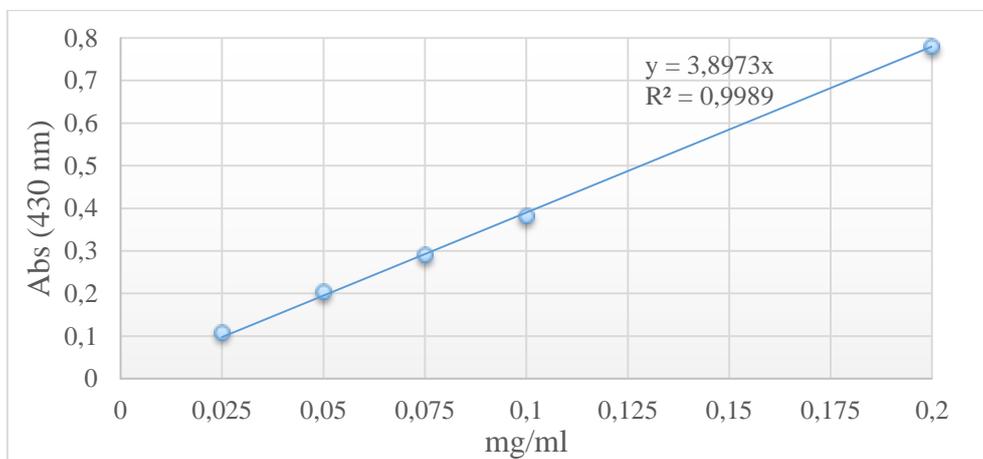
Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W., Zhao, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(9):11027-11043.

Zhuang, X., Zhang, Z., Wang, Y., Li, Y. (2018). The effect of alternative solvents to n-hexane on the green extraction of *Litsea cubeba* kernel oils as new oil sources. *Industrial Crops and Products*. 126:340-346.

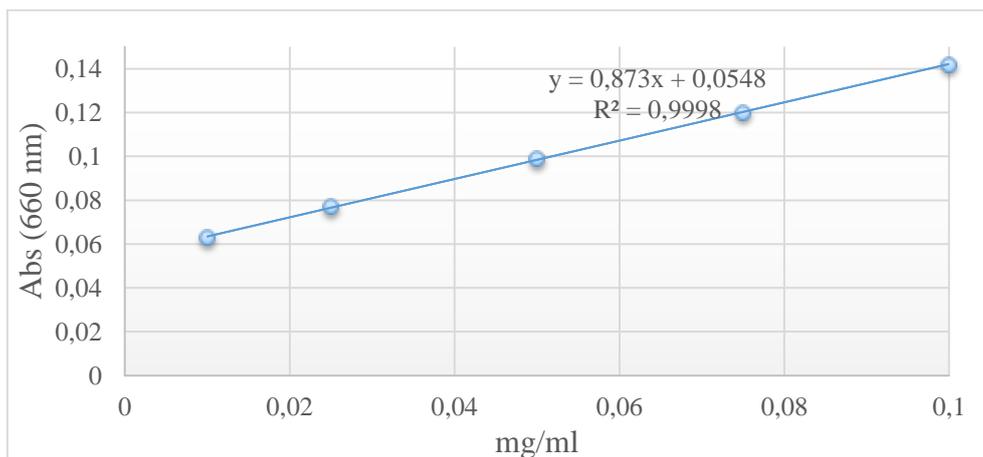
## Annexe I



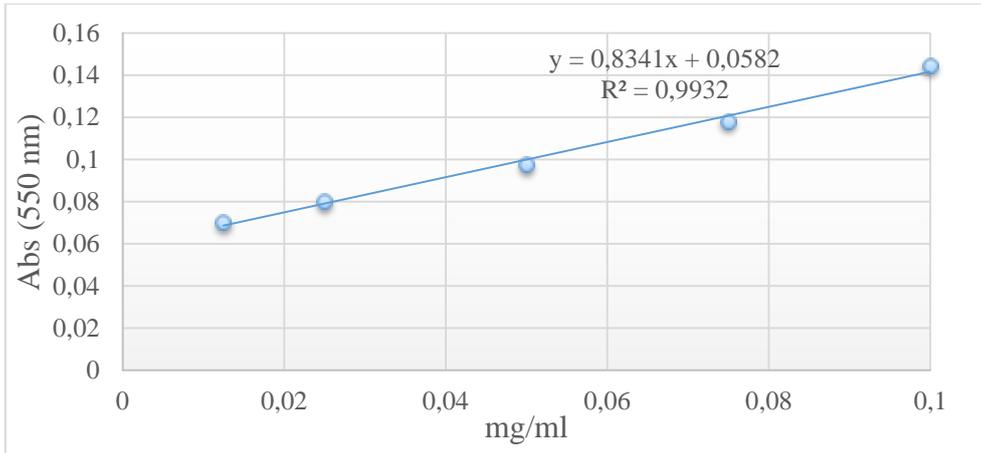
Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques



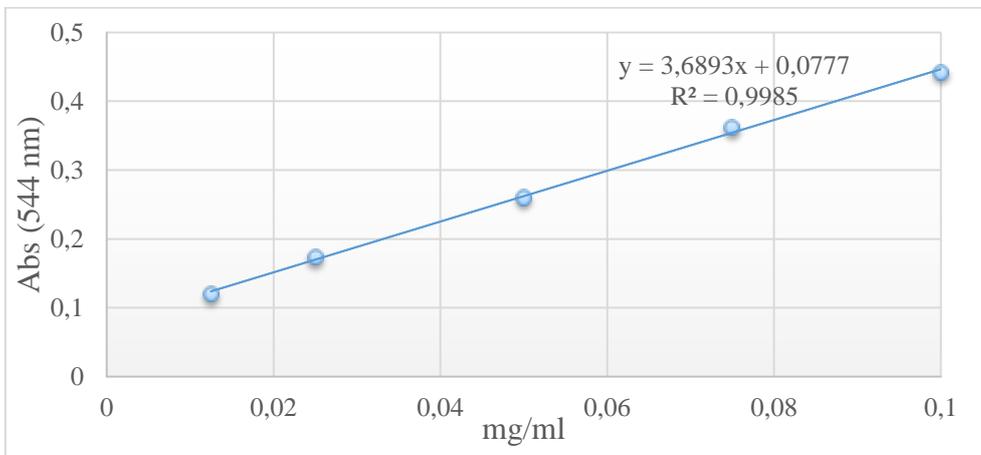
Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes



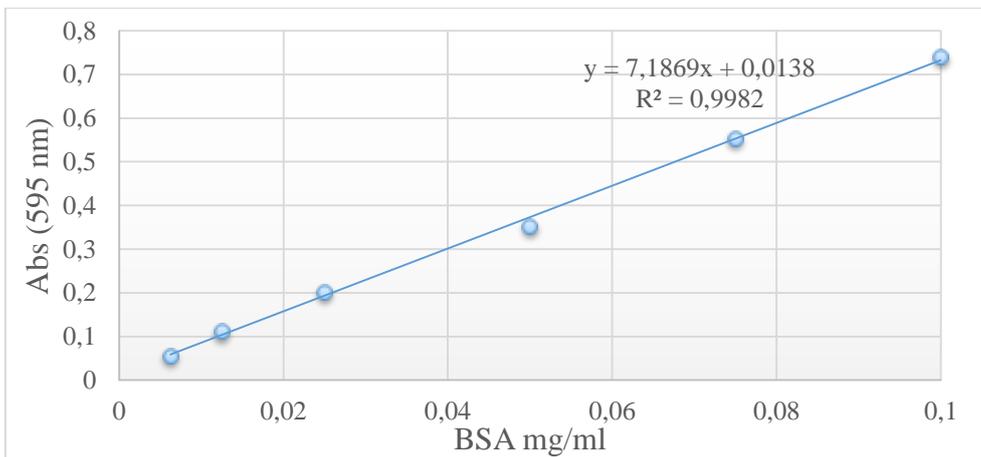
Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables



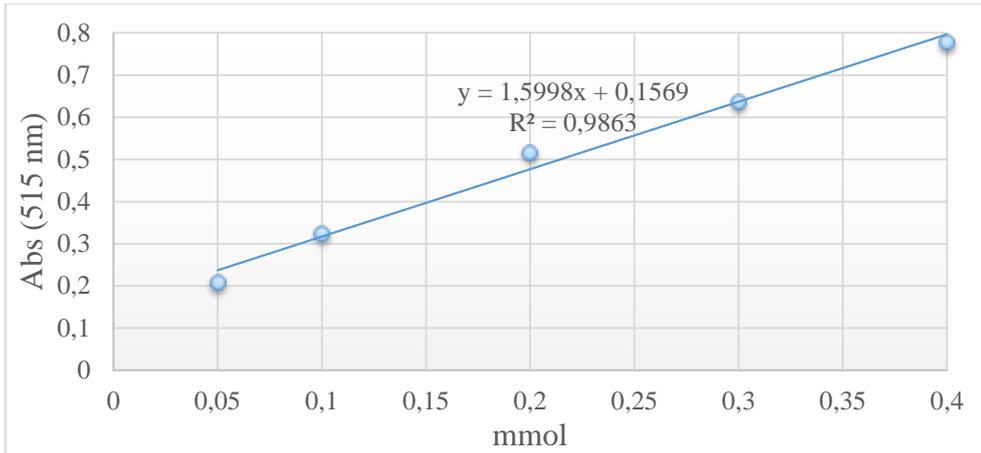
Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tanins condensés



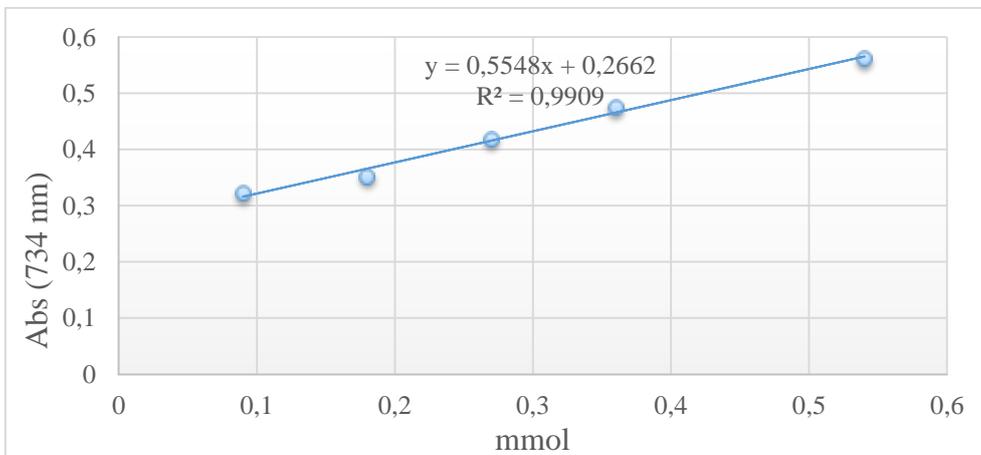
Courbe d'étalonnage de la diosgénine pour le dosage des saponines



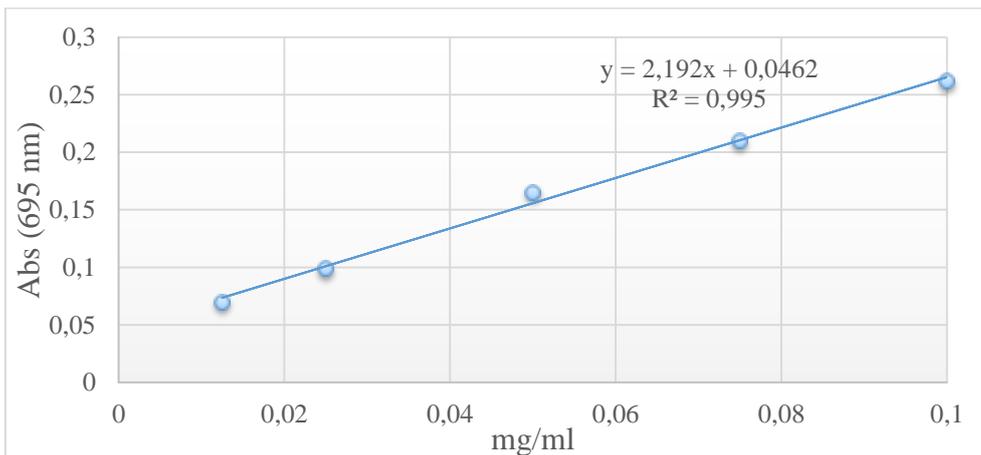
Courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines



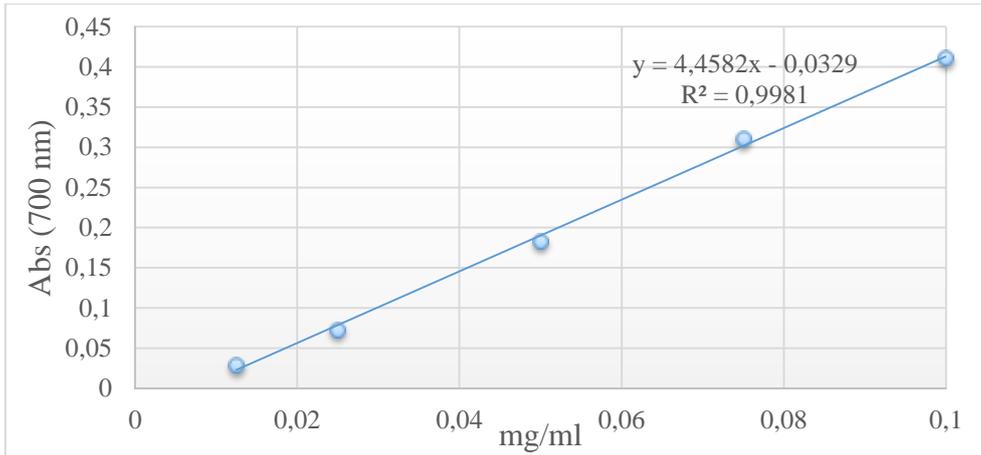
Courbe d'étalonnage de trolox dans le test d'inhibition du DPPH'



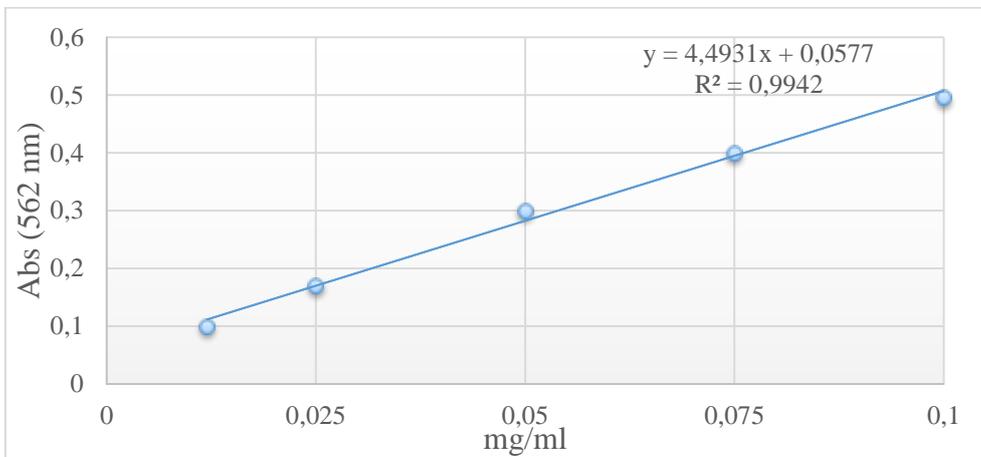
Courbe d'étalonnage de trolox dans le test d'inhibition d'ABTS<sup>+</sup>



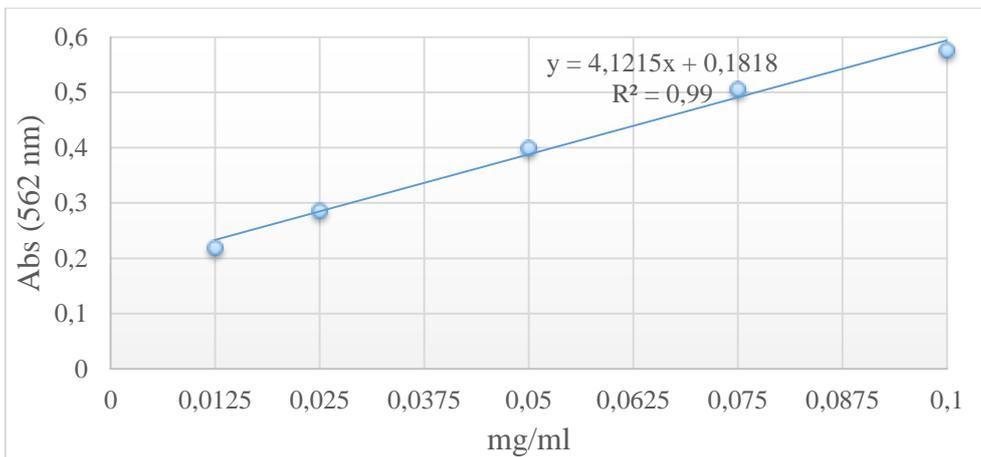
Courbe d'étalonnage d'acide gallique dans le test de phosphomolybdate



Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique dans le test de pouvoir réducteur



Courbe d'acide ascorbique dans le test d'inhibition du radical hydroxyle



Courbe d'étalonnage d'EDTA dans le test de chélation de fer

Tableau 1 : Correlation entre l'effet érythémogène (EE) et l'intensité du rayonnement pour chaque longueur d'onde (I).

Longueur d'onde ( $\lambda$ nm)	EE * I ( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## South African Journal of Botany

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sajb](http://www.elsevier.com/locate/sajb)

# A green approach for the sustainable and effective valorization from *Populus nigra* buds as a renewable source of high value-added extract using an alternative solvent with prospective application in skin care formulation

Sidali Zaidi<sup>a,\*</sup>, Nadjet Benaida-Debbache<sup>a,\*</sup>, Zeineb Medjahed<sup>b</sup>, Sara Oumenoune Tebbi<sup>a</sup>, Radia Kadi<sup>c</sup>, Naima Saidene<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Bejaia, Algérie

<sup>b</sup> Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Jijel, Algérie

<sup>c</sup> Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Bejaia, Algérie

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received 20 June 2023

Revised 19 August 2023

Accepted 27 August 2023

Available online 5 September 2023

Edited by: Prof U. Çakılcıoğlu

## Keywords:

*Populus nigra* L

Formulation

Ultrasound-assisted extraction

Lactic acid

LC-MS analysis

## ABSTRACT

Many studies have been conducted on the biological potential of medicinal plant extracts; the present study looked into the use of antioxidant extracts from *P. nigra* buds in cosmetic formulations to boost photoprotection potential, with a particular emphasis on green extraction and the biological activities of these compounds. Extraction of phenolic compounds using ultrasonically assisted lactic acid reported content of  $42.64 \pm 0.16$  mg GAE/g dw with an antioxidant potential of  $72.20 \pm 1.05$  mmol TE/100g dw and  $72.73 \pm 2.59$  mg AAE/g dw for DPPH\* and OH\* scavenging activities, respectively. Furthermore, a significant iron chelation capacity of the extract was recorded ( $104.45 \pm 1.66$  mg EDTA E/g dw). In addition, a strong anti-inflammatory activity of the extract was demonstrated ( $IC_{50}$ : 0.122 and 0.1788%) for the inhibition of the mono-nitrogen oxide radical and cyclooxygenase respectively. The evaluation of the photoprotective effect expressed a high protection factor (34.81) and no irritant effects. Chemical analysis of the crude extracts was carried out by FTIR, LC-MS and GC-MS. The FTIR spectral study revealed the presence of different functional groups such as alcohols, ketones and amines, indicating the richness of the extract in various metabolites. GC-MS and LC-MS studies revealed the presence of 15 bioactive compounds, of which 9 phenolics and 6 organic acid components were identified for the first time in *P. nigra* buds. This approach using lactic acid as an ecological solvent and ultrasound as an alternative energy source represents a good choice for the design of an extraction system of bioactive compounds with antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective properties. Further studies are needed to extend the screening approach anti-irritancy to develop antioxidant-enriched.

© 2023 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Many studies have argued the deleterious effects induced by ultraviolet radiation, mainly UVB, which can cause skin lesions and diseases such as edema, hyperpigmentation, erythema, sunburn and cancer. UVB-induced photodamage mainly, by stimulating pro-inflammatory cytokines expression, and matrix metalloproteinases and inducing an overproduction of reactive oxygen species (ROS). Therefore, Natural product-based drug discovery with strong antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective activity has raised considerable interest in the search for an effective strategy for

developing a therapeutic or cosmetic agent to treat skin damage and UVB-induced stress (Wang et al., 2021).

From this perspective, Botanical studies have considerably increased in recent years with the aim of implementing new natural substances derived from green chemistry. Many medicinal plants of about 70000 species have been used by humans to treat various diseases for thousands of years. In addition, the majority of the world's traditional communities still depend on traditional herbal treatments to cure their common ailments, as well as to protect their health. Today, nearly 25% of all medicines in the developed world contain components derived from medicinal plants (Balos, 2023; Selvi et al., 2022; Güler et al., 2021).

Our project takes into account environmental awareness and the 2030 Agenda for Sustainable Development including the efficient use of natural resources and the environmentally sound management of

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [sidali.zaidi@univ-bejaia.dz](mailto:sidali.zaidi@univ-bejaia.dz) (S. Zaidi), [nadjet.benaida@univ-bejaia.dz](mailto:nadjet.benaida@univ-bejaia.dz) (N. Benaida-Debbache).

chemicals and all wastes. In addition, a large number of investigations show that waste could be a valuable and low-cost alternative source for obtaining high-value compounds used in the pharmaceutical, medical or food industries, thus making it possible to implement the circular economy and reduce the production of organic waste (Palos-Hernández et al., 2022).

The buds of *P.nigra* constitute a renewable natural residue and a valuable source of bioactive compounds, responsible for antioxidant, anti-inflammatory, antifungal (Debbache et al., 2014), hepatoprotective, vasorelaxant (Debbache et al., 2013), antimicrobial (Vardar-Ünlü et al., 2008), anti-hyperuricemic, neuroprotector, (Debbache et al., 2018), antidiabetic (Peng et al., 2018) and anti-tumor properties (Kis et al., 2022). Several findings have elucidated that buds extract has beneficial effects against skin infections and anti-aging potential (Maack et al., 2016). Moreover, the buds were used traditionally as a tincture against asthma and other respiratory ailments, such as bronchitis, cough, trachea, laryngitis, sore throat and influenza. In addition, the buds were used to treat gout, pulmonary hemorrhage and as an ointment in the treatment of dermatological disorders such as ulcerations, hemorrhoids, anal pain, fissures and rheumatic inflammation (Kis et al., 2020). *P.nigra* is a species with a wide natural distribution. In Europe, it is found from the northern British Isles to the Mediterranean coast. At the southern end of its range, it is found in parts of North Africa and the Middle East. In the east, its range extends as far as Kazakstan and China. It is also cultivated in India between 26 and 29° N latitude and is naturalized in North and South America (Tebbi and Debbache, 2022).

To design a sustainable alternative in the extraction of bioactive compounds from natural waste following the basic principles of green chemistry, the ultrasound-assisted extraction using lactic acid represents an opportunity to develop a functional extract (Da Silva et al. 2022).

The present study aims to introduce a green extract based on *Populus nigra* buds obtained by a sustainable process in particular ultrasound-assisted extraction using lactic acid as agro solvent oriented for prospective application in skin care as a source of high value-added active compounds capable of reducing harmful damage caused by excessive exposure to solar radiation (UVB) through the evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective activity. In addition, the study of skin irritation and the identification of bioactive compounds were addressed in this work.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Instrumentation

Electric grinder (IKA WERKE), magnetic stirrer (AM4), refrigerated centrifuge (sigma) 2-16 PK, balance (AS 220/CI2), vortex (V-1 plus) BOECO, Ultrasonic LT-100 PRO (100 W/ 40 KHz), water bath (Memmert), spectrophotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), Microplate reader (BioTek Synergy HTX), Microplate incubator (Boeco), FTIR spectrophotometer (Shimadzu FTRI-8400s), LC-MS (Shimadzu LCMS 8040), GC-MS (Shimadzu QP2010 type EI 70ev).

### 2.2. Chemicals used

All reagents and chemicals used were of analytical grade: Ammonium hydroxide, Magnesium, were purchased from Biochem Chemopharma (USA), ethanol, glycerol, L-lactic acid, dimethylsulfoxide, 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis acid (ABTS), cyclooxygenase (COX), N, N, N'N'-tétraméthyl-1,4-phénylène-diamine, arachidonic acid, heme, potassium persulfate (99%), sodium salicylate were obtained from Sigma Aldrich (Germany), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, hydrochloric acid (HCl), NaOH, AlCl<sub>3</sub>, bovine serum albumin (BSA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (95%), tris-HCl (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub>), tris (Hydroxyméthyl)aminomethane are from Alpha Chemical (India),

gallic acid, quercetin, catechin, diosgenin, ascorbic acid, trolox, folin ciocalteu reagent was obtained from Chim-oz (French), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Sulfuric acid, coomassie brilliant blue G-250, phosphoric acid, trichloroacetic acid (TCA), polyvinylpyrrolidone, sodium-nitroprusside, a-naphthyl ethylenediamine, sulfanilic acid were obtained from Prolab (French). FeSO<sub>4</sub>, acetic anhydride, potassium ferrocyanide, ferric chloride FeCl<sub>3</sub> from Panreac (Spain).

### 2.3. Plant material

The fresh flower buds of *P.nigra* L. were harvested in March 2021 from a rural area of Marj Waman (GPS: 36.644° N, 4.921° E- Bejaïa province, Algeria). The plant name corresponds to the latest revised plant list (<http://plantlist.org>). The collected plant was authenticated in the laboratory of botany (University of Bejaïa, Algeria). A dried voucher specimen was archived in the Herbarium of medicinal plants (voucher N° ph001\_43) of the National Superior School of Agronomy of El Harrach, Algiers, (Algeria).

The harvested samples were washed and then dried in the oven at 40°C for 5 days, the dried sample was reduced to a powder of 63 µm using an electric mill (Kika Labortechnik, Staufen, Germany) and stored in the dark at -20°C until use

### 2.4. Animals

NMRI (Naval Medical Research Institute) females (6-7 weeks old, 30–35 g) from the Institut Pasteur in Algiers, Algeria, were used for this study. The animals were acclimatized to laboratory conditions two weeks before testing. They were housed under standard conditions (25 ± 1°C, 50% humidity, 12 h/12 h light/dark cycle) with access to standard food and water. Animals were handled according to the recommendations of the International Ethics Committee (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments).

### 2.5. Extraction procedure

In the present study, ultrasound-assisted extraction of active compounds was introduced under optimized conditions based on a preliminary study, briefly 10 g of plant powder was mixed with 100 ml lactic acid (67.5%) emerged for 20 min in an ultrasonic water bath (40 KHz) at 38°C. After the extraction, the mixture was centrifuged at 8000 g for 20 min and the resulting solution was transferred into 15 ml tubes and stored at -20°C for further analysis.

### 2.6. Phytochemical screening

Phytochemical analysis of the different constituents with pharmacological interest was performed on the crude extract using analytical techniques described in the literature (Gangwar et al., 2014; Haddouchi et al., 2016; Khan et al., 2011; Daira et al., 2016; Souley Kallo et al., 2018).

### 2.7. Detection of alkaloid

The formation of a reddish-brown precipitate after the addition of 1 ml of Dragendorff's reagent to the extract indicates the presence of alkaloids.

### 2.8. Detection of polyphenols

The presence of flavonoids was revealed using a volume of 0.5 ml of extract treated with 10 drops of concentrated hydrochloric acid and 2 mg of magnesium turnings. The pink-red or yellow coloration developed after three minutes of incubation at room temperature.

The existence of tannins was revealed by adding 8 drops of a ferric chloride solution (1%) to 1 ml of extract. The development of a

greenish coloration indicates the presence of catechic tannins or blue-blackish revealing the gallic tannins.

The anthocyanins were experimented by adding extract (5 ml) to 5 ml of sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and 5 ml of ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH). The color red in an acidic medium to purplish blue in the basic medium indicates the presence of anthocyanins.

To test the presence of leucoanthocyanins, extract (5 ml) and 4 ml of hydrochloric alcohol (Ethanol/Pure HCl 3/1 v/v) were introduced into a test tube and heated in a water bath at 50°C for 2 min. The appearance of a cherry red color indicates the presence of leucoanthocyanins.

To testify to the presence of coumarins, a volume of 0.5 ml of 10% Sodium hydroxide (NaOH) was added to 2 ml of extract. After heating (50°C/5 min) and cooling, 4 ml of distilled water was added and the solution becomes transparent compared to the control. If the coumarins were present, a solution turns cloudy after the addition of HCl with the formation of a precipitate.

The presence of quinones was detected by the addition of a few drops of 10% Sodium hydroxide (NaOH) to extract, when the aqueous phase turns yellow, red or purple, it indicates a positive result.

#### 2.8.1. Detection of glycoside

To detect saponins glycosides, 2 ml of extract was added to water (8 ml) and followed by vigorous shaking. The formation of a stable foam revealed their presence. The presence of cardiac glycoside in the extract was carried out using pyridine and an alkaline sodium solution of nitroprusside which showed a bright red color.

#### 2.8.2. Detection of steroids and terpenoids

The steroids were detected with a mixture of 5 ml of acetic anhydride, 5 ml of the extract and 0.5 ml of concentrated sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A violet coloration that turns blue and then green indicates a positive reaction. About the revelation of terpenoids, 5 ml of the extract is mixed with 2 ml of chloroform and 3 ml of concentrated sulfuric acid. The appearance of a reddish-brown ring at the interface indicates their presence.

#### 2.8.3. Detection of protein

Proteins were analyzed by the heat test, coagulation of samples when heated in boiling water indicates a positive test

### 2.9. Colorimetric assay

#### 2.9.1. Determination of polyphenols

The total polyphenol content of extracts was estimated by the Folin-Ciocalteu method (Moldovan et al., 2021). Briefly, 20  $\mu$ l of extract was combined with 100  $\mu$ l of Folin-Ciocalteu reagent solution (1/10). The mixture was carefully shaken and incubated at room temperature for 2 – 3 min, then 80  $\mu$ l of 7.5% sodium carbonate solution (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) were added and incubated for 30 min. The absorbance was measured at 760 nm using a UV spectrophotometer. Total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalent per g of dry weight (mg GAE/g dw).

#### 2.9.2. Determination of flavonoid content

The total flavonoid content was evaluated by the aluminum trichloride method (Djeridane et al., 2006) which consists of adding extract or standard (1 ml) to 1 ml of AlCl<sub>3</sub> solution (2% in methanol). After 15 min of incubation, the absorbance was read at 430 nm. Flavonoid content was expressed as mg quercetin equivalent per g dry weight (mg QE/g dw).

#### 2.9.3. Determination of tannin content

The estimation of the condensed tannin content was performed according to the protocol of Kouamé et al. (2021). A volume of 50  $\mu$ l of extract was mixed with 1.5 ml of methanolic solution of vanillin

(4%) followed by 750  $\mu$ l of concentrated hydrochloric acid solution. After 20 min of incubation, the absorbance was recorded at 550 nm. The results were expressed as mg tannic acid equivalent per g dry weight (mg TAE/g dw).

#### 2.9.4. Determination of saponin content

The determination of saponins was achieved according to the protocol of Ncube et al. (2011). A reaction mixture containing 250  $\mu$ l of extract, 250  $\mu$ l of vanillin (8%) and 2.5 ml of sulfuric acid (72%) was incubated at 60°C for 10 min. After cooling, the absorbance was measured at 544 nm. The results were defined as diosgenin equivalents per g of dry weight (mg DE/g dw).

#### 2.9.5. Determination of protein content

Proteins were quantified using the Bradford method described by Valipoor et al. (2015). Briefly, extract (50  $\mu$ l) was mixed with 200  $\mu$ l of the Bradford reagent. After incubation for 5 min, the optical densities are read at 595 nm. The protein content was expressed as mg bovine serum albumin equivalent per g of dry weight (mg BSAE/g dw).

### 2.10. Evaluation of antioxidant potential

#### 2.10.1. DPPH\* scavenging activity

The DPPH\* scavenging activity of plant extract was determined according to the method described by Ambarwati et al. (2021). Plant extract or standard (20  $\mu$ l) was added to 180  $\mu$ l of methanol DPPH\* solution (150 mM). After incubation at 37°C for 30 min, the absorbance was recorded at 515 nm. The scavenging potential of the extract was expressed as mmol Trolox equivalent per 100 g of dry weight (mmol TE/100 g dw).

#### 2.10.2. ABTS\*\* scavenging activity assay

The potential for anti-radical activity against the ABTS\*\* radical was evaluated using the method of Re et al. (1999). ABTS radical cation (ABTS\*\*) was prepared by mixing ABTS (7 mM) stock solution with K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2.45 mM) (1/1, V/V) and kept in the dark for 12 to 16 h. PBS solution (4 mM; pH 7.4) was diluted to obtain an absorbance of 0.700  $\pm$  0.02 at 734 nm. The Extract or standard (20  $\mu$ l) was added to 180  $\mu$ l of a free radical solution, and the absorbance was read at 30°C for 10 min. The scavenging potential of extracts was expressed as mmol Trolox equivalent per 100 g of dry weight (mmol TE/100 g dw).

#### 2.10.3. Reducing power

The reducing power was determined according to the method recommended by Menakh et al. (2020). A volume of 10  $\mu$ l of the extract or standard was mixed with 40  $\mu$ l of phosphate buffer and 50  $\mu$ l K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (1%), after incubation at 50°C for 20 min, 50  $\mu$ l of 10% TCA then 40  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O and 10  $\mu$ l of FeCl<sub>3</sub> (0.1%) were added. The absorbance was measured at 700 nm. The reducing power of the extract was expressed as mg ascorbic acid equivalent per g of dry weight (mg AAE/g dw).

#### 2.10.4. Test of molybdate phosphate

The total antioxidant activity was measured by the molybdate phosphate test according to the protocol of Prieto et al. (1999). A volume of 3 ml of reagent (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, 4 mM ammonium molybdate) was added to 0.3 ml of extract, then the mixture was incubated at 95°C for 90 min and the absorbance was read at 695 nm. The total antioxidant potential of extracts was expressed as mg gallic acid equivalent per g of dry weight (mg GAE/g dw).

### 2.10.5. Hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) scavenging activity

A reaction mixture (3 ml) containing: 1 ml  $\text{FeSO}_4$  (1.5 mM), 0.7 ml hydrogen peroxide (6 mM), 0.3 ml sodium salicylate (20 mM) and 1 ml of extract was incubated for 1 h at 37°C. Then, the absorbance of the hydroxylated salicylate complex was measured at 562 nm (Rajamanikandan et al., 2011). The scavenging activity was expressed as mg ascorbic acid equivalent per g of dry weight (mg AAE/g dw).

### 2.10.6. Chelating power of ferrous ions

The ferric ion chelating power of the extract was determined according to the method of Wang et al. (2009). A solution of extract or standard (100  $\mu\text{l}$ ) was mixed with 135  $\mu\text{l}$  of distilled water and 5  $\mu\text{l}$  of  $\text{FeCl}_2$  (2 mM), then the reaction was initiated by the addition of 10  $\mu\text{l}$  of ferrozine (5 mM). After mixing and incubation for 10 min at room temperature, the absorbance was recorded at 562 nm. The chelating power of the extract was expressed as mg Ethylenediamine-tetra-acetic acid equivalent per g of dry weight (mg EDTAE/g dw).

## 2.11. Anti-inflammatory activity

### 2.11.1. Nitric oxide radical scavenging assay

Nitric oxide radical ( $\text{NO}^\bullet$ ) was produced from sodium nitroprusside and measured by the Griess reaction according to the method described by Marcocci et al. (1994). Briefly, 50  $\mu\text{l}$  of sodium nitroprusside (10 mM) dissolved in PBS (pH 7.4) was mixed with 50  $\mu\text{l}$  of the test sample and incubated at 25°C for 150 min. The amount of  $\text{NO}^\bullet$  produced by sodium nitroprusside was determined by Griess' reagent (0.1% *a*-naphthyl ethylenediamine and 1% sulfanilic acid in 5% phosphoric acid) and measured at 564 nm. The activity of nitric oxide scavenging by the extract was expressed as percent inhibition determined according to the following equation (Eq. (1)):

$$\% = \frac{\text{Abs}(\text{ctrl}) - \text{Abs}(\text{ext})}{\text{Abs}(\text{ctrl})} \times 100 \quad (1)$$

$\text{Abs}_{(\text{ctrl})}$ : control absorbance

$\text{Abs}_{(\text{ext})}$ : extract absorbance

### 2.11.2. Cyclooxygenase inhibition

The COX-1 inhibitory activity of extracts was evaluated according to the method of Reddy et al. (2009). Briefly, 130  $\mu\text{l}$  of Tri-HCl buffer (100 mM), 10  $\mu\text{l}$  of heme (15  $\mu\text{M}$  in DMSO), 10  $\mu\text{l}$  of COX-1 enzyme (5U in Tris-HCl buffer) and 20  $\mu\text{l}$  of extract was transferred to a 96-well microplate. After shaking for 20 s, the plate was incubated at 25°C for 10 min. then, a volume of 20  $\mu\text{l}$  arachidonic acid (2.2 mM in ethanol/DMSO v/v) and 20  $\mu\text{l}$  TMPD (3 mg/ml in DMSO) were added with careful shaking to start the reaction. After incubation at 25°C for 10 min, the absorbance of each well was measured at 603 nm with a microplate reader and the results were expressed as percent inhibition (Eq. (1)).

## 2.12. Extract-charged particle-based formulation

The principle of this formulation is to disperse 5 ml of the crude extract stock solution with 35 ml of a 5% polyvinylpyrrolidone (PVP) solution under stirring for 30 min. The resulting preparation is then mixed with 60 ml glycerol and stored in an opaque flask. Organoleptic and physicochemical parameters such as appearance, color, pH, viscosity, density and spreadability were determined.

### 2.12.1. Protective activity against UVB radiation

To evaluate the protective activity of the extract against UVB radiation, the method of Mansur et al (1986) was adopted. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of the prepared formulation was measured in a spectrophotometer at wavelengths between 290 and 320 nm with intervals of 5 nm and the recorded absorbances were used to calculate the sun protection

factor value according to the following equation (Eq. (2)):

$$SPF : CF \times \sum_{290}^{320} EF(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (2)$$

EE: erythemogenic effect

I: the radiation intensity

Abs: absorbance of extract

CF: correction factor (=10)

### 2.12.2. Cutaneous irritation

The effect of dermal exposure to the extract on skin irritation was assessed *in vivo* on non-pregnant female NMRI albino mice. The backs and flanks of the mice were shaved using an electric clipper and 24 h later, 0.1 ml of the formulation was applied under a semi-occlusive dressing. The skin irritation index was assessed visually using the Draize score after 24, 48 and 72 h of extract application, and was expressed according to the following equation (Eq. (3)) (Merdana et al., 2020).

$$I.P = \sum I.C_{\text{moy}}/n \quad (3)$$

$\sum I.C$ : sum of the mean skin irritation indices obtained at each period n: number of reading periods

## 2.13. FTIR spectroscopy analysis

A drop of the extract was deposited between two KBr plates and for FT-IR measurement in the frequency range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  using a Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) of the type Agilent Cary 640.

## 2.14. GC-MS analysis

The extract was analyzed using a chromatography system (Shimadzu QP2010 type EI 70ev) coupled to a quadrupole mass spectrometer using an electron ionization (EI) source. A volume (2  $\mu\text{L}$ ) of the sample was injected into the GC-MS equipped with a split injector and an analytical column type SE 30 (25 m, 0.25  $\mu\text{m}$ ) connected to the system set at 93.9 kPa initiated at 50°C for 1 min, then heated to 125°C and 250°C at 5°C/min and maintained for 10 min using helium as a carrier gas (1 ml/min). The MS is used in ACQ mode sweeping from m/z 40 to 550.0 and in full scan mode mass spectra recorded in the range of 40 to 550 (m/z) were identified by comparing the mass spectra with the GC-MS library database version NIST 08-S.

## 2.15. LC-MS analysis

*P.nigra* bud extract was analyzed by LC-MS (Shimadzu LCMS 8040) coupled to Q-3 mass spectrometry in electrospray negative and positive ionization mode. Chromatographic separation was performed on a C18 XSelect column (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) with reversed phase. The mobile phase consisted of a mixture of acidified water (0.1%  $\text{HCOOH}$ ) (eluent A) and acetonitrile (eluent B) that evolved under the following gradient conditions: 0–3 min, 10% B; 3–6 min, 30% B; 6–10 min, 50% B; 10–15 min, 75% B; 15–20 min, 100% B; 20–24 min, 50% B; 24–28 min 30% B; 28–40 min 10% B.

The oven temperature of the HPLC technique was maintained at 40°C with a flow rate of 0.25 ml/min and a sample volume of 10  $\mu\text{l}$ . Compared to literature data ions were identified based on their exact mass (m/z), isotope ratio, and fragmentation path compared to literature data.

## 2.16. Statistical analysis

The results are expressed as means of three replicates  $\pm$  standard deviation. GraphPad Prism 5 program was used to compare the data by the analysis of the variance (ANOVA/MANOVA) and the differences among means were determined using the LSD test (Least Significant Difference) taking a significance level at  $p \leq 0.05$ . The means of the treatments were compared by student test and the least significant difference was calculated for  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Result and discussion

### 3.1. Phytochemical screening

The phytochemical screening of crude extracts of buds sample of *P.nigra* revealed the presence of some secondary metabolites such as flavonoids, catechic tannins, terpenoids, saponin, coumarin, cardiotonic glycoside and quinone. Also, the proteins known as antioxidants and anti-inflammatory compounds were detected (Table 1).

The use of lactic acid as a solvent showed a better extraction of the different chemical families compared to the result obtained by Merghache et al. (2018).

### 3.2. Colorimetric assay of various metabolites from *P.nigra* buds

Plant metabolites are important compounds in skin care formulations, in particular phenolic acids, flavonoids, saponins and amino acids acting as UV photo protectors that enhance epidermal antioxidant activity and prevent the deleterious symptoms of solar irradiation (Soto et al., 2015). However, developing an enriched extract for cosmetic purposes involving the use of an eco-extraction from a renewable source of active compounds under soft and green chemistry conditions is desired.

The quantification results are presented in Table 2, the recovery of phenolic compounds ( $42.64 \pm 0.16$  mg GAE/g dw) was found to be better than those obtained in the literature, including conventional ( $10.43 \pm 0.20$  mg GAE/g dw) and unconventional techniques ( $31.09$  mg GAE/g dw) (Kuš et al., 2018; Pietrzak et al., 2017). This increase in product yield was due to the effect of ultrasound, it has been shown that ultrasound waves through a liquid medium induce cavitation that generates a rupture of the plant wall and a release of bioactive compounds for enriching the extract (Chemat et al., 2017).

In addition, the phenolic content was significantly better than the contents found in wood and bark obtained by the supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) extraction method ( $17.30 \pm 0.94$  mg GAE/g dw) and ( $7.00 \pm 0.11$  mg GAE/g dw), respectively. The phenolic content obtained by maceration was recorded in roots and leaves at  $17.5 \pm 1.2$  mg GAE/g dw and  $12.1 \pm 0.8$  mg GAE/g dw respectively (Ostolski et al., 2021; Hachani et al., 2019). Phenolic compounds

**Table 1**  
Qualitative phytochemical analysis of *P.nigra* L. buds extract.

Plant constituents	Extract
Alkaloid	–
Flavonoid	+
Gallic tannin	–
Catechic tannin	+
Anthocyan	–
Leuco Anthocyanin	–
Terpenoid	+
Saponin	+
Protein	+
Coumarin	+
Cardiotonic Glycoside	+
Quinone	+

**Table 2**  
Phytochemical analysis of *P.nigra* extract.

Plant compounds	The content (mg E/g dw)
Polyphenols	$42.64 \pm 0.16$ (mg GAE/g dw)
Flavonoid	$10.07 \pm 0.71$ (mg QE/g dw)
Condensed Tannin	$6.75 \pm 0.77$ (mg TAE/g dw)
Saponin	$66.15 \pm 6.65$ (mg DE/g dw)
Protein	$50.72 \pm 1.05$ (mg BSAE/g dw)

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three determinations.

extraction richness and yield for green extraction method from buds prompted us to investigate the biological potential of the extract.

Our results are still better than those found in other species of the same populus genus, with levels of 35.7 mg GAE/g dw for the hydroalcoholic extract of *P.tremula* cortex, 20.93 mg GAE/g dw and 5.18 mg GAE/g dw for the hydroalcoholic extract of *Populus spp* leaves and roots, respectively, and 33.1 mg GAE/g dw recorded in *Salix alba*, a species belonging to the same family (Golubkina et al., 2022 ; Popović et al., 2016).

Quantification of flavonoids and catechic tannins revealed content of  $10.07 \pm 0.71$  mg QE/g dw and  $6.75 \pm 0.77$  mg TAE/g dw respectively, this flavonoid content is better than that expressed in aqueous extracts of order  $5.54 \pm 0.002$  mg QE/g and 1.52 mg QE/g dw reported by Paşca et al. (2016) and Olba-Zięty et al. (2022), respectively. Furthermore, the results obtained by the ultrasound-assisted extraction method are better than those reported by Olba-Zięty et al. (2022) with the supercritical extraction method of order 1.33 QE/g dw as well as superior to those obtained with Ostolski et al. (2021) in wood and bark of *P.nigra* obtained respectively by scCO<sub>2</sub>  $0.88 \pm 0.04$ ;  $10.28 \pm 0.13$  mg QE/g dw, scCO<sub>2</sub>-water  $1.85 \pm 0.03$ ;  $0.95 \pm 0.01$  mg QE/g dw and water  $0.49 \pm 0.02$ ;  $1.12 \pm 0.01$  mg QE/g dw. These results indicate the effectiveness of ultrasound in extracting this class of secondary metabolites, compared to other methods. While, the obtained tannin content is lower than that expressed in the aqueous extract from different *P.nigra* biomass such as leaf ( $10.9 \pm 0.6$ ), root extract ( $11.7 \pm 0.8$ ) and litter extract ( $15.9 \pm 1.1$ ) mg TAE/ g dw (Hachani et al., 2019).

The variations observed in the results for total flavonoid and tannin contents could be due to various factors such as climatic factors, plant matrix noted vegetative season, harvesting period and extraction technique, as well as solvent properties. It has also been shown that the extraction efficiency of this class of metabolite can be influenced by the degree of polarity of the solvent, as well as by the chemical nature of the plant matrix components (Dai and Mumper, 2010). Our data underline that the extract of *P.nigra* buds is a valuable source of phenolic compounds to be valorized as a natural waste product.

Saponins and proteins are increasingly appreciated for their biological activities. In this study, a concentration of  $66.15 \pm 6.65$  mg DE/g dw;  $70.50 \pm 4.56$  mg BSAE/g dw, respectively were obtained. Saponins and proteins are promising compounds in pain-relieving, anti-inflammatory effects and skin healing (Kim et al., 2011; Barba et al., 2008). The results validate the use of the extract for body care cosmetic products. In addition, *P.nigra* buds can be considered as a protein-rich biomass waste compared to food waste such as *Cucumis sativus* peel ( $63.59 \pm 0.13$  mg BSAE/g dw), *Solanum tuberosum* peel ( $46.50 \pm 0.20$  mg BSAE/g dw), onion peel ( $38.07 \pm 0.86$  mg BSAE/g dw) and garlic peel ( $33.17 \pm 0.33$  mg BSAE/g dw) (Biswas et al., 2021; Saha et al., 2022).

### 3.3. Antioxidant activity of the crude extract

The phytochemicals reported in Table 2 are known to have medicinal importance. In this study, several complementary methods were

used to evaluate the antioxidant activity of the plant extract. Table 3 presents the results of free radical scavenging activity, total antioxidant activity, reducing and chelating power of the extracts.

The free radical scavenging activity of *P.nigra* bud extract was examined using DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> methods. The results revealed an antioxidant potential with a value of  $72.20 \pm 1.05$  mmol TE/100 g dw and  $24.19 \pm 1.01$  mmol TE/100 g dw respectively. According to Dawidowicz et al. (2006), this activity is closely linked to antioxidant substances, in particular to the number of hydroxyl groups on the phenolic ring via a hydrogen atom transfer mechanism that neutralizes free radicals at their aromatic ring structures which allows delocalization of the unpaired electron (Ivanova et al., 2020). Although *P. nigra* buds are the main source of propolis, studies on Romanian propolis samples reported weak antioxidant activity of order  $4.92 \pm 0.01$  and  $12.16 \pm 0.20$  (mmol TE/100 g dw) against DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>, respectively. These results suggest that this extraction method is an alternative process for preserving the antioxidant properties of the extract and the phytochemicals compounds of *P.nigra* buds that should be explored as a potentially novel and effective natural antioxidant in the prevention of UVB-induced oxidative stress (Gatea et al., 2015).

The antioxidant-reductive potential of *P.nigra* extract was evaluated by the iron-reducing power test and the phosphomolybdenum method, which assess the capacity of the extract to reduce metals and the generation of free radicals involved in lipid peroxidation (Shahidi et al., 2015).

The phosphomolybdenum test of the extract showed a potential of  $162.88 \pm 6.52$  mg GAE/g dw while the reducing power expressed a value of  $56.86 \pm 0.53$  mg AAE/g dw which is significantly higher than that reported by Popović et al. (2016) in leaves (7.64 to 10.51 mg AAE/g dw) and roots (2.15 to 2.69 mg AAE/g dw) of hybridized *P. nigra*. This study demonstrates the ability of the extract antioxidants to reduce metal ions based on single or multiple electron pair transfer reactions.

When evaluating the reducing potential of a plant extract, it is always preferable to perform complementary tests such as chelating power as well as the inhibition of the hydroxyl radical which is a highly reactive species that causes significant damage to biomolecules (Shahidi et al., 2015).

In the present study, the hydroxyl radical scavenging potential of the extract was  $72.73 \pm 2.59$  mg AAE/g dw. This scavenging capacity had already been demonstrated by Debbache et al. (2014). In addition, the chelating activity recorded is of the order of  $104.45 \pm 1.66$  mg EDTAE/g dw which is higher than some plants used in the cosmetics industry such as olive stones ( $8.14 \pm 0.41$  mg EDTAE/g dw), Cinnamon ( $1.32 \pm 0.05$  mg EDTAE/g dw); Clove ( $3.37 \pm 0.08$  mg EDTAE/g dw), Star Anise ( $0.63 \pm 0.15$  mg EDTAE/g dw), Turmeric ( $2.16 \pm 0.08$  mg EDTAE/g) (Djemaa-Landri et al., 2021; Ali et al., 2021). Indeed, the activity obtained can be attributed to the presence of flavonoids, which are good chelators of iron, one of the mechanisms of their antioxidant activity mediated by interaction with the 5-hydroxy-4-carbonyl, 3-hydroxy-4-oxo or ortho-dihydroxybenzene group present on ring B (Mira et al., 2002).

**Table 3**  
Antioxidant potential of *P.nigra* crude extract.

Type of Assay	Antioxidant potentiel
DPPH <sup>•</sup>	$72.20 \pm 1.05$ (mmol TE/100g dw)
ABTS <sup>•+</sup>	$24.19 \pm 1.01$ (mmol TE/100g dw)
TAC	$162.88 \pm 6.52$ (mg GAE/g dw)
Reducing power	$56.86 \pm 0.53$ (mg AAE/g dw)
Chelating power	$104.45 \pm 1.66$ (mg EDTAE/g dw)
OH <sup>•</sup>	$72.73 \pm 2.59$ (mg AAE/g dw)

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three determinations.

Based on these data, the extract is a good scavenger of hydroxyl radicals OH<sup>•</sup> and iron chelators as well as it is likely to inhibit and stabilize the reactions of decomposition of hydroperoxides involved in the chain of lipid peroxidation.

### 3.4. Anti-inflammatory activity

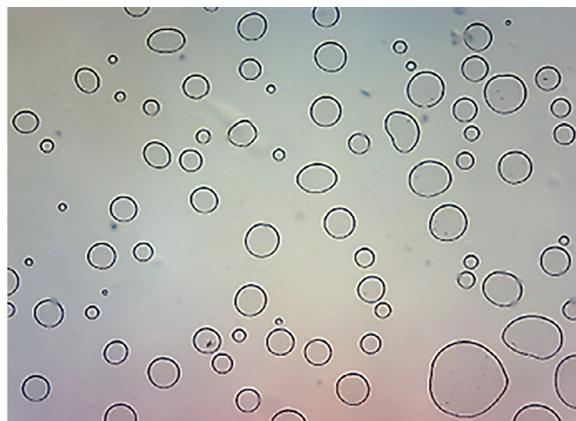
Nitric oxide radical scavenging assay is the most common assay to measure the anti-inflammatory potential of the extract which expressed a percentage of inhibition ranging from 33.78 to 94.96% corresponding to a concentration of 0.006 to 1.56% crude extract with a IC<sub>50</sub> of 0.122%. While the inhibitory effect on cyclooxygenase showed a percentage of inhibition ranging from 13.95% to 94.42%, respectively for a concentration of 0.0078125 to 0.5% of the crude extract with a IC<sub>50</sub> of 0.1788%.

Indeed, nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>) is a signaling molecule that regulates various cellular functions in several organs and tissues, including the epidermis. Physiological levels of NO<sup>•</sup> are necessary to maintain normal cellular function in the skin. Consequently, excessive secretion of NO<sup>•</sup> presents pro-inflammatory properties via the cyclooxygenase pathway which can be triggered by UV exposure (Man et al., 2022). In addition, topical application of a cyclooxygenase inhibitor was an effective treatment for reducing many signs of UVB-mediated inflammation including edema, skin myeloperoxidase activity, neutrophil infiltration and prostaglandin (Kim et al., 2006). To this end, the extract exerts a significant anti-inflammatory activity that may be considered as a prospective strategy for effective topical treatment in preventing the development and progression of inflammatory damage caused by long-term UV exposure.

Furthermore, the data obtained confirm the traditional use of buds as much as anti-inflammatory ointment mainly related to the presence of several flavanones and phenolic acids. Moreover, the results expressed are in agreement with subsequent studies reported by Debbache et al. (2013) on the ethanolic extract of *P.nigra* buds and Poblocka-Olech et al. (2019) on the methanolic extract of *P.nigra* L. *P.berolinensis* and *P.lasiocarpa* buds.

### 3.5. Formulation characteristics

In the present study, extract-loaded particles were synthesized by the solid dispersion method using PVP as a matrix hydrophilic support, with wide application in pharmaceutical sciences which allows to improve the stability and dissolution of molecules. Fig. 1 shows that the extract is successfully integrated into PVP in spherical form, this integration is mediated through intermolecular hydrogen bonding between terminal hydroxyl groups of extract compounds and carbonyl groups of PVP (Zhao et al., 2014).



**Fig. 1.** Observation of extract-loaded PVP particles by light microscope.

**Table 4**  
Results of formulation of physicochemical evaluation parameters.

Formulation	ph	Viscosity (Pa.s)	Density	Spreadability (cm <sup>2</sup> /g)	Aspect	Color
	1.95	0.035132	1.168	859.67	homogeneous viscous	Light yellow-green

On the other hand, the formulation prepared by dispersion of the particles in the glycerol showed quality indices that meet customer requirements (Table 4), in particular an acid pH equal to 1.95. Indeed, a rather acidic pH helps to limit bacterial growth and strengthen the protective film hydro-lipidic which is located on the surface of the epidermis. In addition, the density and viscosity which are involved in the application texture showed an index of 1.168 and 0.0351 Pa.s, respectively. The spreading capacity of 859.67 cm<sup>2</sup>/g allows the formation of an occlusive film on the epidermis and facilitates the diffusion of active ingredients.

### 3.6. Protective activity against UVB radiation

The sun protection factor (SPF) is an essential index in the pharmaceutical and cosmetic preparation of sunscreen creams and products. These sunscreen products can be classified according to their SPF values into minimal (SPF < 12), moderate (SPF 12–30) and high (SPF ≥ 30) sunscreen products. The present study reveals that the tested extract has a high sunscreen potential of order 34.81 ± 0.07. This is probably due to the content of phenolic compounds but also to the structure of some flavonoids and/or other phenolic compounds. Similarly, Napagoda et al. (2016) showed that the presence of secondary metabolites with antioxidant properties could be responsible for the high UV absorption which agrees with the results obtained previously in phytochemical screening and antioxidant activity.

In general, herbal formulations contain one or more active sunscreen agents with antioxidant properties with a good photoprotective effect. Moreover, the integration of antioxidants in sunscreens is widely recommended to limit the production of free radicals and the depletion of antioxidant enzymes induced by UV rays. For this purpose, the extract can be oriented towards a formulation as a natural sunscreen.

### 3.7. Toxicity study

The present study was focused on the potential cutaneous effects of *P.nigra* extract-loaded PVP particle-based formulation

**Table 5**  
Observation of skin manifestations of crude extract.

Period	Crude Extract		IC	IP
	Erythema	Edema		
24h	0	0	0	0
48h	0	0	0	0
72h	0	0	0	0

characterized by redness and oedema during regular intervals from 24 to 72 h (Table 5).

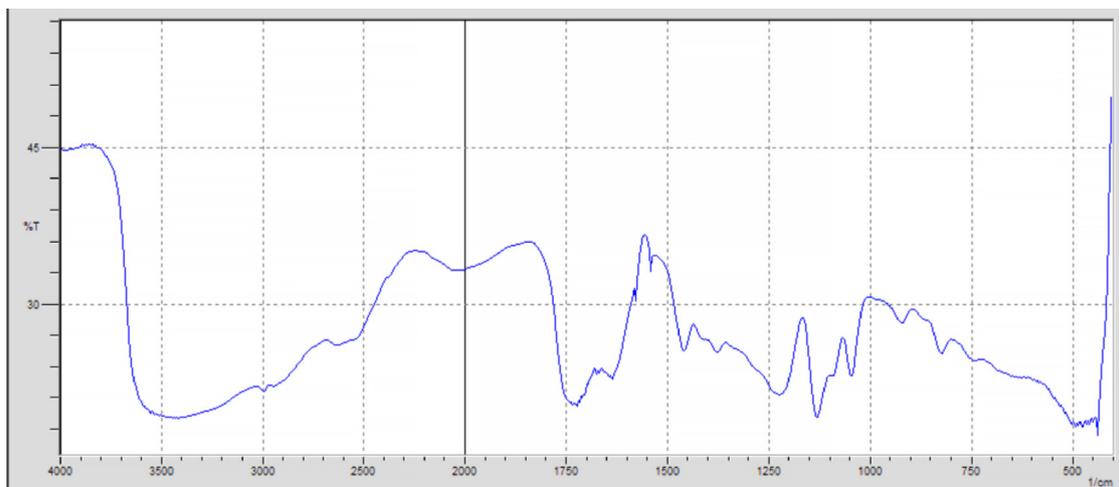
The obtained results revealed that during regular intervals from 24 to 72 h the extract formulation showed a maximum skin compatibility (reaction grade 0) since no irritation reaction was observed which corresponds to a primary irritation index IC:0. In our previous study we reported that ethanolic extract of *P.nigra* (200 mg/kg) administered to mice has no toxic effect (Debbache et al., 2013). In addition, it has been established that 0.1% of *P.nigra* preparation showed a low toxicity on the reconstructed human epidermis as well as the absence of toxicity in human skin (Maack and Pegard, 2016) which revealed the safety aspects of phenolic-rich plant extract.

### 3.8. FTIR analysis

To investigate the chemical composition of the *P.nigra* extract, FTIR was used, and the results are displayed in Fig. 2.

The FTIR analysis of *P.nigra* extract (Table 6), revealed several bands at 824.31 cm<sup>-1</sup>, 920.78 cm<sup>-1</sup>, 1044.38 cm<sup>-1</sup>, 1131.81 cm<sup>-1</sup>, 1231.29 cm<sup>-1</sup>, 1379 cm<sup>-1</sup>, 1638.25 cm<sup>-1</sup>, 1731.71 cm<sup>-1</sup>, 2991.12 cm<sup>-1</sup>, 3498.76 cm<sup>-1</sup>.

According to the literature, the band 824.3 cm<sup>-1</sup> corresponds to the epoxy group (Sharma et al., 2021), 923.85 cm<sup>-1</sup> is suitable to group C=C (Rabie et al., 2019) and 1044 cm<sup>-1</sup> is assigned to the function C = O (Sharma et al., 2020), 1124.94 cm<sup>-1</sup> to carbonyl and alcohol group (Rajkuberan et al., 2017), 1235 cm<sup>-1</sup> corresponds to the function C-O (Zhuang et al., 2020) and 1379 cm<sup>-1</sup> corresponds to the grouping C=C stretching aromatics (Ramadhan et al., 2018; Pawlicka



**Fig. 2.** FTIR spectra related to *P.nigra* buds extract.

**Table 6**  
Result of infrared spectra of the raw extract of *P.nigra* buds.

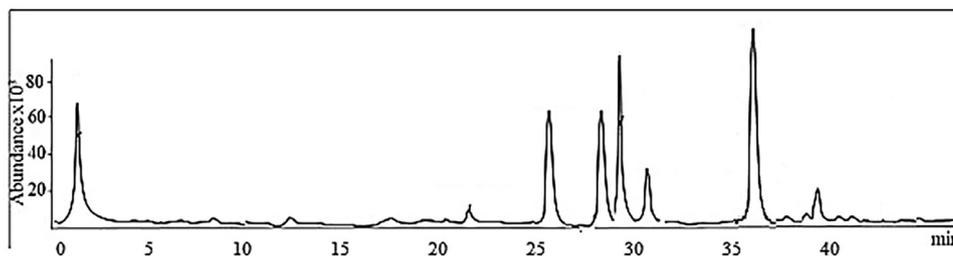
Band (cm <sup>-1</sup> )	Transmittance (%)	Assignments
824.31	25.14	824.3 cm <sup>-1</sup> (C–O–C)
920.78	28.08	920.39 cm <sup>-1</sup> (C=C)
1044.38	23.27	1044 cm <sup>-1</sup> (C=O)
1131.81	19.16	1124.94 cm <sup>-1</sup>
1231.29	21.27	1235 cm <sup>-1</sup> (C–O)
1379	25.26	1379 cm <sup>-1</sup> (C=C)
1638.25	22.92	1636 cm <sup>-1</sup> and 1639 cm <sup>-1</sup> (C–O) or (NH)
1731.71	20.45	1731.9 cm <sup>-1</sup> (C=O)
2991.12	21.74	3000–2800 cm <sup>-1</sup> (C–H) or (NH <sub>3</sub> )
3498.76	19.28	3 500–3 300 cm <sup>-1</sup> (O–H)

et al., 2019). The band 1639 cm<sup>-1</sup> was attributed to C=O stretch and a small contribution from NH (Rajkuberan et al., 2017), 1731.9 cm<sup>-1</sup> corresponds to the grouping C=O (Li et al., 2013), 2800–3000–cm<sup>-1</sup> is due to the C–H grouping stretching of carboxylic acids and NH<sub>3</sub> stretching of the free amino acid band (Cengiz et al., 2019), 3300–3500 cm<sup>-1</sup> is attributed to hydrogen-related vibration and O–H stretching of the hydroxy group (Sharma et al., 2021).

Infrared analysis of the extract showed absorption bands attributed to the functional groups of phenol and alcohols, amines, flavonoids and terpenes that exert an antioxidant potential.

### 3.9. Identification of organic acids using GC-MS

The GC–MS analysis of lactic acid extract from *P.nigra* buds detected the presence of 6 phytochemical compounds (Fig. 3) with

**Fig. 3.** GC-MS chromatogram of crude extract of *P.nigra*.**Table 7**  
Compounds identified from the crude extract of *P.nigra* through GC-MS analysis.

Peak	m/z	Rétention time	Compounds name	area	Bioactivity
1	74	26.367	Hexadecanoic acide methyl ester	3179185	Antifungal, antioxidant and antibacterial activity (Ali et al., 2017)
2	67	29.340	8,11-Octadecenoic acid (z)- methyl ester	888108	Not reported
3	55.05	29.537	9-Octadecenoic acid (z)- methyl ester	25929482	Antimicrobial and nematocidal (Ali et al., 2017)
4	74	30.105	Octadecenoic acid methyl ester	673028	Anti-viral, anti-microbial (Linton et al., 2013)
5	148.95	36.517	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2ethyl-hexyl) ester	48081596	Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral (Ali et al., 2017)
6	57.05	39.461	Hexatriacontane	307919	Antimicrobial, antioxidant, antiproliferative, activity (Arun et al., 2017)

**Table 8**  
Identification of phenolic compounds in the extract of *P.nigra* L. buds in positive ionization mode with LC-MS.

Peak	Retention time (min)	Molecular peak [M+H] <sup>+</sup>	Basic peak	Fragments	Molecular name	Refs.
1	10.756	331	331.50	309	Disaccharide (glu-rha)	(Jia et al., 2017)
2	11.802	389	389.55	374, 389	Polymethoxylated flavonoids.	(Lei et al., 2017)
3	12.117	411	389.50	374, 389, 411	Polymethoxylated flavonoids Isomer	(Lei et al., 2017)
4	12.690	447	447.55	426, 447	Not identify	
5	13.088	447	425.60	426, 447	Not identify	
6	13.464	506	505.65	165, 227, 249, 317, 401, 484, 506	Rhamnetin	MassBank database
7	14.917	561	165.25	165, 197, 255, 284, 331, 365, 448, 455, 561	Not identify	
8	16.100	670	493.60	361, 405, 449, 494, 533, 538, 582, 626, 670	Isomer	
9	16.414	670	493.60	361, 405, 449, 494, 533, 538, 582, 626, 670		
10	18.343	684	353.60	174, 199, 313, 354, 406, 413, 459, 684	Not identify	

multiple therapeutic properties such as anti-oxidant, anti-microbial, anti-fungal, nematocidal, anti-viral, anti-inflammatory and antiproliferative activity. The main compounds identified (Table 7) are 1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2ethyl-hexyl) ester (60.82%), 9-Octadecenoic acid (z)- methyl ester (32.80%), Hexadecanoic acid methyl ester (4.02%), 8,11-Octadecenoic acid (z)- methyl ester (1.12%), Octadecenoic acid methyl ester (0.85%), Hexatriacontane (0.39%).

This study was the first report that characterized the presence of organic acids in *P.nigra* buds using lactic acid as an extraction solvent. This suggests that lactic acid can be a good green solvent in the extraction of organic acids and the richness of *P.nigra* buds in organic acid makes it possible to preserve this finding for further research.

### 3.10. Structural identifications of bioactive compounds using LC-ESI-MS analysis

According to the LC-MS chromatogram of the *P.nigra* extract, 10 components with their main peaks identified by LC-MS analysis are presented in Tables 8 and 9. MS data were acquired in both negative and positive ionization modes (Fig. 4). Each assignment was made after comparing the detected compounds' UV and MS spectra data with the MS database reported in the literature and relevant databases based on mass measurements of pseudomolecular ions [M–H].

Peak 1 presented the [M+Na]<sup>+</sup> ion at m/z 331.5, which was the sodium adduct ion of disaccharide (Glu-RHA) residue ([308+Na]<sup>+</sup>) (Jia et al., 2017).

Peak 2 showed the [M+H]<sup>+</sup> ion at m/z 389 underwent a methyl unit loss (15 u) which generated product ions at m/z 374. Peak 3

**Table 9**Identification of phenolic compounds in the extract of *P.nigra* buds in negative ionization mode with LC-MS.

Peak	Retention time (min)	Molecular peak [M-H] <sup>-</sup>	Basic peak	fragments	Molecular name	Refs.
11	0.981	377	197.85	161, 198, 377	Oleuropein aglycone derivative	(Fu et al., 2009)
12	1.150	726	197.95	187, 198, 273, 303, 377, 434, 453, 603, 726	Not identify	
13	12.229	395	242.25	221, 242, 289, 395	Not identify	
14	13.684	479	333.25	194, 270, 293, 333, 401, 479	Myricetin-galactoside or myricetin-glucoside	MassBank database
15	15.061	634	534.35	269, 534, 634	Not identify	
16	16.109	946	269.25	191, 227, 269, 317, 403, 419, 463, 531, 559, 603, 647, 691, 735, 793, 850, 946	Not identify	
17	17.178	649	297.20	297, 325, 367, 435, 503, 571, 589, 649	Rhamnosyl-hexosyl-acyl-quercetin	(Ben Said et al., 2017)
18	17.485	339	339.30	339	Esculoside	MassBank database
19	17.770	339	339.30	339	Esculoside isomer	
20	19.765	791	311.25	311, 333, 498, 791	Dehydrated gluco-glucuronic acid hedragenin	(Grati et al., 2022)

exhibited molecular ion [M+Na]<sup>+</sup> at m/z 411 and [M+H]<sup>+</sup> ion at m/z 389, with fragment ions at m/z 374. Therefore, peaks 2 and 3 were identified as polymethoxylated flavonoids and polymethoxylated flavonoid isomers respectively, which can tentatively be 6-hydroxy-5,7,8,3',4'-pentamethoxy-flavone, 4'-hydroxy-5,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone, or monohydroxy-pentamethoxyflavone (Lei et al., 2017).

Peak 6 showed a precursor ion [M+CH<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> at m/z 521, 506 [M+Na]<sup>+</sup> and m/z 484 [M+H]<sup>+</sup>, the precursor ion at m/z 317 corresponding to rhamnetin, therefore the peak was identified as rhamnetin derivative (MassBank database).

Compound 11 displayed an [M-H]<sup>-</sup> ion at m/z 377, with fragmentations at m/z 198 and 161, and was identified as an oleuropein aglycone derivative (Fu et al., 2009).

Peak 14 showed a [M-H]<sup>-</sup> ion m/z 479 with a fragment at m/z 333 and, considering the difference of 146 u, a rhamnosyl moiety neutral loss was supposed. The aglycone was tentatively identified as myricetin and probably could be identified as myricetin-galactoside or myricetin-glucoside (MassBank database).

Peak 17 presented the [M-H]<sup>-</sup> ion at m/z 649 and further suffered neutral losses of 146 u (rhamnose unit) to produce the fragment ions of the [M-H<sup>-</sup> rhamnose]- ion at m/z 503, the ion produced at m/z 325 indicated a loss of 2 molecules of glucosyl moiety, ion fragment at m/z 301 correspond to the characteristic fragment of quercetin. Thus

peak 17 was suggested as rhamnosyl-hexosyl-acyl-quercetin (Ben Said et al., 2017).

Peaks 18 and 19 showed a [M-H]<sup>-</sup> ion with m/z 339 corresponding to esculoside isomers in comparison with MassBank data.

Peak 20 presented [M-H]<sup>-</sup> at m/z 791, this compound could be assigned as dehydrated gluco-glucuronic acid hedragenin, ion at m/z 498 produced after the loss of 2 rhamnoside residues (146 × 2), further suffered the neutral loss of 165 u to produce the fragment ion at m/z 333 (Grati et al., 2022).

In summary, the identified molecules are mainly flavonoids except for dehydrated gluco-glucuronic acid hedragenin which is a saponin. Flavonoids are secondary metabolites that belong to the class of polyphenols, in nature these compounds are mainly in the form of glycoside structures. They offer UV protection and have powerful antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties which are essential for pharmaceutical and cosmetic applications (Dai and Mumper, 2010). In this study, the activity demonstrated by the extract is mainly linked to the compounds identified and in particular to myricetin glycoside and rhamnosyl-hexosyl-acyl-quercetin, which have already been reported in the literature as antioxidants capable of scavenging the free radicals responsible for photo-aging of the skin and preventing ultraviolet B (UVB)-induced damage to keratinocytes (Huang et al., 2010; Choquetnet et al., 2008).

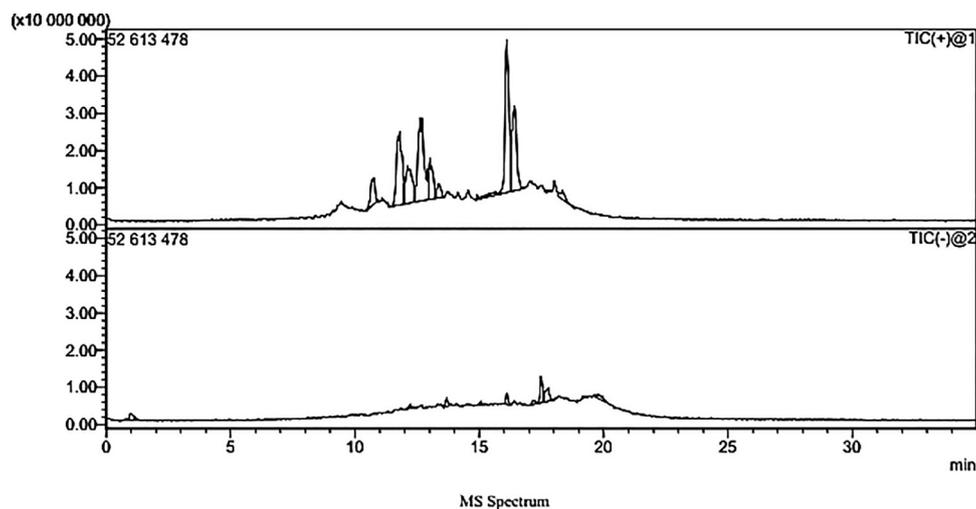


Fig. 4. Total ion chromatogram (TIC) of phenolic compounds identified in *P.nigra* extracts by LC-ESI-MS method in negative and positive mode.

## 4. Conclusion

In this study, the ultrasonic-assisted extraction process as an energy source using lactic acid as an environmentally friendly green solvent showed good efficiency in the richness and recovery of active compounds such as phenolic compounds, saponins and proteins compared to conventional methods reported in the literature. In addition, the assessment of the photoprotective effect of the formulation carried out expressed an excellent sun protection factor that is strongly linked to the presence of phenolic compounds such as myricetin-galactoside and rhamnosyl-hexosyl-acyl-querucetin. moreover, the antioxidant potential and the anti-inflammatory activity revealed by the extract could be an alternative mode of action and a strategy has the double effect to strengthen the photoprotective effect and prevent or slow down cell damage by inhibiting radicals free and pro-inflammatory mediators that are involved in oxidative stress and UVB-induced cell injury. Indeed, the results obtained allow us to continue this study to develop more effective sunscreens and strengthen the organism defense mechanism in clinical trials against the formation of free radicals and UV-induced damage.

## Contributions

S. Zaidi: objective, ideas, design of the methodology, execution of the experiment, data analysis, reproducibility of the results, writing; N. Debbache: ideas, management and responsibility for research coordination; Z. Medjahed: interpretation of LC-MS and GC-MS results; R. KAD I: manipulating; S.O. Tebbi: manipulating; N. Saidene: manipulating.

## Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Ethics approval

The study was approved by the ethics committee. The research was conducted in accordance with the standards and recommendations of the International Ethics Committee (directive 2010/63/ EU).

## Consent for publication

All authors of this paper are aware of the submission and agree to its publication.

## Funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (grant N D01N01UN060120210001).

## Declaration Competing of Interest

I, Sid ali Zaidi, declare that this manuscript is original, unpublished, that there are no plans to publish it elsewhere, and that there are no conflicts of interest to disclose.

## References

- Ali, A., Javaid, A., Shoaib, A., 2017. Analyse GC-MS analysis and antifungal activity of Methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*. *Planta Daninha*. 35, 1–8. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100046>.
- Ali, A., Wu, H., Ponnampalam, E.N., Cottrell, J.J., Dunshea, F.R., Suleria, H.A., 2021. Comprehensive profiling of most widely used spices for their phenolic compounds through LC-ESI-QTOF-MS2 and their antioxidant potential. *Antioxidants* 10 (5), 721. <https://doi.org/10.3390/antiox10050721>.

- Ambarwati, N.S.S., Elya, B., Mahayasih, P.G.M.W., Awang, M.S.N., Omar, H., 2021. Antioxidant activity of *Litsea petiolata* Hk. F. J. Phys. Conf. 1869, 1–5. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1869/1/012055>.
- Arun, K.M., Umamaheswari, U., Rajesh, K.G., Preethy, P.R., Elumalai, S., Sangeetha, T., 2017. Studies on the extraction and analysis of polyunsaturated fatty acids (pufa) from marine macroalgae. *Int. J. Pharm. Technol.* 9 (3), 30715–30741.
- Balos, M.M., 2023. Determination of Weeds and Their Floristic Investigation in Vineyards in some districts of Şanlıurfa (Turkey). *Int. J. Nat. Sci.* 7 (2), 1–17. <https://doi.org/10.47947/ijnls.1327833>.
- Barba, C., Méndez, S., Roddick-Lanzilotta, A., Kelly, R., Parra, J.L., Coderch, L., 2008. Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. *Skin. Res. Technol.* 14 (2), 243–248. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00280.x>.
- Ben Said, R., Arafa, I.H., Usam, A.M., Abdullah Sulaiman, A.A., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Stochmal, A., 2017. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (3), 512–530. <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>.
- Biswas, S., Ghosh, P., Dutta, A., Biswas, M., Chatterjee, S., 2021. Comparative analysis of nutritional constituents, antioxidant and antimicrobial activities of some common vegetable wastes. *Curr. Res. Nutr. Food. Sci.* 9 (1), 62–74. <https://doi.org/10.12944/crnfsj.9.1.07>.
- Cengiz, M.F., Durak, M.Z., 2019. Rapid detection of sucrose adulteration in honey using Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* 1–7. <https://doi.org/10.1080/00387010.2019.1615957>.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemeire, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 18 (4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- Choquet, B., Couteau, C., Paparis, E., Coiffard, L.J., 2008. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an *in vitro* method. *J. Nat. Prod.* 71 (6), 1117–1118.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15 (10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- Daira, N., Maazi, M.C., Chefrour, A., 2016. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérienne. *Bull. Soc. R. Sci. Liege*. 85, 276–290. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.6494>.
- Da Silva, R.F., Carneiro, C.N., De Sousa, C.B.D.C., Gomez, F.J., Espino, M., Boiteux, J., Fernández, M.A., Silva, M.F., Dias, F.D.S., 2022. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: a review. *Microchem. J.* 175, 107184. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107184>.
- Dawidowicz, A.L., Wianowska, D., Baraniak, B., 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT – Food. Sci. Technol.* 39 (3), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.005>.
- Debbache-Benaida, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirith, V.B., Djebli, N., Atmani, D., 2013. Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (9), 697–704. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60141-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60141-0).
- Debbache, N., Atmani, D., Atmani, D., 2014. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Ind. Crops. Prod.* 53, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.018>.
- Debbache-Benaida, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Nassima, C., Djebli, N., Boudaoud, H., Atmani, D., 2018. Anti-hyperuricemic and neuroprotective effects of *Populus nigra* L. (Salicaceae) flower buds used in Algerian folk medicine. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 6, 471–482.
- Djemaa-Landri, K., Hamri-Zeghichi, S., Belkhir-Beder, W., Krisa, S., Cluzet, S., Richard, T., Valls, J., Kadri, N., Madani, K., 2021. Phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of some Algerian olive stone extracts obtained by conventional solvent and microwave-assisted extractions under optimized conditions. *J. Food. Meas. Charact.* 15 (5), 4166–4180. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00992-w>.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stoker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food. Chem.* (79), 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.
- Fu, S., Arráez-Román, D., Menendez, J.A., Segura-Carretero, O., Fernandez-Gutiérrez, A., 2009. Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 23 (1), 51–59. <https://doi.org/10.1002/rcm.3855>.
- Gangwar, M., Gautam, M.K., Sharma, A.K., Tripathi, Y.B., Goel, R.K., Nath, G., 2014. Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippensis* fruit extract on human erythrocytes: an *in vitro* study. *Sci. World. J.* 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/279451>.
- Gatea, F., Matei, A.O., Teodor, E.D., Radu, G.L., 2015. Antioxidant properties and polyphenols composition of some roumanian propolis samples. *Rev. Roum. Chim.* 60 (1), 65–74.
- Golubkina, N., Ulyana Plotnikova, U., Laptchenko, V., Laptchenko, H., Sheshnitsan, S., Amagova, Z., Matsadze, V., Naumenko, T., Bagrikova, N., Logvinenko, L., Sakhno, T., Chevchouk, O., Pirogov, N., Caruso, G., 2022. Evaluation of factors affecting tree and shrub bark's antioxidant status. *Plants* 11 (19), 2609–2625. <https://doi.org/10.3390/plants11192609>.

- Grati, W., Samet, S., Bouzayani, B., Ayachi, A., Treilhou, M., Téné, N., Mezghani-Jarraya, R., 2022. HESI-MS/MS analysis of phenolic compounds from *Calendula aegyptiaca* fruits extracts and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules* 27 (7), 2314. <https://doi.org/10.3390/molecules27072314>.
- Güler, O., Polat, R., Karaköse, M., Çakılcıoğlu, U., Akbulut, S., 2021. An ethnoveterinary study on plants used for the treatment of livestock diseases in the province of Giresun (Turkey). *S. Afr. J. Bot.* 142, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.003>.
- Hachani, C., Abbassi, M., Lazzar, C., Lamhamedi, M.S., Béjaoui, Z., 2019. Allelopathic effects of leachates of *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. and *Populus nigra* L. on germination and seedling growth of Triticum durum Desf. under laboratory conditions. *Agrofor. Syst.* 93, 1973–1983. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0298-3>.
- Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Halla, N., 2016. Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria. *Phytotherapie* 16 (1), 254–262. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1086-8>.
- Huang, J.H., Huang, C.C., Fang, J.Y., Yang, C., Chan, C.M., Wu, N.L., Kang, S.W., Hung, C.F., 2010. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicol. In Vitro* 24 (1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.015>.
- Ivanova, A., Gerasimova, E., Gazizullina, E., 2020. Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. *Molecules* 25 (18), 4251–4278. <https://doi.org/10.3390/molecules25184251>.
- Jia, C., Zhu, Y., Zhang, J., Yang, J., Xu, C., Mao, D., 2017. Identification of glycoside compounds from tobacco by high performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion-trap tandem mass spectrometry coupled with electrospray ionization orbitrap mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 629–640. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160211>.
- Khan, A.M., Qureshi, R.A., Ullah, F., Gilani, S.A., Nosheen, A., Sahreen, S., Laghari, M.K., Laghari, M.Y., Rehman, S.U., Hussain, I., Murad, W., 2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J. Med. Plant. Res.* 5 (25), 6017–6023. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.869>.
- Kis, B., Avram, S., Pavel, I.Z., Lombrea, A., Buda, V., Dehelean, C.A., Danciu, C., 2020. Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of *Populus nigra* L. buds. *Plants* 9 (11), 1464. <https://doi.org/10.3390/plants9111464>.
- Kis, B., Pavel, I.Z., Avram, S., Moaca, E.A., Herrero San Juan, M., Schwiebs, A., Radeke, H.H., Muntean, D., Diaconea, Z., Minda, D., Opréan, C., Bojin, F., Dehelean, C.A., Soica, C., Danciu, C., 2022. Antimicrobial activity, *in vitro* anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of *Populus nigra* L. buds extract. *BMC Complement. Med. Ther.* 22 (1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03526-z>.
- Kim, H.H., Cho, S., Lee, S., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C., Chung, J.H., 2006. Photoprotective and anti-skin-aging effects of ethanolic extract of *Populus nigra* L. buds in human skin *in vivo*. *J. Lipid. Res.* 47 (5), 921–930. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500420-JLR200>.
- Kim, Y.S., Cho, I.H., Jeong, M.J., Jeong, S.J., Nah, S.Y., Cho, Y.S., Bae, C.S., 2011. Therapeutic effect of total ginseng saponin on skin wound healing. *J. Ginseng. Res.* 35 (3), 360. <https://doi.org/10.5142/JEJgr.2011.35.3.360>.
- Kouamé, T.M., Siaka, S., Kassi, A.B., Soro, Y., 2021. Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigma thonningii* (Caesalpinaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 15 (1), 97–105. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v15i1.9>.
- Kuš, P., Jerković, I., Jakovljević, M., Jokić, S., 2018. Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO<sub>2</sub> and its optimization by response surface methodology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 152, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.046>.
- Lei, J., Xue, Y., Liu, Y.M., Liao, X., 2017. Characterization of major metabolites of polymethoxylated flavonoids in *Panicarpium Citri reticulatae* using laser microsomes immobilized on magnetic nanoparticles coupled with UPLC/MS–MS. *Chem. Cent. J.* 11 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0237-9>.
- Li, Q., Yu, N., Wang, Y., Sun, Y., Lu, K., Guan, W., 2013. Extraction optimization of *Bruqiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carbohydr. Polym.* 96 (1), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.054>.
- Linton, R.E.A., Jerah, S.L., Bin Ahmad, I., 2013. The effect of combination of octadecanoic acid, methyl ester and ribavirin against measles virus. *Int. J. Sci. Tech. Res.* 2 (10), 181–184.
- Maack, A., Pegard, A., 2016. *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia* 111, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.001>.
- Man, M.Q., Wakefield, J.S., Mauro, T.M., Elias, P.M., 2022. Regulatory role of nitric oxide in cutaneous inflammation. *Inflammation* 45 (3), 949–964. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01615-8>.
- Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D., 1986. Determination of sun protection factor by spectrophotometry. *An. Bras. Dermatol.* 61 (3), 121–124.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.T., Sekaki, A., Gardes-Albert, M., 1994. Antioxidant action of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Meth. Enzymol.* 234, 462–475. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34117-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34117-6).
- Menakh, M., Mahdi, D., Boutellaa, S., Zellagui, A., Lahouel, M., Bensouici, C., 2020. *In vitro* antioxidant activity and protective effect of *Hertia cheirifolia* L. n-butanol extract against liver and heart mitochondrial oxidative stress in rat. *Acta. Nat. Sci.* 7 (1), 33–45. <https://doi.org/10.2478/asn-2020-0005>.
- Mergache, D., Boucherit-Otman, Z., El Hacı, I., Mergache, S., Chikhid, I., Boucherit, K., 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Populus nigra* L. buds extracts. *Int. J. Biol. Biomed. Eng.* 1 (1), 1–8. <https://doi.org/10.5121/ijbce.2018.3201>.
- Merdana, I., Arjana, A.A.G., Widyastuti, S.K., Tetrana, T., Budiasa, K., Sudimartini, L.M., Sudira, I.W., 2020. Assessment of the dermal acute irritation potential of natural veterinary medicine *minyak rajas* in albino rabbits. *J. Pharm. Res. Int.* 32 (10), 17–24. <https://doi.org/10.9734/JPR/2020/v32i1030489>.
- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R., 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism of their antioxidant activity. *Free. Radic. Res.* 36, 1199–1208. <https://doi.org/10.1080/1071576021000016463>.
- Moldovan, C., Frumuzachi, O., Babotă, M., Menghini, L., Cesa, S., Gavan, A., Sisea, C.R., Tanase, C., Dias, M.I., Pereira, C., Ferreira, I.C.F.R., Crişan, G., Mocan, A., Barros, L., 2021. Development of an optimized drying process for the recovery of bioactive compounds from the autumn fruits of *Berberis vulgaris* L. and *Crataegus monogyna* Jacq. *Antioxidants* 10, 1579–1600. <https://doi.org/10.3390/antiox10101579>.
- Napagoda, M.T., Malkanthi, B.M.A.S., Abayawardana, S.A.K., Qader, M.M., Jayasinghe, L., 2016. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. *BMC. Complement. Altern. Med.* 16 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1455-8>.
- Ncube, B., Ngunge, V.N.P., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2011. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micro-propagated *Tulbaghia violacea* Harv plants. *J. Ethnopharmacol.* 134 (3), 775–780. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.039>.
- Olba-Zięty, E., Stolarski, M.J., Krzyżaniak, M., Rój, E., Tyśkiewicz, K., Luczyński, M.K., 2022. Supercritical production of extract from poplar containing bioactive substances—an economic analysis. *Ind. Crops. Prod.* 184, 115094. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115094>.
- Ostolski, M., Adamczak, M., Brzozowski, B., Wiczowski, W., 2021. Antioxidant activity and chemical characteristics of supercritical CO<sub>2</sub> and water extracts from willow and poplar. *Molecules* 26 (3), 545–560. <https://doi.org/10.3390/molecules26030545>.
- Pobłocka-Olech, L., Inkieliewicz-Stepniak, I., Krauze-Baranowska, M., 2019. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: Role of bioflavonones. *Phytomedicine* 56, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.08.015>.
- Palos-Hernández, A., Fernández, M.Y.G., Burrieza, J.E., Pérez-Iglesias, J.L., González-Paramás, A.M., 2022. Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. *Sustain. Chem. Pharm.* 29, 100773–100796. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100773>.
- Paşca, C., Mărghiţaş, L.A., Bobiş, O., Dezmirean, D.S., Mărgăoan, R., Mureşan, C., 2016. Total content of polyphenols and antioxidant activity of different melliferous plants. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj. Napoca.* 73 (1), 1–7. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:11762>.
- Pawlicka, A., Tavares, F.C., Dörr, D.S., Cholant, C.M., Ely, F., Santos, M.J.L., Avellana, C.O., 2019. Dielectric behavior and FTIR studies of xanthan gum-based solid polymer electrolytes. *Electrochim. Acta* (305), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.03.055>.
- Peng, S., Wei, P., Lu, Q., Liu, R., Ding, Y., Zhang, J., 2018. Beneficial effects of poplar buds on hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in streptozotocin-induced type-2 diabetes. *J. Immunol. Res.* 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/7245956>.
- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M.K., Rzeski, W., 2017. LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in Mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules* 22 (4), 624–639. <https://doi.org/10.3390/molecules22040624>.
- Popović, B.M., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Tubas-Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Orlović, S., 2016. Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant. Physiol. Biochem.* 105, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.036>.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- Rabie, S.F., Hosni, A.G., Hassan, I.H., Sherif, M., 2019. Comparative analytical study of polyisobutylene succinic anhydride-modified triethanolamine emulsifier. *Al Azhar. Bull. Sci.* 30 (1), 21–35. <https://doi.org/10.21608/ABSBS.2019.67888>.
- Rajamanikandan, S., Sindhu, T., Durgapriya, D., Sophia, D., Ragavendran, P., Gopalakrishnan, V.K., 2011. Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by *in vitro* assays. *Indian. J. Pharm. Educ. Res.* 45 (4), 310–316.
- Rajkuberan, C., Prabukumar, S., Sathishkumar, G., Wilson, A., Ravindran, K., Sivaramkrishnan, S., 2017. Facile synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia antiquorum* L. latex extract and evaluation of their biomedical perspectives as anticancer agents. *J. Saudi. Chem. Soc.* 21 (8), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2016.01.002>.
- Ramadhan, D.S., Warsito, Iftitah, E.D., 2018. Microwave-assisted synthesis of benzimidazole derivatives from citronellal in kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) oil. *IOP. Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 299, 12076–120084. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/299/1/012076>.
- 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. Radic. Biol. Med.* 26 (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Reddy, D.B., Reddy, T.C.M., Jyotsna, G., Sharan, S., Priya, N., Lakshminpathi, V., Reddanna, P., 2009. Chebulagic acid, a COX–LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. *J. Ethnopharmacol.* 124 (3), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.022>.
- Saha, M., Mukherjee, S., Das, S., Chowdhury, M., Das, M., Sarkar, S., Chatterjee, S., 2022. Phytonutrient screening and evaluation of *in-vitro* antibacterial activity of onion and garlic peels: a comparative study with the prospects of waste to wealth. *Int. J. Herb. Med.* 10 (6), 39–44. <https://doi.org/10.22271/flora.2022.v10.i6a.844>.

- Selvi, S., Polat, R., Çakılcıoğlu, U., Celep, F., Dirmenci, T., Ertuğ, Z.F., 2022. An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turk. J. Bot.* 46 (4), 283–332. <https://doi.org/10.55730/1300-008X.2712>.
- Sharma, A., Verma, R., Kumar, R., Chauhan, R., Sharma, V., 2020. Chemometric analysis of ATR-FTIR spectra of fingernail clippings for classification and prediction of sex in forensic context. *Microchem. J.* 10550–10557. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105504>.
- Sharma, N., Meher, C.L., Chandra, K., Kumari, A., Bala, M., 2021. Chemical modification of camelina oil based unsaturated fatty acid for renewable biolubricant base stock. *Asian. J. Chem.* 33 (1), 37–44. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2021.22910>.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- Soto, L.M., Falqué, E., Domingez, H., 2015. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* 2 (3), 259–276. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259>.
- Souley Kallo, M., Adamou, R., Sawadogo, J., Ayouba Mahamane, A., Maman Maarouhi, I., Ikhiri, K., 2018. Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. *Int. J. boil. Chem. Sci.* 12 (2), 867–880. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i2.20>.
- Tebbi, S.O., Debbache-Benaida, N., 2022. Phytochemistry, chemical composition and therapeutic uses of *Populus nigra* L. aerial parts from 1991–2021 onwards: an overview. *Sustain. Chem. Pharm.* 30, 100880. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100880>.
- Valipour Noroozi, R., Valipour Noroozi, M., Ahmadizadeh, M., 2015. Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *Int. J. Med.* 4 (1), 11–17.
- Vardar-Ünlü, G., Sibel, S., Unlu, M., 2008. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (24), 1011–1017. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9566-5>.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food. Chem.* 116 (1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>.
- Wang, L., Je, J.G., Yang, H.W., Jeon, Y.J., Lee, S., 2021. Dieckol, an algae-derived phenolic compound, suppresses UVB-induced skin damage in human dermal fibroblasts and its underlying mechanisms. *Antioxidants* 10 (3), 352–363. <https://doi.org/10.3390/antiox10030352>.
- Zhao, C., Cheng, H., Jiang, P., Yao, Y., Han, J., 2014. Preparation of lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer. *Food. Chem.* 156, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.086>.
- Zhuang, J., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A.J., Yoo, C.G., 2020. Observation of potential contaminants in processed biomass using Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Sci.* 10 (12), 4345–4358. <https://doi.org/10.3390/app10124345>.

## Résumé

*Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*, deux plantes médicinales largement répandues en Algérie, sont riches en substances actives, notamment en composés phénoliques, conférant ainsi divers effets pharmacologiques. Cette étude vise à introduire de nouveaux extraits naturels obtenus par une éco-extraction, tout en explorant la phytochimie, en évaluant l'activité biologique, et en réalisant une caractérisation chromatographique. L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques a révélé un contenu d'environ 130,17 mg EAG/g PS pour *P.lentiscus* et de 42,64 mg EAG/g PS pour *P.nigra*. L'évaluation du potentiel antioxydant in vitro a démontré une activité intéressante, ainsi qu'une forte activité anti-inflammatoire, illustrée par des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 0,1575% et 0,1788% dans l'inhibition de la COX pour les extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra* respectivement. En outre, la formulation à base de particules chargées d'extrait a présenté des paramètres de qualité satisfaisants, avec un effet photoprotecteur plus élevé observé avec les feuilles de *P.lentiscus* (35,97). De plus, le test d'irritation cutanée a confirmé l'absence totale de manifestations irritantes. L'activité biologique observée dans cette étude est attribuable à la richesse des extraits bruts en composés bioactifs, notamment la présence d'acides organiques et de molécules phénoliques, caractérisés pour la première fois dans les extraits des espèces étudiées. L'utilisation de l'acide lactique comme solvant écologique et des ultrasons comme source d'énergie alternative représente une approche prometteuse pour concevoir un système d'extraction de composés bioactifs aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, et photoprotectrices. De plus, des études complémentaires sont nécessaires pour élargir l'approche de criblage anti-irritante en vue du développement de produits enrichis en antioxydants.

Mot clés : *P.lentiscus* · *P.nigra* · acide lactique · extraction assisté aux ultrasons · photoprotecteur

## Abstract

*Pistacia lentiscus* and *Populus nigra*, two widely distributed medicinal plants in Algeria, are rich in active substances, notably phenolic compounds, imparting various pharmacological effects. This study aims to introduce new natural extracts obtained through eco-extraction, while exploring phytochemistry, assessing biological activity, and conducting chromatographic characterization. The optimization of phenolic compound extraction revealed a content of approximately 130.17 mg GAE/g dw for *P.lentiscus* and 42.64 mg GAE/g dw for *P.nigra*. The in vitro assessment of antioxidant potential demonstrated interesting activity, along with a strong anti-inflammatory effect, as indicated by IC<sub>50</sub> values of 0.1575% and 0.1788% in COX inhibition for *P.lentiscus* and *P.nigra* extracts, respectively. Furthermore, the formulation based on extract-loaded particles exhibited satisfactory quality parameters, with a higher photoprotective effect observed with *P.lentiscus* leaves (35.97). Additionally, the skin irritation test confirmed the total absence of irritating manifestations. The observed biological activity in this study is attributable to the richness of crude extracts in bioactive compounds, notably the presence of organic acids and phenolic molecules, characterized for the first time in the extracts of the studied species. To this end, the use of lactic acid as an eco-friendly solvent and ultrasound as an alternative energy source represents a promising approach for designing a system to extract bioactive compounds with antioxidant, anti-inflammatory, and photoprotective properties. Furthermore, additional studies are necessary to broaden the anti-irritant screening approach for the development of products enriched in antioxidants.

Keyword : *P.lentiscus* · *P.nigra* · lactic acid · ultrasound-assisted extraction · photoprotective

## ملخص

*Pistacia lentiscus* و *Populus nigra*، نباتان طبيّتان منتشرتان على نطاق واسع في الجزائر، غنيتان بالمواد الفعّالة، ولا سيما المركبات الفينولية، التي تمنح تأثيرات دوائية متنوعة. تهدف هذه الدراسة إلى تقديم مستخلصات طبيعية جديدة تم الحصول عليها عن طريق تقنية الاستخلاص البيئي، مع تحليل الكيمياء النباتية، تقييم النشاط البيولوجي، وتحديد التوصيف الكروماتوغرافي. كشف تحسين استخلاص المركبات الفينولية عن محتوى يبلغ حوالي 130.17 ملغ حمض الغاليك/غرام من المادة الجاف لـ *P.lentiscus* و 42.64 ملغ حمض الغاليك/غرام من المادة الجاف لـ *P.nigra*. أظهر تقييم إمكانات مضادات الأكسدة في المختبر نشاطاً مثيراً للاهتمام، بالإضافة إلى نشاط قوي مضاد للالتهابات، وهو ما يتضح من قيم IC<sub>50</sub> البالغة 0.1575% و 0.1788% في تثبيط COX من طرف المستخلصات *P.lentiscus* و *P.nigra* على التوالي. علاوة على ذلك، أظهرت التركيبة المبنية على جزيئات محملة بالمستخلص معايير جودة مرضية، مع تأثير وقائي شمسي أعلى ملاحظ مع أوراق *P.lentiscus* (35.97). وبالإضافة إلى ذلك، أكد اختبار تهيج الجلد عن غياب التام للمظاهر المهيجة النشاط البيولوجي الملاحظ في هذه الدراسة يرجع الدراسة إلى غنى المستخلصات الخام بالمركبات البيولوجية، خاصة وجود الأحماض العضوية والجزيئات الفينولية، التي تم توصيفها لأول مرة في مستخلصات المدروسة. وفي هذا السياق، يُعد استخدام حمض اللبن كمذيب صديق للبيئة والموجات فوق الصوتية كمصدر للطاقة بديلة نهجاً واعداً لتصميم نظام استخراج المركبات البيولوجية ذات الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب والواقية من الأشعة فوق البنفسجية. وعلى هذا هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتوسيع نهج الفحص المضاد للتهيج لتطوير المنتجات الغنية بمضادات الأكسدة.

الكلمة المفتاحية: *P.lentiscus* · *P.nigra* · حمض اللاكتيك · الاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية · واقية شمسية