

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Développement d'un complément alimentaire à partir des plantes
médicinales**

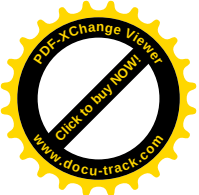
Présenté par :

BEZARI Ikrame

CHERIF Mouna

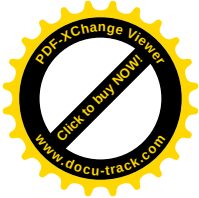
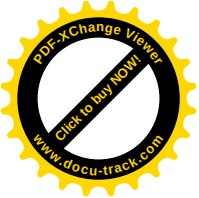
Devant le Jury :

<i>Mme ROUAKI F</i>	<i>MCA</i>	<i>SNV, USDB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme LOUNACI L</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, USDB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme MOKRANE A</i>	<i>MCA</i>	<i>SNV, UMMTO</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Melle NADJI S</i>	<i>PDG</i>	<i>Orpin Center, Blida</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Mme Bechohra L</i>	<i>MCA</i>	<i>FSB-USTHB</i>	<i>Invité</i>



2024/2025





Dédicaces

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je
dédie ce
modeste travail*



À mes parents bien-aimés

*Vous êtes ma source de force, de sagesse et d'amour inconditionnel.
Grâce à vos sacrifices, votre patience, votre bienveillance et vos prières,
j'ai pu franchir chaque étape de ce parcours avec courage et
détermination.*

*Aucun mot ne saurait exprimer toute ma reconnaissance. Que Dieu
vous protège, vous comble de santé et vous accorde une longue vie
pleine de bonheur et de paix.*

À mon frère Ayoub

*Merci pour ton soutien inestimable, ta présence rassurante et ta foi en
moi. Sans toi, je n'aurais jamais pu atteindre ce stade.*

À ma sœur Amel

*Ta tendresse, ton écoute et ton encouragement ont toujours été pour
moi une source de réconfort. Merci d'être là.*

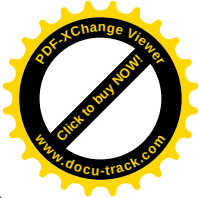
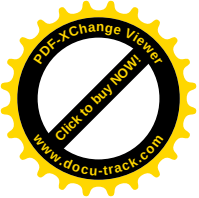
À mes chers amis

*Merci d'avoir été là, avec vos mots gentils, votre bonne humeur, et
votre soutien dans les moments difficiles.*

À tous les membres de ma famille

*Merci pour vos prières, vos mots d'encouragement et votre amour.
Votre présence dans ma vie est un vrai cadeau.*

À mon binôme



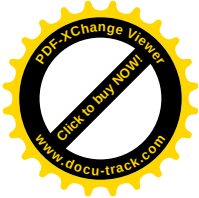
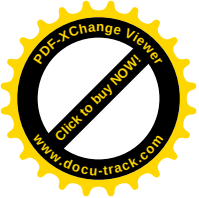
Merci pour ton engagement, ta sincérité et ta belle collaboration tout au long de cette aventure .Ta présence m'a été précieuse à chaque étape de ce travail.

À mes enseignants et encadrants

Je vous adresse toute ma gratitude pour votre accompagnement, vos conseils et votre disponibilité tout au long de ce parcours.

Votre rôle a été essentiel dans l'aboutissement de ce mémoire.

Ikram.B



Dédicas

*À nos très chers parents, que Dieu vous protège.
À vous et à vous seuls, nous nous inclinons avec tout le respect et tout l'amour,
pour vous dire merci. Nous remercions Dieu de nous avoir donné les meilleurs
parents au monde.*

*À celle qui nous a toujours donné l'espoir de vivre, qui n'a jamais cessé de prier
pour nous, qui s'est toujours dévouée et sacrifiée pour nous,
celle qui a toujours été là dans mes moments de détresse :
ma très chère mère noudjoud berdamane*

*À celui qui m'a toujours encouragée et soutenue dans tout ce que j'ai entrepris,
à celui qui est toujours resté à mes côtés dans le malheur comme dans le bonheur :*

mon très cher père hamoud cherif

À ma précieuse sœur seriel

À mon chers frères daniel

Pour ma famille

Pour tous ceux qui ont partagé avec nous le chemin de la quête de la science et du savoir.

Pour chacun avec qui j'ai vécu les plus beaux moments parmi mes proches :

et à Ikrame mon binôme

Merci pour ta disponibilité, ta bienveillance et ton implication sans faille tout au long de ce parcours.

Ton soutien et ta présence ont été un véritable pilier dans cette belle aventure scientifique.

À tous ceux qui ont dressé sur notre route des obstacles et des barrières :

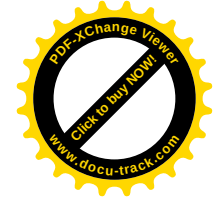
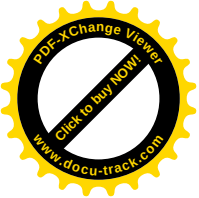
*nous vous disons merci, car vous nous avez appris l'insistance, la patience et la détermination dans la vie. À
chacun et chacune qui a contribué, de près ou de loin, à tracer un pas sur le chemin du savoir et de la
connaissance.*

À mes enseignants et encadrants,

Merci pour votre accompagnement et vos précieux conseils.

Une gratitude particulière à Madame Naji et Madame Mokrane pour leur soutien et leur disponibilité.

Mouna.o.



Remerciement

Nous commençons par adresser nos louanges à Allah, Le Tout-Puissant, qui nous a guidés et accordé la force, la patience et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à nos encadrantes Mme Mokrane et Mme Nadji pour leur encadrement rigoureux, leur disponibilité et la qualité de leurs conseils, qui ont été essentiels tout au long de cette recherche.

Nos remerciements vont également à Mme Rouaki et Mme Lounaci, membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Nous leur sommes très reconnaissants pour le temps qu'elles nous ont accordé, la bienveillance de leurs remarques, ainsi que pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre travail. C'est un réel honneur pour nous de bénéficier de leur expertise.

Nous remercions aussi Mme Rouaki pour son aide précieuse dans la recherche d'un encadrant, ainsi que Mme Djazouli pour son soutien constant et ses encouragements tout au long de notre parcours.

Nous exprimons notre gratitude à M. Kouimia pour nous avoir permis d'effectuer notre stage pratique au CRAPC, ainsi qu'à M. Abomostapha, Ingénieur Principal et Chef d'atelier, pour son accompagnement technique. Un grand merci également à Mme Bokhlata et Mme Djemei pour leur aide précieuse durant la phase d'extraction.

Nous remercions sincèrement Mme Arkam, Mme Zatra et Mme Terzali pour leur présence et leur soutien tout au long de la phase d'expérimentation.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à Pr Oumouna, M. Benhafri et au doctorant Dahime pour leur appui et leurs conseils dans la réalisation de l'étude histologique.

Nous n'oublions pas nos collègues et camarades : Ferial, Manel, Fella, Mraoua, Chaïma, Bedra, Naziha, Anfel, Inès, Manar et Naila, ainsi que toute l'équipe du Centre ORPIN, pour leur collaboration et leur soutien, notamment lors des manipulations et du sacrifice des rats.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à nos parents et nos frères et sœurs pour leur aide tout au long de ce travail, leur patience, leur soutien moral et matériel, et tout particulièrement pour nous avoir assurés le transport et les déplacements pendant la phase d'expérimentation.

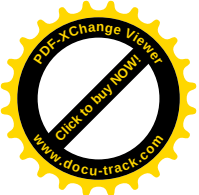


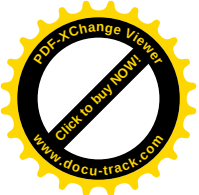
Table des matières

Dédicaces.....	i
Remerciement	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Résumé	xiii
Abstract	xiv
ملخص.....	xv

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Métabolisme hépatique et role des plantes medicinales	4
I.1.1. Métabolisme hépatique normale et pathologique	4
I.1.2. Effet des composés phytochimique sur les fonctions hépatiques.....	5
I.1.3. Contribution des plantes médicinales à la protection et régénération du foie.....	7
I.2. Plantes médicinales d'intérêt : brocoli et chardon-Marie.....	7
I.2.1. Structure, morphologie et valeurs nutritionnelles.....	8
I.2.2. Usages traditionnels et modernes	10
I.2.3. Activités anti-inflammatoires et antioxydantes.....	12
I.2.3.1. Activités anti-inflammatoires.....	12
I.2.3.2. Activité anti-oxydante	12
I.2.4. Autres activités biologiques.....	13
I.3. Les formes galéniques modernes des extraits de plantes.....	15
I.4. Analyse <i>in silico</i> du profil toxicologique des composés bioactifs	15

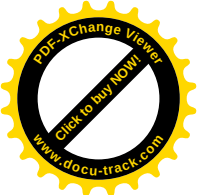


CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

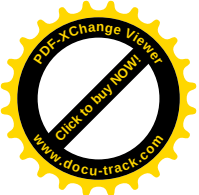
II.1. Matériel	19
II.1.1. Matériel non biologique	19
II.1.2. Matériel biologique	20
II.1.2.1. Matériel végétal	20
II.1.2.2. Animaux.....	21
II.2. Méthodes.....	21
II.2.1.Etude <i>in vitro</i>	22
II.2.2.Etude <i>in vivo</i>	28
II.2.3. Etude <i>in silico</i>	33

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats.....	40
III.1.1. Résultats des extractions et le rendement des extraits	40
III.1.2. Criblage phytochimique.....	40
III.1.3. Identification des principes actifs par chromatographique en phase liquide à haute performance (HPLC)	45
III.1.4. Identification et quantification de composés alcaloïdiques dans les extraits éthanoliques de brocoli et chardon-Marie par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	50
III.1.5. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante et l'activité anti-inflammatoire	54
III.2.Résultats et discussion de l'étude <i>in vivo</i>	59
III.2.1. Résultats de l'évolution du poids corporel des rats durant le traitement au paracétamol.....	60
III.2.2. Résultats de l'évolution du poids corporel des rats au cours de la période de traitement.....	60
III.2.3. Résultats de tissu hépatique.....	61
III.3. Résultats et discussion de l'étude <i>in silico</i>	65
III.4. formulation galénique	75
III.4.1. Stabilité des composés bioactifs et efficacité des extraits à dose contrôlée.....	75
III.4.2. Optimisation de l'observance et de l'acceptabilité.....	75
III.4.3. Libération orale rapide et biodisponibilité.....	76



III.4.4. Pertinence thérapeutique pour la cible hépatique.....	76
Conclusion et Perspectives.....	<u>78</u>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	<u>80</u>
ANNEXES.....	<u>93</u>



Liste des tableaux

Tableau 1 : Profil du gradient d'élution utilisé pour l'analyse HPLC .

Tableau 2: Répartition du régime standard supplémenté de traitement.

Tableau 3 : Caractéristiques et rendements des extraits méthanolique de brocoli et chardon-Marie.

Tableau 4 : Résultats du criblage phytochimique des poudres de brocoli et de chardon-Marie.

Tableau 5 : Teneur des extraits de la matière première en Composées phénoliques.

Tableau 6 : Teneur des extraits de la matière première en flavonoïdes.

Tableau 7 : Teneur des extraits de la matière première en tanins hydrolysables.

Tableau 8 : Profil chromatographique des composés phénoliques bioactifs détectés par HPLC dans les extraits éthanoliques de brocoli et chardon-Marie.

Tableau 9 : Composés phénoliques supplémentaires détectés par HPLC dans les extraits de brocoli et chardon-Marie .

Tableau 10 : Données chromatographiques LC-MS des principaux alcaloïdes présents dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie.

Tableau 11 : Valeurs des CE_{50} des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie pour les activités antioxydante et anti-inflammatoire.

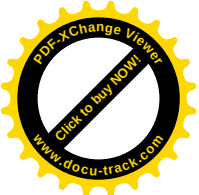
Tableau 12: Conditions d'expérimentation animale .

Tableau 13: Matériel non biologique .

Tableau 14 : les valeurs du tableau de Gay-Lussac.

Tableau 15 : les valeur pour la dilution de acide éthylique .

Tableau 16 : Graines à effet hépatoprotecteur .



Liste des figures

Figure 01 : Représentation d'un foie normal et d'un foie atteint, au niveau de l'organe et du tissu hépatique .

Figure 02 : [Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale in vitro .](#)

Figure 03: [Mécanisme réactionnel du test DPPH° entre l'espace radicalaire DPPH° et un antioxydant \(RH\) .](#)

Figure 04: [Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale in vivo .](#)

Figure 05: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .

Figure 06: Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée pour le dosage des flavonoïdes .

Figure 07: Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables.

Figure 08 : Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de brocoli obtenu par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .

[Figure 09 :](#) Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de chardon-Marie obtenu par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .

[Figure 10 :](#) Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la proline détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie.

[Figure 11 :](#) Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la berbérine détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie .

[Figure 12 :](#) Chromatogramme LC-MS représentant le pic de l'acide nicotinique détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie .

Figure 13 : Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la 4-aminoantipyrine détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie .

Figure 14 : Mécanismes de chélation des métaux lourds par les composés bioactifs et protection des organites hépatiques contre le stress oxydatif.

Figure 15 : Evaluation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique (activité antioxydante).

Figure 16 : Courbe d'étalonnage du diclofénac sodique pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation de l'albumine (activité anti-inflammatoire).

Figure 17 : Mécanismes moléculaires de l'activation de Nrf2 par le sulforaphane et ses implications antioxydantes, anti-inflammatoires.

Figure 18 : Évolution du poids corporel des rats pendant le traitement au paracétamol.

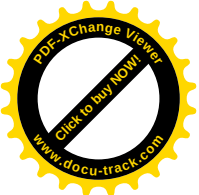


Figure 19 : Évolution du poids corporel des rats au cours de la période de traitement.

Figure 20: Microphotographies du foie des rats du lot témoin négatif (a : Gx10, b : Gx40).

Figure 21: Microphotographies du foie des rats du lot témoin positif (a : Gx10, b : Gx40).

Figure 22: Microphotographies du foie des rats du lot brocoli (a : Gx4, b : Gx10, c : Gx40).

Figure 23: Microphotographies du foie des rats du lot chardon-Marie (a : Gx4, b : Gx10, c : Gx10, d : Gx40).

Figure 24: Microphotographies du foie des rats du lot mélange (brocoli + chardon-Marie) (a : Gx4, b : Gx10, c : Gx40, d : Gx40).

Figure 25 : Signes cliniques de toxicité observés chez les animaux traités durant l'expérimentation *in vivo*.

Figure 26 : les graines de chardon marie .

Figure 27: les graines brocoli .

Figure 28 : alimentation des rats de souche Wista.

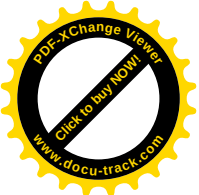
Figure 29 : appareil de Soxhlet .

Figure 30 : chromatographie en phase liquide haute performance .

Figure 31 : La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse .

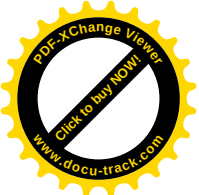
Figure 32 : L'appareille évaporateur rotatif (Rotavap) .

Figure 33 : lyophilisateur.

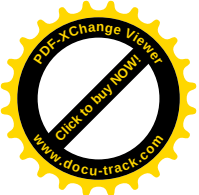


Liste des abréviations

ASAT / AST	Aspartate Aminotransférase
ALAT / ALT	Alanine Aminotransférase
CYP450	Cytochrome P450
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
ROS	Reactive Oxygen Species
GSH	Glutathion
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
GST	Glutathion S-transférase
TGF-β1	Transforming Growth Factor beta 1
SOD	Superoxyde Dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione Peroxydase
MDA	Malondialdéhyde
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
SFN	Sulforaphane
I3C	Indole-3-Carbinol
SILY / SIL	Silymarine
ALA	Acide Alpha-Lipoïque
BO	*Brassica oleracea var. italica* (Brocoli)
SM	*Silybum marianum* (Chardon-Marie)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
IL-6	Interleukine 6
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
PC	Protéine C
COX-2	Cyclooxygénase 2
iNOS	Oxyde Nitrique Synthase inductible
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
ARE	Élément de Réponse Antioxydante



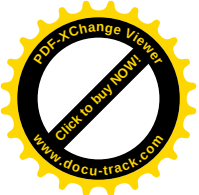
MAPK	Protéine Kinase activée par Mitogène
AMPK	Protéine Kinase activée par l'AMP
ITC	Isothiocyanates
NAFLD	Maladie du Foie Gras non Alcoolique
CE₅₀ / IC₅₀	Concentration efficace à 50 % (activité biologique)
DPPH°	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance
LC-MS	Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse



Résumé

En réponse à l'intérêt croissant pour des alternatives naturelles efficaces et sûres, cette étude a porté sur deux plantes médicinales disponibles en Algérie : le brocoli (*Brassica oleracea*) et le chardon-Marie (*Silybum marianum*), reconnues pour leur richesse en composés bioactifs. Les extraits méthanoliques ont été analysés sur le plan phytochimique, révélant une teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes. Les activités antioxydantes et anti-inflammatoires ont été évaluées *in vitro*. Le brocoli a présenté une capacité antioxydante plus élevée ($IC_{50} = 42,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) contre $51,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour le chardon-Marie. Pour l'activité anti-inflammatoire, le brocoli présente une IC_{50} de $68,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, légèrement inférieure à celle du chardon-Marie ($IC_{50} = 73,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), traduisant une meilleure efficacité. L'étude *in vivo* a confirmé l'effet hépatoprotecteur des extraits, en particulier de leur association, qui a permis une restauration presque complète de l'architecture hépatique chez des rats Wistar exposés au paracétamol pendant huit semaines, réduisant significativement les lésions induites. En parallèle, l'analyse *in silico* a mis en évidence une bonne biodisponibilité orale des composés majeurs tels que le sulforaphane et la silymarine, ainsi qu'un profil toxicologique favorable, à l'exception de la quercétine, dont le potentiel mutagène suggéré appelle à la prudence. Ces résultats positionnent l'association brocoli–chardon-Marie comme une stratégie naturelle prometteuse pour la prévention des lésions hépatiques liées au stress oxydatif ou à l'exposition à des agents hépatotoxiques.

Mots clés : Activité antioxydante, analyse *in silico*, brocoli, chardon-Marie, hépatoprotection, polyphénols, toxicité du paracétamol



Abstract

In response to the growing interest in effective and safe natural alternatives, this study investigated two medicinal plants available in Algeria: broccoli (*Brassica oleracea*) and milk thistle (*Silybum marianum*), both recognized for their richness in bioactive compounds. The methanolic extracts were subjected to phytochemical analysis, revealing a high content of polyphenols and flavonoids. Antioxidant and anti-inflammatory activities were evaluated *in vitro*. Broccoli exhibited a higher antioxidant capacity ($IC_{50} = 42.7 \mu\text{g/mL}$) compared with milk thistle ($IC_{50} = 51.2 \mu\text{g/mL}$). Regarding anti-inflammatory activity, broccoli showed an IC_{50} of $68.4 \mu\text{g/mL}$, slightly lower than that of milk thistle ($IC_{50} = 73.9 \mu\text{g/mL}$), indicating superior efficacy. The *in vivo* study confirmed the hepatoprotective effect of the extracts, particularly when combined, resulting in an almost complete restoration of liver architecture in Wistar rats exposed to paracetamol for eight weeks, with a significant reduction in induced lesions. In parallel, *in silico* analysis highlighted good oral bioavailability of major compounds such as sulforaphane and silymarin, as well as a favorable toxicological profile, except for quercetin, whose suggested mutagenic potential warrants caution. These findings position the broccoli–milk thistle combination as a promising natural strategy for the prevention of liver damage associated with oxidative stress or exposure to hepatotoxic agents.

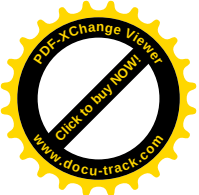
Keywords: Antioxidant activity, *in silico* analysis, broccoli, milk thistle, hepatoprotection, polyphenols, paracetamol toxicity.

ملخص

استجابةً للاهتمام المتزايد بالبدائل الطبيعية الآمنة والفعالة، ركزت هذه الدراسة على نباتين طبييين متوفرين في الجزائر، المعروفين بغناهما بالمرغبات النشطة، (Silybum marianum) وحليب الشوك (Brassica oleracea) هما البروكلي. تم تحليل المستخلصات الميثانولية من الناحية الفيتوكيميائية، حيث أظهرت محتوىً عالياً من البوليفينولات. بيولوجياً، تم تقييم النشاطين المضادين للأكسدة والالتهاب في المختبر، وأظهر البروكلي قدرة مضادة للأكسدة أعلى، والفلافونويدات أما بالنسبة للنشاط المضاد. مل لحليب الشوك/ميكروغرام 51.2 مل، مقابل/ميكروغرام 42.7 له IC_{50} حيث بلغت قيمة 68.4 بلغت IC_{50} للالتهاب، فقد سجل البروكلي قيمة

مما يشير إلى فعالية أفضل، (مل/ميكروغرام $IC_{50} = 73.9$) مل، وهي أقل قليلاً من تلك المسجلة لحليب الشوك/ميكروغرام. وقد أكدت الدراسة داخل الجسم الحي التأثير الواقي للكبد للمستخلصات، لا سيما عند استخدامهما معاً، حيث سُجلت استعادة المعالجة بالباراسيتامول لمدة ثمانية أسابيع، مع انخفاض ملحوظ في "ويستار" شبه كاملة للبنية النسيجية للكبد لدى جرذان. عن توافر بيولوجي فموي جيد للمركبات الرئيسية مثل (in silico) وبالتوازي، كشفت التحاليل الحاسوبية. الأضرار الناتجة السلفورافان والسليمارين، بالإضافة إلى ملف سمية مقبول، باستثناء الكيرسيتين، الذي يشير احتمال تأثيره الطفري إلى حليب الشوك يُعد استراتيجية طبيعية واعدة في الوقاية من الإصابات - تُظهر هذه النتائج أن مزيج البروكلي ضرورة الحذر. الكبدية الناتجة عن الإجهاد التأكسدي أو التعرض لعوامل سامة للكبد

البروكلي، حليب الشوك، الوقاية الكبدية، (in silico) النشاط المضاد للأكسدة، التحليل الحاسوبي: الكلمات المفتاحية البوليفينولات، سمية الباراسيتامول



INTRODUCTION

L'usage des médicaments constitue l'un des piliers de la pratique médicale contemporaine, apportant des bénéfices thérapeutiques incontestables. Cependant, leur innocuité n'est jamais absolue et des réactions indésirables peuvent survenir. En effet, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2023) et des études hospitalières de référence (Pirmohamed et al, 2004), les effets indésirables médicamenteux seraient à l'origine de 5 à 10 % des hospitalisations et représenteraient un facteur contributif dans 5 à 10 % des décès survenant en milieu hospitalier.

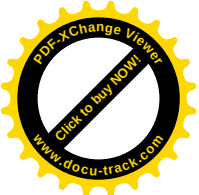
Ces données alarmantes mettent en évidence l'ampleur du danger que peut représenter une prescription inappropriée, une interaction médicamenteuse imprévue ou encore une susceptibilité individuelle mal identifiée.

Face aux risques d'effets indésirables, il est essentiel de comprendre le devenir des médicaments dans l'organisme. Leur élimination mobilise plusieurs organes dits « émonctoires », notamment les reins, les poumons, le tube digestif, et surtout le foie, principal organe de métabolisme et de détoxification (Klaassen & Watkins, 2015). Cette fonction expose le foie à une toxicité médicamenteuse potentiellement sévère, à l'origine de lésions hépatiques (Deleve & Kaplowitz, 1995).

Dans ce contexte, la phytothérapie représente une alternative thérapeutique prometteuse. L'intérêt scientifique croissant pour les plantes médicinales repose principalement sur leur capacité à produire des métabolites secondaires dotés de propriétés pharmacologiques variées, notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et hépatoprotectrices (Newman & Cragg, 2016). Parmi ces espèces végétales, le brocoli « *Brassica oleracea* » se distingue par sa richesse en glucosinolates et en composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, lui conférant un fort potentiel antioxydant (Vale et al, 2015). Le chardon-Marie « *Silybum marianum* », est largement reconnu pour ses effets hépatoprotecteurs, attribués principalement à la silymarine, un complexe de flavonolignanes aux vertus antioxydantes et stabilisatrices de membrane (Federico et al, 2017).

Ces plantes renferment ainsi des composés bioactifs capables de prévenir, limiter ou réparer les lésions hépatiques induites par des substances toxiques, notamment celles d'origine médicamenteuse. En raison de leur richesse en principes bioactifs, ces végétaux font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches en tant que matrices naturelles prometteuses pour le développement de nouveaux agents pharmacologiques d'origine végétale.

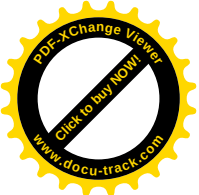
Cette étude s'inscrit ainsi dans cette volonté de proposer des alternatives à la médecine à



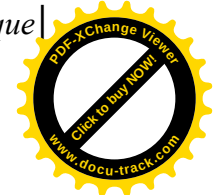
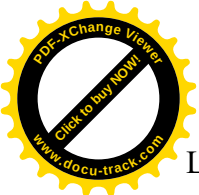
travers l'utilisation d'extraits végétaux à forte activités biologique. De cette manière, une attention particulière a été portée vers ce domaine dans le but de la valorisation des plantes médicinales algériennes. L'étude porte sur l'estimation de la teneur de cette espèce végétale en composés actifs en particulier les polyphénols, et les flavonoïdes et l'évaluation de leurs activités biologiques. Pour ce faire, nous avons fixé les objectifs suivants :

- ✓ Caractérisation phytochimique vise à identifier et quantifier les principaux composés bioactifs, notamment les polyphénols et les flavonoïdes, présents dans le brocoli « *Brassica oleracea* » et le chardon-Marie « *Silybum marianum* ».
- ✓ Évaluer in vitro les activités antioxydante et anti-inflammatoire du brocoli « *Brassica oleracea* » et du chardon-Marie « *Silybum marianum* », respectivement à l'aide de la méthode de piégeage du radical libre DPPH et de la méthode de dénaturation des protéines.
- ✓ Réaliser une étude in vivo pour évaluer l'impact hépatotoxique du paracétamol lors d'une exposition prolongée, en tant que modèle de toxicité médicamenteuse chez des rats mâles Wistar.
- ✓ Analyser les altérations histologiques du foie chez des rats mâles Wistar ayant reçu pendant huit semaines un régime standard enrichi en paracétamol, en brocoli, en chardon-Marie ou en leur combinaison, afin d'évaluer le potentiel hépatoprotecteur de ces extraits végétaux.
- ✓ Évaluer le profil toxicologique in silico des composés bioactifs issus du brocoli « *Brassica oleracea* » et du chardon-Marie « *Silybum marianum* » à partir de leur structure moléculaire.
- ✓ Développer une formulation naturelle à visée hépatoprotectrice en vue d'une application potentielle comme complément alimentaire.

Ce travail comprend une synthèse bibliographique sur l'hépatotoxicité ainsi que sur les propriétés phytochimiques et biologiques du brocoli et du chardon-Marie; une section méthodologique décrivant les analyses phytochimiques, les tests biologiques in vitro, l'étude in vivo portant sur les modifications histologiques hépatiques chez le rat mâle Wistar , la prédiction toxicologique in silico, ainsi que le développement d'un complément alimentaire; enfin, une dernière partie est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus, ainsi qu'aux perspectives de valorisation thérapeutique des extraits étudiés.



CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



L'étude du métabolisme hépatique permet de mieux cerner le rôle potentiel des plantes médicinales dans la protection du foie et la restauration de ses fonctions altérées.

I.1. Métabolisme hépatique et rôle des plantes médicinales

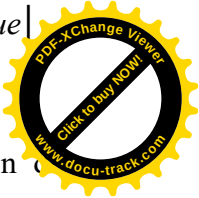
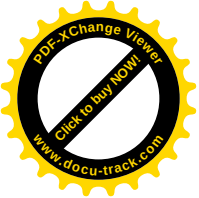
Le foie, organe central du métabolisme, joue un rôle essentiel dans la régulation du glucose, des lipides et des protéines, la synthèse de la bile ainsi que l'élimination des toxines et des médicaments (Vdovíaková et al., 2016). Grâce à sa vascularisation abondante et sa fonction clé dans l'homéostasie, il demeure particulièrement sensible aux déséquilibres nutritionnels, aux agents toxiques et aux infections. Le stress oxydatif représente un facteur majeur dans le développement de nombreuses affections hépatiques chroniques, favorisant l'ischémie, la nécrose, l'apoptose et la fibrose (López-Torres et al., 2002 ; Cichoż-Lach, 2014).

Dans ce contexte, les plantes médicinales suscitent un intérêt croissant pour leurs propriétés hépatoprotectrices, attribuées à la richesse de leurs composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes et saponines (Decock, 2018). Les plantes dites hépatotropes ciblent spécifiquement le foie et exercent des effets variés selon leur composition : certaines sont cholérétiques, stimulant la production de bile (Tahri et al., 2000), d'autres cholagogues, facilitant son évacuation (Bruneton, 2009), ou amphocholérétiques, modulant son débit selon les besoins physiologiques. Plusieurs d'entre elles agissent également comme agents hépatoprotecteurs directs, réduisant les lésions induites par des substances toxiques, notamment d'origine médicamenteuse (Valenzuela et Garrido, 1994 ; Bruneton, 2009).

Dans le domaine de la recherche biomédicale, le rat Wistar est largement reconnu comme modèle animal de référence en raison de sa facilité de manipulation, de sa bonne tolérance aux protocoles expérimentaux, de sa reproduction rapide et de sa physiologie bien caractérisée (Sengupta, 2013). Son foie, qui représente environ 5 % de la masse corporelle, est dépourvu de vésicule biliaire et présente une organisation lobaire bien définie, ce qui en fait un organe particulièrement adapté à l'étude des fonctions hépatiques et des altérations histopathologiques. Ces caractéristiques font du rat Wistar un modèle privilégié pour l'évaluation des effets hépatotoxiques, hépatoprotecteurs ou encore hépatothérapeutiques de substances d'origine naturelle (Gómez-Lechón et al., 2014).

I.1.1 Métabolisme hépatique normal et pathologique

Le foie est un organe vital qui régule l'homéostasie métabolique en contrôlant la glycémie, le métabolisme des lipides et des protéines, la détoxification des substances et la production de bile pour la digestion des graisses, assurant ainsi l'équilibre biochimique de l'organisme.



Le métabolisme hépatique inclut plusieurs processus : la glycogénolyse (dégradation du glycogène en glucose) et la glycogénogenèse (synthèse de glycogène à partir du glucose), régulés par le glucagon et l'insuline respectivement (Sherlock et al., 2011; Vasconcelos et al., 2020). La gluconéogenèse produit du glucose à partir de lactate, acides aminés et glycérol (Chung et al., 2016). Le métabolisme lipidique comprend la lipogenèse (synthèse des acides gras) et la β -oxydation (dégradation des acides gras pour l'énergie) (Smith et al., 2023; Monga et al., 2010), ainsi que la synthèse des lipoprotéines et du cholestérol (Kuntz & Kuntz, 2008).

Le métabolisme protéique inclut la synthèse des protéines plasmatiques et le cycle de l'urée, éliminant l'ammoniaque (James et al., 2002; Haussinger, 1990). Enfin, le foie joue un rôle crucial dans la détoxification des toxines via le cytochrome P450 et l'excrétion biliaire de la bilirubine, tout en stockant les vitamines liposolubles (Zanger et al., 2013; Hall & Guyton, 2021). Cependant, des perturbations de ces processus peuvent entraîner des désordres hépatiques graves. Le stress oxydatif et l'inflammation chronique jouent un rôle clé dans la physiopathologie des atteintes hépatiques, en induisant des dommages cellulaires, une fibrose progressive et une altération des fonctions hépatocytaires. Les hépatocytes produisent naturellement des radicaux libres (ROS) durant le métabolisme des acides gras, mais une surproduction de ROS, exacerbée par des facteurs comme l'alcoolisme, l'obésité, les infections virales ou l'exposition à des toxines, peut entraîner des lésions cellulaires (Cichoż-Lach & Michalak, 2014). Les ROS altèrent la membrane des cellules hépatiques, compromettant leur intégrité et contribuant au développement de maladies hépatiques (Poli et al., 2008).

Les pathologies hépatiques les plus courantes comprennent la stéatose hépatique (accumulation anormale de lipides dans le foie), la cirrhose (fibrose avancée du tissu hépatique) et l'insuffisance hépatique, qui se manifeste par une perte progressive ou brutale des fonctions vitales du foie (Guyton & Hall, 2021). Ces altérations se traduisent biologiquement par une élévation des enzymes hépatiques, notamment l'ASAT (aspartate aminotransférase) et l'ALAT (alanine aminotransférase), ainsi que par une augmentation de la bilirubine, indiquant une souffrance hépatocellulaire et un dysfonctionnement de l'excrétion biliaire. L'inflammation chronique du foie induit un stress oxydatif, une résistance à l'apoptose, une accumulation de matrice extracellulaire,

Ces perturbations conduisent à une régénération hépatocytaire anormale, avec formation de nodules cirrhotiques. À un stade avancé, la destruction du parenchyme hépatique peut s'accompagner de signes de malignité, tels que des hémorragies, une nécrose, un rapport noyau/cytoplasme élevé, des noyaux arrondis à chromatine condensée, une membrane nucléaire épaissie, des nucléoles proéminents, des thromboses de la veine porte, une invasion vasculaire. L'ensemble de ces états pathologiques est illustré à la figure 1.

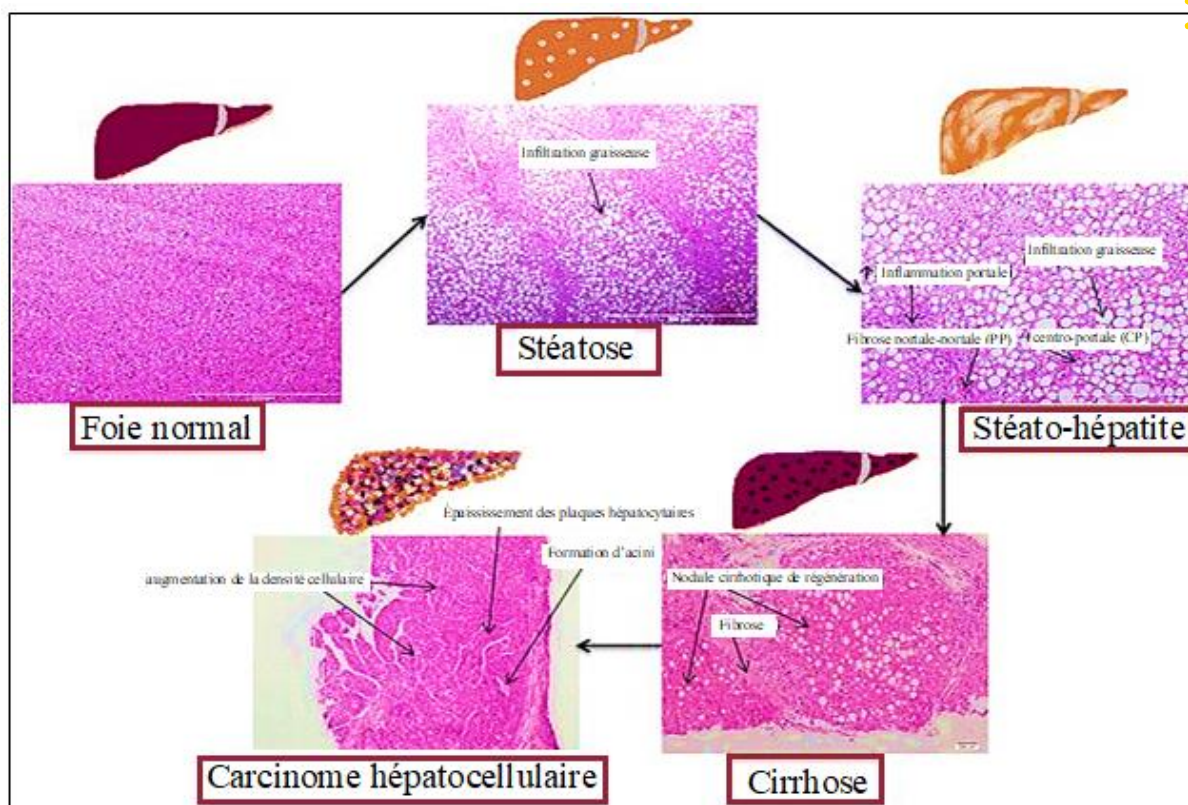


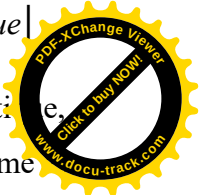
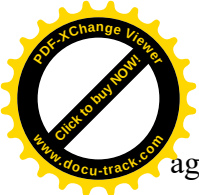
Figure 1 : Représentation d'un foie normal et d'un foie atteint, au niveau de l'organe et du tissu hépatique (Rai et al., 2017).

I.1.2. Effets des composés phytochimiques sur les fonctions hépatiques

Les composés phytochimiques (ou phytoconstituants) présentent une grande diversité d'effets sur les fonctions hépatiques, pouvant être bénéfiques (hépatoprotecteurs) ou dans certains cas délétères (hépatotoxiques). Leur impact dépend étroitement de leur nature chimique, de la posologie administrée, ainsi que de l'état physiopathologique du foie.

Un grand nombre de substances bioactives d'origine végétale ont démontré des propriétés hépatoprotectrices significatives, principalement grâce à leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires et détoxifiantes, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du parenchyme hépatique.

Parmi ces composés, les polyphénols se distinguent par leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS), à atténuer le stress oxydatif et à moduler la réponse inflammatoire, notamment en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$. Ils favorisent également l'augmentation des niveaux de glutathion (GSH), un antioxydant intracellulaire clé dans les processus de détoxification hépatique (Ben Salem et al., 2015).



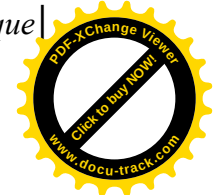
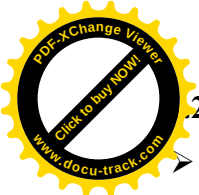
Les flavonoïdes, en plus de leur rôle dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique, agissent sur l'activité des enzymes du cytochrome P450 (CYP450), facilitant ainsi le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques et des substances potentiellement toxiques (Hodges & Minich, 2015). Les glucosinolates, abondamment présents dans les légumes crucifères tels que le brocoli et le chou, induisent l'expression d'enzymes de phase II, notamment les glutathion-S-transférases. Ces enzymes participent activement à la neutralisation et à l'élimination des agents cancérogènes, renforçant ainsi les mécanismes de défense hépatique (Zhang et al., 2012). Enfin, la silymarine, un complexe de flavonolignanes extrait du chardon-Marie (*Silybum marianum*), possède une activité hépatoprotectrice bien documentée. Elle agit en stabilisant les membranes cellulaires des hépatocytes et en neutralisant les radicaux libres, réduisant ainsi les lésions induites par l'éthanol, les toxines environnementales et divers agents pharmacologiques (Abenavoli et al., 2018).

I.1.3. Contribution des plantes médicinales à la protection et la régénération du foie

Les plantes médicinales ont été utilisées à travers l'histoire dans diverses cultures pour leurs propriétés thérapeutiques (Bruneton, 1999). Leur utilisation repose souvent sur des connaissances empiriques transmises de génération en génération. De nos jours, la recherche scientifique explore et valide de nombreuses plantes pour leurs composés bioactifs et leurs applications médicinales potentielles (Mukherjee, 2002).

Parmi ces plantes médicinales, le brocoli qui contribue à la protection et à la régénération du tissu hépatique, notamment grâce à la présence de sulforaphane, un isothiocyanate capable d'activer la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cette voie joue un rôle clé dans la prolifération des hépatocytes et la régénération du foie après une lésion (Liu et al., 2018). Et le chardon-marie, quant à lui, est une plante médicinale largement étudiée pour ses effets protecteurs et régénérateurs sur le foie.

Son principe actif majeur, la silymarine, est un complexe de flavonolignanes comprenant principalement la silybine, la silychristine et la silydianine (Abenavoli et al., 2018), dont les propriétés hépatoprotectrices sont bien établies. La silymarine stimule la synthèse protéique au sein des hépatocytes (Polyak et al., 2013), favorisant ainsi la réparation cellulaire, et active des facteurs de croissance tels que le TGF- β 1, impliqués dans les processus de régénération tissulaire (Wu et al., 2021). Par ailleurs, la silymarine module l'activité de plusieurs isoformes du cytochrome P450, notamment CYP3A4 et CYP2E1, ce qui facilite le métabolisme des substances toxiques (Sridar et al., 2004). Elle induit également les enzymes de phase II, telles que les glutathion-S-transférases, contribuant à la neutralisation et à l'élimination des composés carcinogènes (Hackett et al., 2013 ; Ferenci et al., 2008 ; Rambaldi et al., 2005).



2. Plantes médicinales d'intérêt : brocoli et chardon marie

□ Brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

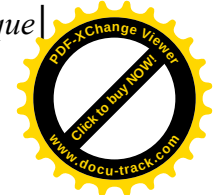
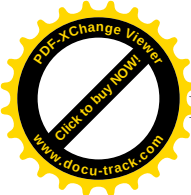
Le brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) est un légume vert à inflorescence, appartenant au genre *Brassica* et à la famille des Brassicacées. Il est une riche source de nutriments, comprenant des fibres alimentaires, des vitamines, des minéraux et divers composés phytochimiques. Parmi ces derniers, les glucosinolates et leurs produits de dégradation sont particulièrement étudiés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, incluant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antimicrobiennes, neuroprotectrices et rénoprotectrices (Li et al., 2022 ; Park et al., 2023).

Le brocoli est une plante bisannuelle, apparentée au chou, au chou-fleur, au chou frisé, au navet, à la moutarde et aux choux de Bruxelles (Nagraj et al., 2020). La famille des Brassicacées comprend jusqu'à 338 genres et 3 709 espèces, caractérisées par leurs fleurs à quatre pétales en croix. Ces plantes sont répandues sur tous les continents sauf l'Antarctique (Hasanuzzaman, 2020). Le terme « brocoli » vient de l'italien *broccolo*, signifiant « la crête fleurie d'un chou » (Lettre, 2016, à confirmer). Son origine serait liée aux ancêtres sauvages de la région orientale de la Méditerranée (Mabry, 2021).

➤ Chardon-Marie (*Silybum marianum*)

Le chardon-Marie, scientifiquement nommé *Silybum marianum* (L.) Gaertn est une plante médicinale herbacée, annuelle ou bisannuelle, appartenant à la famille des Astéracées et au genre *Silybum*. Originaire du sud de l'Europe, de l'Asie Mineure et de l'Afrique du Nord, il est utilisé en médecine traditionnelle depuis environ 2000 ans pour ses propriétés thérapeutiques (Abenavoli et al., 2018).

Cette plante est particulièrement résistante, capable de s'adapter à des environnements difficiles tels que le froid, la sécheresse et la salinité (Martinelli, 2019 ; Papadimou et Golia, 2024). Elle est riche en silymarine, un complexe de bioflavonoïdes largement reconnu pour ses propriétés hépatoprotectrices. La silymarine est utilisée dans le traitement de divers troubles hépatiques et agit par plusieurs mécanismes : antioxydants, anti-inflammatoires, stabilisation des membranes cellulaires et inhibition de l'accumulation de collagène qui peut conduire à la cirrhose. De plus, elle est un antidote efficace contre les hépatotoxiques, notamment certains médicaments psychotropes et les toxines de *Amanita phalloides* (Bahmani et al., 2015). Une désorganisation de l'architecture hépatique, la mort des cellules parenchymateuses, ainsi qu'une fibrogenèse et une angiogenèse accrues.



1.2.1. Structure, morphologie et valeurs nutritionnelles

➤ Brocoli (*Brassica oleracea var. italica*)

Morphologie et structure

Le brocoli présente un appareil végétatif caractérisé par une tige courte, épaisse et dressée. Celle-ci porte de grandes feuilles alternes, de couleur verte à vert bleuté. Leur morphologie est oblongue à lancéolée, avec une marge ondulée et plus ou moins dentée. Le limbe est épais et de texture cireuse, et les feuilles sont attachées par un long pétiole. Leur disposition spiralee autour de la tige favorise le développement de l'inflorescence centrale.

L'organe de consommation principal est une inflorescence immature, composée d'une multitude de bourgeons floraux serrés et de couleur verte, formant une tête compacte communément appelée « pomme ». Si elle n'est pas récoltée, cette inflorescence poursuit son développement pour produire des fleurs jaunes typiques des Brassicacées, à quatre pétales en croix, qui donneront ensuite des siliques allongées contenant des graines rondes et brunâtres.

Le système racinaire, de type fasciculé, est bien ramifié et relativement superficiel. Bien qu'assurant un ancrage adéquat et une absorption efficace de l'eau et des nutriments, il rend la plante relativement sensible au stress hydrique (Pelt et al., 2011).

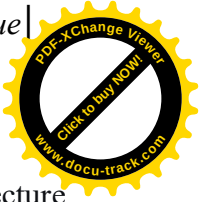
Valeur nutritionnelle

Le brocoli est reconnu pour sa haute densité nutritionnelle. Il est tout d'abord caractérisé par sa faible teneur en calories, due principalement à sa forte proportion d'eau qui confère à ce légume une faible densité énergétique (Campas-Baypoli et al., 2009 ; Marchioni et al., 2021 ; Dereje et al., 2023).

Sur le plan des macronutriments, il constitue une source non négligeable de protéines végétales et apporte des glucides en quantités modérées (López-Cervantes, 2013 ; Rodríguez-Pallares et al., 2022). Il est également remarquablement riche en fibres alimentaires, essentielles au bon fonctionnement du transit intestinal (Rivas et al., 2022 ; Yanaka, 2018).

Son profil micronutritionnel est exceptionnel. Le brocoli se distingue notamment par sa teneur élevée en vitamine C (Sakulsataporn et al., 2020 ; López-García et al., 2019), et constitue également une bonne source de vitamines E et K (Agagündüz et al., 2022).

➤ Chardon-Marie (*Silybum marianum*)



Morphologie et structure

Le chardon-Marie est une plante herbacée bisannuelle présentant une architecture caractéristique. Son appareil végétatif se compose de tiges dressées et striées, pouvant atteindre une hauteur de 60 cm à 1,5 mètre, et souvent recouvertes d'un duvet blanchâtre. Ces tiges portent de grandes feuilles jusqu'à leur sommet. Ces feuilles, de forme ovale à lancéolée inversée, peuvent mesurer jusqu'à 50 cm de long sur 30 cm de large. Leur caractéristique morphologique la plus remarquable est leur marge lobée de manière très variable, pouvant être peu profonde, profonde, voire complètement divisée (Zhang et al., 2024).

L'appareil reproducteur est constitué de capitules floraux aux fleurs principalement de couleur rouge violacé, parfois blanches. La période de floraison et de fructification s'étend de mai à août. Les fruits sont des akènes brunâtres de forme ellipsoïdale, légèrement aplatis et ornés de taches ou de rayures brun foncé (Zhang et al., 2024).

Enfin, la plante dispose d'un système racinaire pivotant, profond et bien développé. Cette adaptation lui confère une excellente résistance à la sécheresse et aux conditions environnementales difficiles (Bruneton, 2016).

Valeur nutritionnelle et phytochimique des graines

Les graines du chardon-Marie se distinguent par une composition nutritionnelle et phytochimique exceptionnelle, concentrant ses principaux intérêts thérapeutiques.

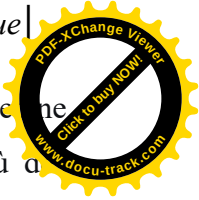
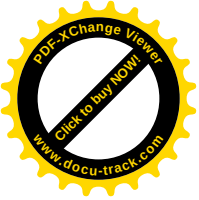
Composés actifs : Elles sont notamment riches en silymarine, un complexe flavonolignane qui constitue le principal principe actif (entre 2 et 3 %), réputé pour ses puissantes propriétés hépatoprotectrices et antioxydantes (Abenavoli et al., 2018).

Macronutriments : Leur profil nutritionnel révèle une teneur élevée en protéines (20 à 30 %), une proportion significative de fibres alimentaires (25 à 30 %) bénéfiques pour le transit intestinal, et une richesse en acides gras polyinsaturés, particulièrement en acide linoléique (oméga-6), contribuant à la santé cardiovasculaire (Surai, 2015 ; Kroll et al., 2007).

Micronutriments : Les graines contiennent également de la vitamine E, un antioxydant naturel, ainsi que des minéraux essentiels tels que le magnésium, le potassium, le zinc et le calcium, bien qu'en quantités modérées (Surai, 2015 ; Federico et al., 2017).

I.2.2. Usages traditionnels et modernes

➤ Brocoli



L'importance historique du brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) dans la médecine traditionnelle est particulièrement marquée dans son habitat méditerranéen d'origine, où de nombreuses références anciennes rapportent son utilisation sous forme de formulations pour traiter des troubles gynécologiques, tels que l'endométriose et les affections utérines, témoignant d'une reconnaissance ancienne de son rôle bénéfique dans le soutien de la santé maternelle, en particulier chez les femmes ménopausées (Jhazmin et al., 2024). Ces effets traditionnels sont aujourd'hui principalement attribués à ses puissantes propriétés anti-inflammatoires, liées à sa richesse en composés bioactifs.

Les recherches modernes ont en effet validé et étendu ces usages, en démontrant des propriétés pharmacologiques prometteuses. Le brocoli et ses dérivés, notamment le sulforaphane, possèdent ainsi des propriétés anticancéreuses bien documentées : ils inhibent la prolifération des cellules cancéreuses, stimulent l'apoptose, réduisent l'inflammation et freinent l'angiogenèse (Kaiser et al., 2021 ; Nandini et al., 2020 ; Elkashty et al., 2020). Dans la prise en charge du diabète de type 2, les micropousses et la poudre de brocoli se sont avérées efficaces pour améliorer la sensibilité à l'insuline et contribuer à la réduction de la glycémie, en particulier en synergie avec l'activité physique (Ma et al., 2022 ; Falleh et al., 2022). Par ailleurs, son potentiel anti-inflammatoire se manifeste aussi dans la gestion des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et dans la réduction de l'inflammation hépatique (Zandani et al., 2021). Enfin, le brocoli contribue également à atténuer l'inflammation respiratoire et le stress oxydatif, ouvrant des perspectives pour le soutien de la santé pulmonaire (Suryadinata et al., 2022 ; Tsai et al., 2022).

➤ Chardon-Marie

Le Chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.)) occupe une place importante en médecine traditionnelle, où il a été historiquement utilisé pour traiter une grande variété d'affections au-delà des maladies hépatiques chroniques, notamment des troubles gastro-intestinaux, des affections cutanées et des maladies inflammatoires (Alves et al., 2024). Son principal métabolite secondaire, la silymarine, est reconnu comme le principal vecteur de ses effets thérapeutiques.

Au cours de la dernière décennie, la recherche sur cette plante et son principe actif s'est considérablement intensifiée, validant et élargissant son champ d'application pharmacologique. Son effet hépatoprotecteur, le plus célèbre, est solidement établi (Vargas-Mendoza et al., 2024), et elle s'est révélée particulièrement prometteuse dans la prise en charge de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), dont la prévalence mondiale ne cesse d'augmenter (Navarro et al., 2019).

Les recherches modernes ont mis en lumière un large éventail de propriétés pharmacologiques pour la silymarine, incluant des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antifibrotiques puissantes (Karimi, 2011). Elle démontre également une capacité à stimuler la biosynthèse des protéines, à augmenter la lactation et à moduler le système immunitaire (Abenavoli et al., 2010). Par ailleurs, des études précliniques ont démontré son potentiel en oncologie, avec une action inhibitrice sur la prolifération cellulaire, la synthèse de l'ADN et les signaux mitogènes dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines, notamment celles du sein, de la prostate et du col de l'utérus (Deep et al., 2007)

I.2.1. Activités anti-inflammatoires et antioxydantes

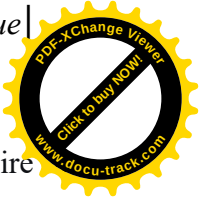
I.2.1.1. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation constitue une réponse immunitaire cruciale, mais sa persistance sous forme chronique est impliquée dans la genèse de plusieurs maladies, notamment l'arthrite, les troubles cardiovasculaires et certains cancers (Medzhitov, 2008 ; Libby, 2007). Dans ce cadre, les composés végétaux naturels attirent une attention particulière pour leurs effets anti-inflammatoires, leur efficacité thérapeutique et leur faible toxicité (Aggarwal & Harikumar, 2009 ; Pan et al., 2010).

➤ **Brocoli**

Le processus inflammatoire, bien qu'essentiel à la défense immunitaire, peut devenir pathologique s'il se chronicise, contribuant ainsi au développement de diverses affections (Gusev et al., 2022). Des études ont mis en évidence le potentiel anti-inflammatoire remarquable du brocoli, attribué à sa richesse en composés phytochimiques bioactifs. Parmi ces composés, le sulforaphane (SFN), l'indole-3-carbinol (I3C), les isothiocyanates (ITC) et les flavonoïdes (dont la quercétine) jouent un rôle prépondérant. Leurs mécanismes d'action incluent la réduction de la production de médiateurs pro-inflammatoires clés tels que l'IL-6, le TNF- α et les prostaglandines (Syed et al., 2023 ; Hwang et al., 2014 ; Zuo et al., 2019).

Le SFN agit de plus comme un immunomodulateur en influençant l'activité des macrophages et des lymphocytes (Liang et al., 2022; Nandini et al., 2020). Parallèlement, la quercétine module significativement les voies de signalisation inflammatoire, notamment celle du facteur de transcription NF- κ B (Schieber et al., 2014).



Chardon-Marie

Le chardon-Marie, quant à lui, doit principalement son activité anti-inflammatoire la silymarine, un complexe flavonolignane dont la silybine (ou silibinine) est le composant le plus actif et le plus étudié. Son action s'exerce principalement par l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B, un régulateur central de l'inflammation. Ce mécanisme se traduit par une réduction de l'expression des enzymes pro-inflammatoires COX-2 et iNOS, et par une modulation de la libération des cytokines telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Kim et al., 2014; Polyak et al., 2013). Grâce à ces actions concertées, la silymarine contribue efficacement à atténuer la réponse inflammatoire dans divers modèles pathologiques.

I.2.1.2. Activité anti-oxydante

Le stress oxydatif, déséquilibre entre ROS et défenses antioxydantes, contribue au vieillissement et aux maladies chroniques (Finkel et al., 2000). Les antioxydants végétaux offrent une protection significative .

➤ Brocoli

Riche en glucoraphanine (précurseur du SFN), polyphénols et caroténoïdes. Neutralise directement les radicaux libres et active les enzymes antioxydantes de phase II via la voie Nrf2 (Syed et al., 2023 ; Endale et al., 2013).

➤ □ Chardon-Marie

Sa silymarine, notamment la silybine, augmente le glutathion, stimule la SOD et la CAT, et inhibe la peroxydation lipidique, conférant une protection hépatique et chimiopréventive (Abenavoli et al., 2018; Surai et al., 2015).

I.2.2. Autres activités biologiques

Propriété biologique	Brocoli	Chardon-Marie
Activité anticancéreuse	Mécanisme : Inhibition de la tumorigenèse et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose via modulation des voies cellulaires Composés actifs : Sulforaphane (SFN), Indole-3-carbinol (I3C) Cibles : Sein, prostate, poumon, colorectal Voies : Activation Nrf2, voie MAPK	Mécanisme : Inhibition de la carcinogenèse, blocage de la croissance tumorale, induction de l'apoptose, inhibition de l'angiogenèse Composés actifs : Silymarine (Silybine) Cibles : Peau, côlon, poumon, prostate, foie, vessie, langue Effets : Réduction VEGF, potentialisation des chimiothérapies
Activité antimicrobienne	Mécanisme : Inhibition enzymatique, altération structurale, stress oxydatif Cibles : Helicobacter pylori, Escherichia coli, Staphylococcus aureus Composés : GSL, ITC	Mécanisme : Action directe sur les micro-organismes Cibles : Bactéries Gram+ et Gram-, champignons Composés : Silybine, acides oléique et linoléique

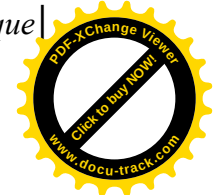
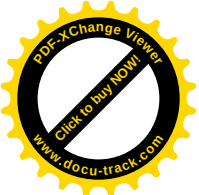
Propriété biologique	Brocoli	Chardon-Marie
Activité métabolique	Mécanisme : Régulation de la résistance à l'insuline, suppression de l'adipogenèse Effets : Réduction glycémie, HbA1c, hypertension Voies : Nrf2, AMPKc	Information non spécifiquement rapportée
Pharmacocinétique	Information non spécifiquement rapportée	Demi-vie : ~6 heures Excrétion : Urines (3-8%), bile (80%) Formes : Glucuronoconjugués, sulfates

I.3. Formes galéniques modernes des extraits de plantes

L'évolution des formes galéniques dans le domaine des compléments alimentaires répond à une double exigence : améliorer l'expérience utilisateur et optimiser l'efficacité des principes actifs. Les innovations récentes visent à concilier praticité, attractivité et performance pharmacotechnique.

Parmi les formes les plus prisées figurent les gommes vitaminées (gummies), appréciées pour leur goût agréable, leur texture et la précision de leur dosage, ce qui favorise significativement l'observance thérapeutique (Baraniak & Kalembe-Drożdż, 2020). Les sprays sublinguaux connaissent également un essor notable, en particulier pour des composés comme la vitamine D ou la mélatonine, grâce à leur absorption rapide par la muqueuse buccale qui contourne le métabolisme de premier passage (Lecerf, 2021).

Parallèlement, d'autres formulations sophistiquées se développent pour cibler spécifiquement la libération des principes actifs. On trouve ainsi des poudres instantanées conditionnées en sticks, des capsules végétales gastro-résistantes protégeant les substances fragiles de l'acidité gastrique, ou encore des microgranules à libération prolongée permettant une diffusion optimale selon les besoins physiologiques.



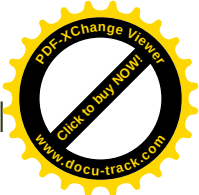
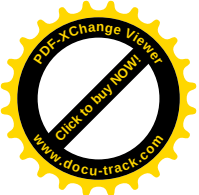
Ces avancées galéniques ne se limitent pas au seul confort d'utilisation. Elles permettent surtout d'améliorer la biodisponibilité des composés actifs et d'en garantir la stabilité, deux paramètres essentiels pour assurer l'efficacité finale du complément alimentaire (Ribes et al., 2017).

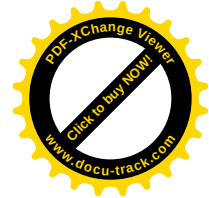
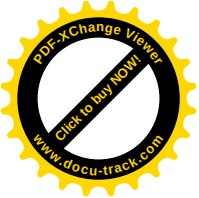
I.4. Analyse in silico du profil toxicologique des composés bioactifs

Les méthodes in silico permettent de prédire les propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des molécules à partir de leur structure chimique, offrant une approche rapide et économique pour évaluer leur comportement biologique avant les tests expérimentaux (Raies et al., 2016).

La plateforme ADMETlab 3.0, développée par le Shanghai Institute of Materia Medica, constitue un outil performant pour cette analyse. Elle génère automatiquement plus de 300 paramètres ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité), incluant notamment l'absorption intestinale, la perméabilité membranaire, les interactions enzymatiques, et divers types de toxicité (Xiong et al., 2021).

L'intégration de cet outil dans notre étude permet d'établir le profil de sécurité des composés bioactifs naturels sélectionnés et de guider le choix de la formulation galénique, de la posologie et de la voie d'administration. Cette analyse préliminaire est donc essentielle au développement d'une formulation combinée à potentiel phytothérapeutique

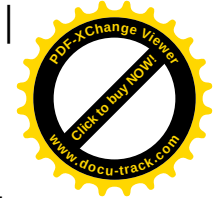
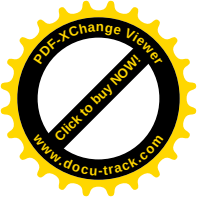




CHAPITRE II :

MATERIEL ET

METHODES



Nous avons mené une étude expérimentale entre les mois de mars et juillet, visant au développement et à l'évaluation d'une nouvelle forme galénique à base d'extraits de plantes médicinales. Cette recherche met l'accent sur l'optimisation de la stabilité physico-chimique ainsi que sur l'efficacité pharmacologique de la formulation. L'étude combine des analyses *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, et porte principalement sur la caractérisation phytochimique des polyphénols extraits des graines de brocoli « *Brassica oleracea* » et chardon-Marie (*Silybum marianum* L. Gaertn.), ainsi que sur l'évaluation de leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire.

L'étude *in vitro* a été réalisée sur les extraits des graines des deux plantes *Brassica oleracea* et *Silybum marianum* L. Gaertn, tandis que l'étude *in vivo* a été menée sur un modèle animal (rats Wistar) chez lesquels une hépatotoxicité a été induite par le paracétamol, suivie d'un traitement à base d'extraits des deux plantes. Parallèlement, une analyse *in silico* a été conduite pour évaluer la sécurité des composés identifiés et exclure tout risque potentiel de toxicité. Cette étape s'inscrit dans la perspective de développer un complément alimentaire fondé sur ce mélange phytothérapeutique.

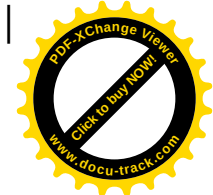
Les travaux expérimentaux ont été réalisés au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de Bou Ismaïl, au Centre ORPIN de Blida, et en collaboration avec leurs partenaires, notamment le Laboratoire de Développement et de Contrôle des Préparations Pharmaceutiques Hospitalières (service de chimie analytique, CHU d'Annaba).

II.1.1. Matériel non biologique

Une variété de matériel non biologique incluant verrerie, réactifs et équipements a été utilisée pour la mise en œuvre des protocoles expérimentaux, menés au Centre de Recherche en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de Bou Ismaïl, au Centre ORPIN de Blida, ainsi qu'à l'Université Saad Dahlab de Blida 1.

Tous les réactifs employés sont de qualité analytique, parmi lesquels : éthanol (96 %), méthanol (99,5 %), 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), acétate de sodium, acide chlorhydrique, acide sulfurique, carbonate de sodium, chlorure de sodium, dihydrogénophosphate de potassium, eau distillée et DMSO. L'ensemble des équipements, matériels et réactifs utilisés est détaillé dans l'Annexe 1.

II.1.2. Matériel biologique



II.1.2.1. Matériel végétal

Le choix de *Brassica oleracea* et *Silybum marianum* L. Gaertn dans cette étude repose sur une enquête préliminaire mettant en évidence leurs remarquables propriétés thérapeutiques dans le traitement de diverses pathologies.

➤ Echantillonnage

La collecte des échantillons a été réalisée par l'équipe du Centre ORPIN de Blida, par temps chaud et sec, peu après le lever du soleil, afin d'éviter toute humidification des plantes. Cette précaution vise à réduire le risque de moisissure ou de fermentation, souvent causé par un séchage prolongé dû à la présence de rosée ou d'eau de pluie, et qui peut altérer les propriétés thérapeutiques des échantillons.

Lors de la récolte, les parties abîmées ou fanées ont été systématiquement écartées. Les graines de *Brassica oleracea* et de *Silybum marianum* (L.) Gaertn ont été prélevées dans la pépinière du Centre ORPIN, située à Douaouda (wilaya de Tipaza, Algérie), conformément aux normes en vigueur relatives à la collecte et à la conservation des plantes médicinales **(Annexe 1).**

II.1.2.2. Animaux

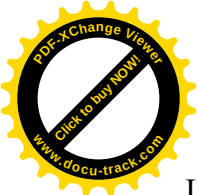
➤ Animaux étudiés

L'expérimentation animale a porté sur 30 rats mâles de souche Wistar, pesant entre 80 et 100 g, fournis par le centre d'élevage de l'Institut Pasteur de Kouba, Alger. L'élevage s'est déroulé dans l'animalerie de la station expérimentale de l'Université Saad Dahlab Blida 1 sur une période de huit semaines et deux jours (63 jours).

Les animaux ont été logés dans des cages en polyéthylène, identifiées par le nom du lot et garnies de copeaux de bois comme litière. Cette dernière, a été renouvelée tous les deux jours. Les conditions d'élevage ont été rigoureusement contrôlées : température ambiante de 25 ± 2 °C, humidité relative fixée à 35 %, et alternance jour/nuit de 12 h/12 h **(Annexe 2).**

Avant l'application du protocole de toxicité et de traitement, une phase d'adaptation d'une semaine a été effectuée, durant laquelle les rats ont reçu un régime alimentaire standard. Leur poids a été suivi par des pesées effectuées régulièrement tous les cinq jours.

➤ Supplémentation alimentaire



L'aliment standard utilisé dans cette étude a été fourni par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB) d'El-Kssar (Béjaïa). Il est distribué aux animaux sous forme de granulés (**Annexe 3**), à raison de 25 g/jour/rat, conformément aux recommandations nutritionnelles définies par Reeves et al (1993). Cette ration est renouvelée chaque jour.

Le paracétamol (ou acétaminophène) est broyé sous forme de poudre, puis solubilisé dans de l'eau pour obtenir une solution administrée par gavage à l'aide d'une sonde (voir Annexe 3). La dose utilisée pour induire une hépatotoxicité est de 2 g/kg, conformément aux données de toxicité rapportées dans la littérature (Jaeschke et al., 2012).

Tous les groupes d'animaux reçoivent un régime alimentaire identique sur le plan nutritionnel. La seule différence entre les groupes concerne le type de traitement administré : paracétamol seul, extrait d'une seule plante, ou extrait combiné des deux plantes.

II.2. Méthodes

II.2.1. Etude *in vitro*

Cette étude évalue plusieurs paramètres expérimentaux *in vitro*. La méthodologie adoptée est synthétisée dans le schéma suivant (Figure 2).

Brocoli (*Brassica oleracea*) et chardon-Marie (*Silybum marianum*)

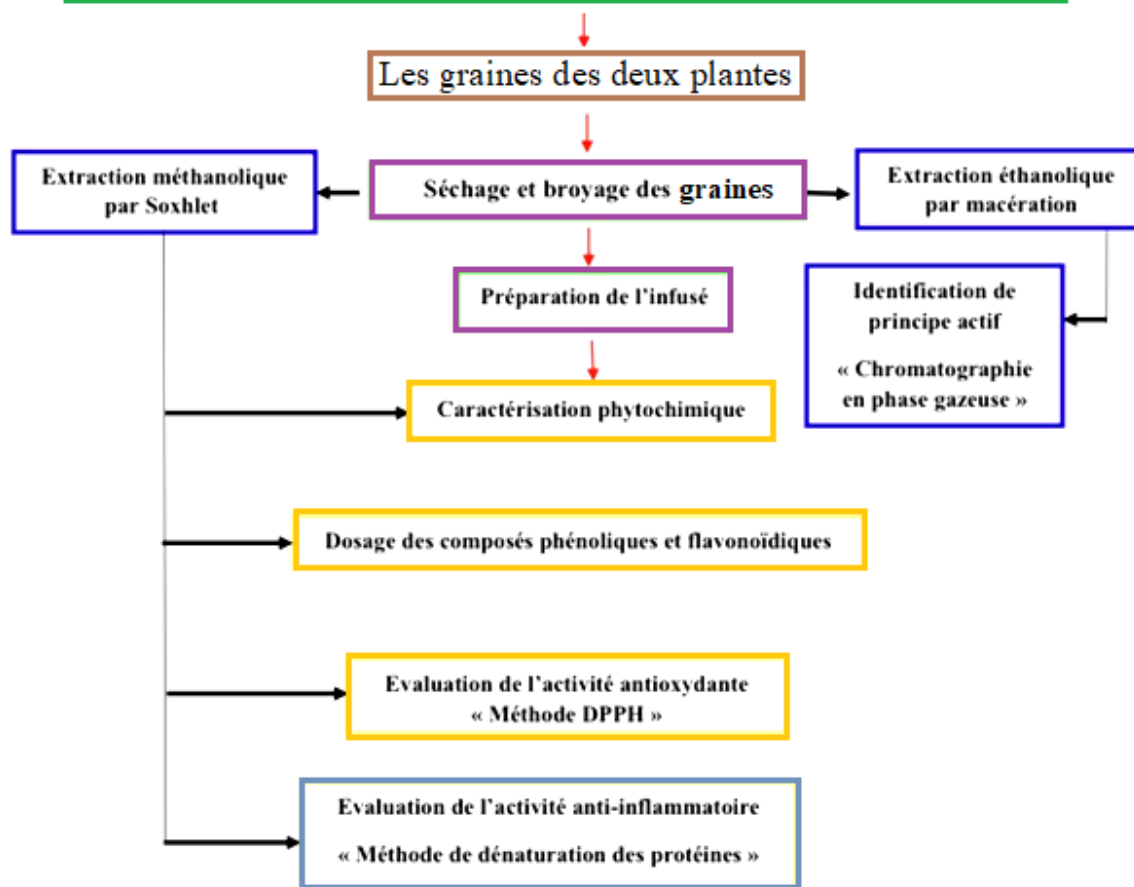
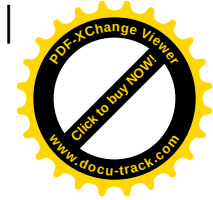
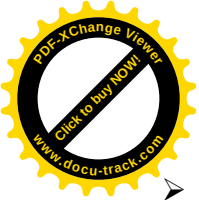


Figure 2 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale *in vitro*

➤ Récolte, séchage et broyage des graines

Les graines de brocoli (*Brassica oleracea*) et de chardon-Marie (*Silybum marianum*) ont été récoltées par l'équipe du Centre ORPIN, unité de production Morinaga House. Après la récolte, les graines ont été soigneusement lavées, puis laissées à sécher à l'ombre, à température ambiante, dans un environnement propre et bien ventilé. Une fois totalement sèches, les graines ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique. Le broyat obtenu a ensuite été tamisé afin d'éliminer les particules grossières. La poudre fine ainsi récupérée a été conservée dans des sachets hermétiques sous vide, à température ambiante, en attendant son utilisation.



➤ Extraction méthanolique

• Principe du Soxhlet

Il s'agit d'une extraction solide liquide. L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de solides de toutes tailles, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. . Les vapeurs condensées ont tendance à entrer en contact avec la poudre de l'échantillon et la partie soluble de la poudre se mélange au solvant.

L'extracteur utilise le principe de reflux de solvant et de siphon pour extraire de manière continue la matière solide par solvant pur, ce qui garantit l'efficacité et la haute efficacité de l'extraction par solvant. Le broyage de la matière solide est effectué avant l'extraction pour maximiser la zone de contact solide-liquide.

Le matériau solide est placé dans un porte-filtre en papier et placé dans un extracteur. L'extrémité inférieure de l'extracteur est reliée à un ballon à fond rond contenant le solvant méthanolique et est connectée à un condenseur à reflux. Le ballon inférieur est ensuite chauffé pour faire bouillir le solvant, ce qui provoque la montée de la vapeur à travers le tuyau de dérivation de l'extracteur, passe par la condensation et tombe dans l'extracteur.

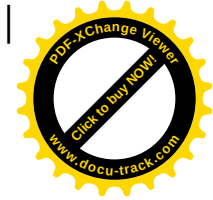
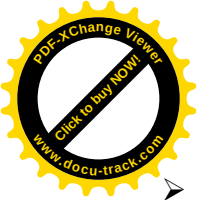
Le solvant est mis en contact avec le pour l'extraction. Lorsque la surface du solvant dépasse le point le plus élevé du siphon, le solvant contenant l'extrait est siphonné. Le flacon, qui extrait ainsi une partie du matériau, est répété de telle sorte que le matériau solide soit systématiquement considéré comme un solvant pur et que le matériau extrait soit concentré dans le flacon.

• Mode opératoire de l'extraction méthanolique

L'extraction au Soxhlet a été effectuée de façon séquentielle, en utilisant un solvant de polarité, le méthanol « MeOH ».

Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de 20 g de matière végétale (graines de brocoli) (graines de chardon-Marie) en poudre, cette cartouche est fixée sur un réservoir (ballon) contenant 300 ml de solvant méthanolique.

Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal au niveau du réfrigérant et s'écoule, ce dernier est aspiré par un siphon qui évacue le solvant du porte-cartouche retournant dans le ballon. Le solvant peut donc recommencer un nouveau cycle d'évaporation condensation. L'extraction se poursuit aux moyennes durant 08 cycles d'extraction pour extraire le maximum des composées bioactifs.



➤ Criblage phytochimique

Le screening phytochimique consiste en un ensemble de réactions physico-chimiques destinées à identifier les principaux groupes de métabolites présents dans les graines de *Brassica oleracea* (brocoli) et de *Silybum marianum* (chardon-Marie). Ces tests sont réalisés soit directement sur la poudre végétale, soit sur une infusion à 10 %. Les protocoles appliqués s'inspirent des méthodes décrites par (Harborne (1998) et Trease & Evans (2002). Parmi les métabolites ciblés figurent principalement les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Détection et dosage des tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables, appartenant à la famille des composés phénoliques, sont largement répandus dans le règne végétal et reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. Leur identification repose sur leur capacité à réagir spécifiquement avec l'iodate de potassium (KIO_3) en milieu acide, conduisant à une coloration allant du jaune au brun, mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 500–550 nm.

Pour la détection des tanins hydrolysables, une solution d'iodate de potassium (KIO_3) à 2,5 % est d'abord préparée dans de l'eau distillée. Les extraits végétaux sont ensuite dilués à différentes concentrations. Pour chaque essai, 2,5 mL de la solution de KIO_3 sont versés dans un tube, puis incubés pendant 7 minutes à 30 °C. Ensuite, 0,5 mL de l'extrait végétal est ajouté, le mélange est agité doucement, puis incubé de nouveau 2 minutes à 30 °C. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par 0,5 mL de méthanol. L'intensité de la coloration obtenue est mesurée par spectrophotométrie, et les résultats sont exprimés en équivalents d'acide tannique (ETA) à partir d'une courbe d'étalonnage.

- **Détection et dosage des tanins condensés**

Les tanins condensés, constitués de polymères de flavan-3-ols, réagissent avec la vanilline en présence d'un acide fort (généralement HCl ou H_2SO_4), produisant un complexe rouge mesurable à environ 500 nm. Cette réaction colorimétrique est proportionnelle à la concentration en tanins. La catéchine est souvent utilisée comme standard pour la calibration.

Pour la détection des tanins condensés, une solution de vanilline à 1 % et une solution de HCl à 8 %, toutes deux préparées dans du méthanol, sont utilisées. Une solution mère de catéchine à une concentration de 1 mg/mL est également préparée dans le même solvant, accompagnée de ses dilutions pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en l'absence d'extrait. Le dosage consiste à mélanger 2,5 mL de solution de vanilline avec



2,5 mL de HCl, puis à ajouter l'extrait végétal. Le mélange est ensuite incubé dans un bain-marie à 30 °C pendant 20 minutes. L'intensité de la coloration rouge formée est mesurée par spectrophotométrie à 500 nm, et les résultats sont exprimés en équivalents de catéchine (EC).

➤ **Dosage des composés phénoliques et flavonoïdiques**

• **Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon les recommandations de Cheok et al. (2013), en utilisant la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu (RFC), décrite pour la première fois en 1965. Les composés phénoliques, ou polyphénols, sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou liés à un glucide. Les principales classes comprennent les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins. Le RFC, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), subit une réduction en présence de composés phénoliques, conduisant à la formation d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Cette réaction produit une coloration bleue, dont l'absorbance maximale se situe entre 725 et 750 nm, proportionnelle à la concentration en polyphénols.

Le protocole expérimental se déroule comme suit : une solution de Na_2CO_3 à 7,5 % est préparée en dissolvant 7,5 g de carbonate de sodium dans 100 mL d'eau distillée. Le RFC est dilué au 1/10 (5 mL de RFC dans 45 mL d'eau distillée). Une solution d'acide gallique (0,2 mg/mL dans le méthanol) est également préparée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, servant de contrôle positif. Pour chaque échantillon, 1 mL de RFC est ajouté à l'extrait, puis laissé au repos pendant 5 minutes, suivi de l'ajout de 800 μ L de Na_2CO_3 . Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Un blanc est préparé pour corriger l'absorbance due au RFC et au méthanol, en mélangeant 1 mL de RFC à 200 μ L de méthanol, puis en ajoutant 800 μ L de Na_2CO_3 et en incubant de la même manière.

La densité optique est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS), en se basant sur la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique.



Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée selon la méthode décrite par Zhishen, Mengcheng et Jianming (1999). Cette méthode repose sur la formation de complexes stables entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en milieu acide, produisant une coloration jaune dont l'absorbance maximale est mesurée à 415 nm.

Le protocole expérimental se déroule comme suit : une solution de AlCl_3 à 10 % est préparée en dissolvant 10 g dans 100 mL de méthanol, tandis qu'une solution de CH_3COONa (0,984 g/100 mL) est préparée dans de l'eau distillée. Une solution de quercétine, utilisée comme standard pour la courbe d'étalonnage, est également préparée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits testés. Après dilution des extraits, 0,5 mL d' AlCl_3 (10 %) et 0,5 mL de CH_3COONa sont ajoutés à chaque échantillon. Un blanc est préparé en mélangeant 1 mL de méthanol, 0,5 mL d' AlCl_3 , et 0,5 mL de CH_3COONa . Tous les mélanges sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS), sur la base de la courbe d'étalonnage obtenue avec la quercétine.

➤ Identification par chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique analytique permettant de séparer, identifier et quantifier les constituants d'un mélange en solution. Les composés dissous dans un solvant (phase mobile) sont introduits dans un système chromatographique où ils interagissent différemment avec la phase stationnaire fixée à l'intérieur d'une colonne chromatographique. La phase mobile est propulsée à travers le système par une pompe sous haute pression, permettant la migration des molécules selon leur affinité pour les deux phases. Chaque composé est détecté à la sortie de la colonne à l'aide d'un détecteur UV, générant un chromatogramme, c'est-à-dire un ensemble de pics correspondant aux différents analytes séparés.

Le système HPLC utilisé dans cette étude est un appareil de marque Agilent, piloté par le logiciel ChemStation. L'injection a été réalisée avec un volume de 20 μL , et la détection s'effectue à une longueur d'onde de 254 nm. Les conditions opératoires sont les suivantes : une colonne de type C18 (marque KNAUER), de 250 mm de longueur, 4,6 mm de diamètre interne, et contenant des particules de 5 μm . Le débit de la phase mobile est maintenu à 1 mL/min. Le système utilise une phase mobile binaire composée de Phase A (PA): eau contenant 1 % d'acide acétique, et Phase B (PB): méthanol de qualité HPLC (Tableau 2).

Tableau 1 : Profil du gradient d'élution utilisé pour l'analyse HPLC

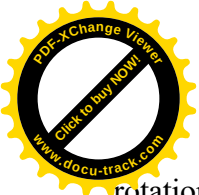
Temps (min)	P.A	P.B
0	95%	5%
55	5%	95%
57	95%	5%
59	95%	5%

➤ Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique analytique performante qui associe la séparation chromatographique des analytes à leur détection et identification précise par spectrométrie de masse. La séparation s'effectue sur une colonne adaptée (C18 pour les composés non polaires, HILIC pour les polaires), selon l'affinité des molécules pour la phase mobile et la phase stationnaire (Snyder et al., 2010). Après séparation, les analytes sont ionisés, principalement par électrospray (ESI) ou ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), afin de produire des ions en phase gazeuse (Kearle et al., 2009). Ces ions sont ensuite analysés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) à l'aide d'un analyseur de type quadripôle, temps de vol (TOF) ou Orbitrap, générant un spectre de masse caractéristique (Gross, 2017). L'identification des composés s'effectue par comparaison des temps de rétention et spectres avec des bases de données ou par quantification à l'aide d'une courbe d'étalonnage ou de la méthode du standard interne (McLafferty et al., 1993). La préparation des échantillons inclut généralement une extraction (SPE ou LLE) suivie d'une filtration (0,2 μ m), et éventuellement une dilution dans un solvant compatible. Le gradient de phase mobile (eau/méthanol ou acétonitrile, avec acide formique) est ajusté pour optimiser la séparation, avec un débit généralement compris entre 0,2 et 1 mL/min.

➤ Concentration des extraits par l'évaporateur rotatif

L'évaporateur rotatif (Rotavap) est un dispositif permettant l'évaporation contrôlée et douce de solvants sous pression réduite. Il est principalement utilisé pour concentrer des extraits végétaux ou récupérer des solvants après une extraction (Harwood & Moody, 1989). Son fonctionnement repose sur trois principes fondamentaux : la réduction de la pression pour abaisser le point d'ébullition, la

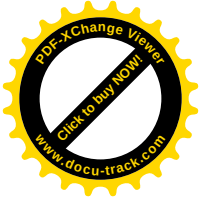


rotation du ballon pour accroître la surface d'évaporation, et le chauffage au bain-marie pour accélérer le processus tout en préservant les composés thermosensibles (Harris & Lucy, 2015). Le mode opératoire suit un protocole rigoureux. Il débute par le remplissage du ballon avec l'extrait à concentrer, suivi de l'ajustement précis de la température du bain-marie, généralement fixée à 42 °C. Ensuite, l'appareil est assemblé de manière sécurisée, notamment en connectant le condenseur à un système de refroidissement efficace. La pompe à vide et le système de rotation sont ensuite activés pour initier l'évaporation du solvant. Une fois l'évaporation achevée, le solvant condensé est récupéré dans un ballon de collecte. Enfin, un nettoyage minutieux de tous les composants est effectué après chaque utilisation afin d'éviter toute contamination croisée.

➤ **Lyophilisation**

La lyophilisation, également appelée cryodessiccation, est une méthode de conservation par déshydratation qui repose sur la congélation préalable d'un produit, suivie de l'élimination de l'eau par sublimation sous vide. Ce procédé est particulièrement adapté aux substances sensibles telles que les médicaments, les denrées alimentaires ou les extraits végétaux, car il permet de préserver leur stabilité et de prolonger leur durée de conservation (Franks, 1998).

L'utilisation d'un lyophilisateur suit un protocole bien défini. Le processus débute par la préparation du produit à lyophiliser, qui peut inclure des étapes telles que la filtration ou la concentration, puis son transfert dans des contenants adaptés (flacons ou plateaux). Le produit est ensuite congelé à des températures très basses, pouvant atteindre -80 °C, afin de solidifier complètement l'eau. Une fois la congélation achevée, la chambre du lyophilisateur est mise sous vide pour initier la sublimation. Durant la phase de séchage primaire, une source de chaleur contrôlée est appliquée pour permettre à l'eau solide de passer directement à l'état gazeux sans passer par l'état liquide. Cette étape doit être réalisée progressivement pour éviter toute altération du produit. S'ensuit un séchage secondaire, dit de désorption, au cours duquel un réchauffement léger permet d'éliminer l'eau résiduelle restante, assurant ainsi une stabilité optimale. Enfin, le produit lyophilisé est conditionné de manière hermétique pour le protéger de l'humidité ambiante, puis stocké dans un environnement contrôlé en attendant son utilisation.



Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Plusieurs méthodes *in vitro* sont couramment utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des composés bioactifs. Ces méthodes reposent principalement sur deux mécanismes : la capacité des molécules à agir comme agents réducteurs, ce qui reflète leur potentiel antioxydant, ou leur aptitude à neutraliser les radicaux libres (Javanmardi, 2003). Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour la méthode de piégeage du radical libre DPPH afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de brocoli (*Brassica oleracea*) et de chardon-Marie (*Silybum marianum*). La méthode DPPH, telle que décrite par Dorman et al. (2004), permet d'évaluer l'activité antioxydante en se fondant sur la capacité des composés à réduire le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•). Lorsqu'un antioxydant donneur d'hydrogène (RH) est présent, il réagit avec le DPPH•, entraînant sa transformation en une forme non radicalaire, le DPPH-H (Figure 3). Cette réaction se manifeste visuellement par une décoloration progressive de la solution, qui passe du violet intense à un jaune pâle. Le degré de décoloration, proportionnel à l'activité antioxydante, est quantifié par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 515 nm. Dans cette analyse, l'acide ascorbique a été utilisé comme composé de référence standard.

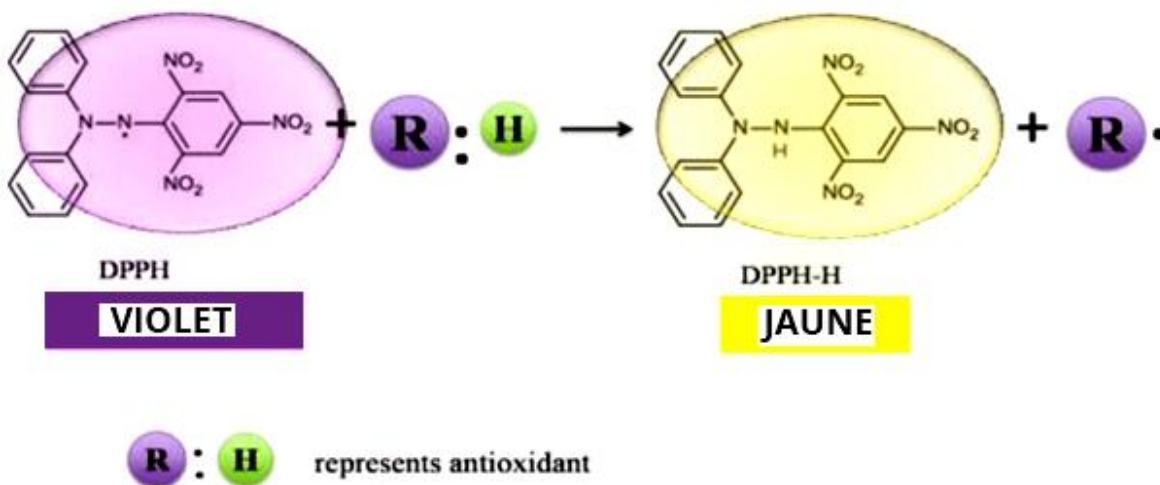
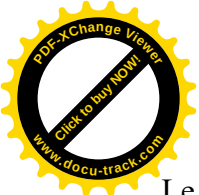


Figure 3: Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH° et un antioxydant (RH) (Goudjil, 2016).



Le protocole expérimental s'est déroulé en plusieurs étapes. Une solution mère de l'extrait végétal a d'abord été préparée. Parallèlement, une solution de DPPH à 0,04 g/L dans le méthanol a été élaborée, avec une densité optique initiale (DO) ajustée à 1,2. Une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique a été construite en tant que référence. Le témoin a été préparé en mélangeant 1900 µL de DPPH avec 100 µL de méthanol. Pour les échantillons tests, 1900 µL de la solution de DPPH ont été ajoutés à 100 µL de solutions diluées d'extrait végétal à différentes concentrations. Les mélanges ont été incubés à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant une durée de 60 à 120 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats ont permis de tracer les courbes représentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations (mg/mL) des extraits testés, ainsi que de l'acide ascorbique, afin d'estimer leur pouvoir antioxydant.

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en pourcentage (%) et en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = I\% = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Où :

I % : Pourcentage d'inhibition,

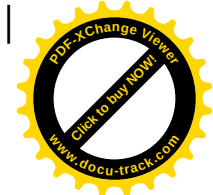
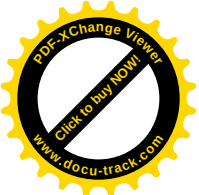
Abs Contrôle négatif : Absorbance du DPPH (Solution de DPPH + Méthanol),

Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon ou Standard (Contrôle positif).

IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

➤ **Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro***

L'inflammation est un processus caractérisé par la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines et les cytokines, synthétisés notamment sous l'action des enzymes cyclooxygénases (COX). Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique, nous avons appliqué la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines, selon le protocole décrit par Chandra et al. (2012). Ce test repose sur la capacité d'un composé à prévenir la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine, reflétant ainsi un effet stabilisateur potentiel sur les structures protéiques.



L'extrait a été préparé par macération méthanolique, puis re-solubilisé dans de l'eau distillée à une concentration finale de 10 mg/mL. Une solution de diclofénac sodique, utilisée comme standard de référence, a été préparée à la même concentration. Des dilutions appropriées ont ensuite été réalisées dans de l'eau purifiée. Pour chaque essai, 2 mL d'extrait ou de solution standard ont été mélangés à 2,8 mL de tampon phosphate (pH 6,4) et 200 µL d'albumine bovine. Les témoins négatifs ont été préparés en remplaçant l'extrait ou le standard par 2 mL d'eau distillée. Les mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes, suivis d'un chauffage à 72 °C pendant 10 minutes pour induire la dénaturation des protéines. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité anti - inflammatoire} = I\% = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Où :

I % : Pourcentage d'inhibition,

Abs Contrôle négatif : Absorbance du d'albumine d'œuf +solution saline tamponnée au phosphate

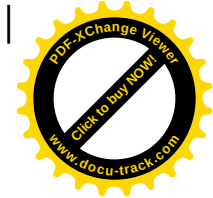
Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon ou Standard (Contrôle positif).

II.2.2. Etude *in vivo*

Cette étude *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles de souche Wistar, en suivant des protocoles standards d'élevage et de sacrifice conformément aux recommandations éthiques en vigueur.

➤ Protocole expérimental

Le paracétamol a été administré pendant une période de 10 jours consécutifs afin d'induire une toxicité hépatique, suivie d'un traitement de 21 jours aux extraits de plantes, à savoir le brocoli (*Brassica oleracea*), le chardon-Marie (*Silybum marianum*) ou un mélange des deux extraits. Les animaux ont été répartis en groupes selon le type de traitement reçu (Tableau 2). Dans le cadre de cette étude, un gavage oral quotidien de 1 mL



a été administré à des rats mâles Wistar à heure fixe chaque jour, dans le but d'évaluer l'effet hépatotoxique d'une administration répétée de paracétamol. Chaque rat, pesant environ 200 g, a reçu une dose de 0,02 mg par jour, une quantité démontrée comme suffisante pour induire une atteinte hépatique significative. Une fois la toxicité hépatique confirmée, notamment par l'observation de signes cliniques tels que l'hypoactivité, le pelage terne, la diminution de l'appétit et un affaiblissement général de l'état de santé, un traitement curatif a été entrepris à l'aide des extraits végétaux susmentionnés.

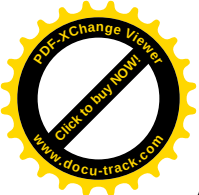
L'expérimentation a été conduite conformément aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), en particulier la ligne directrice n° 425 (2008) relative aux essais de toxicité aiguë. Les extraits végétaux ont été administrés par gavage à

une dose de 1 g/kg/jour pendant 21 jours. Cette dose a été appliquée pour chaque extrait (brocoli et chardon-Marie) sur des lots de rats mâles Wistar homogènes en poids, chaque lot étant composé de 7 individus (traités respectivement avec l'un des extraits ou leur combinaison). Les animaux ont été répartis en cinq groupes expérimentaux selon le schéma suivant :

Tableau 2: Répartition du régime standard supplémenté de traitement

Lots	Effectif	Traitement reçu
Lot 1 (Témoin -)	5	Régime standard uniquement (aucun traitement)
Lot 2 (Témoin +)	4	Paracétamol 00,2 mg/rat/jour (10 jours)
Lot 3	7	Paracétamol 0,02 mg/rat/jour (10 jours) → Extrait de brocoli 20 mg/rat/jour (21 jours)
Lot 4	7	Paracétamol 0,02 mg/rat/jour (10 jours) → Extrait de chardon-Marie 20 mg/rat/jour (21 jours)
Lot 5	7	Paracétamol 0,02 mg/rat/jour (10 jours) → Mélange 10 mg de brocoli et 10 mg chardon-Marie (21 jours)

➤ Sacrifice et prélèvement du foie



Après les huit semaines de l'élevage, le sacrifice des rats a été effectué selon une méthode uniforme pour tous les sujets, en respectant les normes éthiques établies par le comité d'éthique de l'institution. Chaque rat a été manipulé avec douceur, puis placé sous une cloche contenant un coton imbibé de chloroforme afin d'induire une anesthésie profonde. Une fois l'animal anesthésié, il a été positionné sur le dos et fixé à une planche de dissection à l'aide d'aiguilles insérées au niveau des pattes. À l'aide d'une pince, la peau a été soulevée au niveau de l'orifice prépuce, puis une incision a été réalisée à cet endroit avec des ciseaux fins, suivant l'axe médian jusqu'à la base de la cage thoracique. La cavité abdominale a été ouverte, puis la cage thoracique découpée afin d'accéder au foie.

Le foie a ensuite été prélevé rapidement, manipulé avec soin pour préserver l'intégrité tissulaire. Il a été immédiatement lavé avec une solution physiologique stérile (NaCl à 0,9 %) afin d'éliminer l'excès de sang, le tissu hépatique étant particulièrement vascularisé. Cette étape est essentielle pour éviter que la fixation au formol ne prenne une teinte rougeâtre, ce qui pourrait compromettre les observations histologiques. Les foies prélevés, destinés à l'étude histologique, ont été fixés dans une solution de formol dilué à 10 % afin d'assurer une préservation optimale des structures cellulaires et tissulaires.

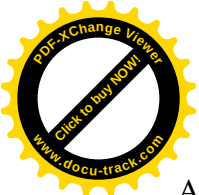
➤ Étude histologique

Les coupes histologiques des différents 5 lots ont été réalisées au laboratoire des sciences biologiques de l'Université de Médéa, selon une technique standardisée décrite par (Suvana et al., 2018) Cette méthode repose sur un enchaînement rigoureux d'étapes allant de la fixation des tissus à l'observation microscopique.

✓ Fixation

La fixation a pour objectif de préserver les tissus dans un état morphologique aussi proche que possible de leur état physiologique et de les durcir pour permettre leur manipulation ultérieure. Elle a été effectuée immédiatement après le prélèvement des foies, par immersion dans une solution tamponnée de formol dilué à 10 % (préparée à partir de formaldéhyde officinal à 36 %) (**Annexe 3**). Le volume de fixateur utilisé représentait environ cinq fois le volume du tissu hépatique, garantissant ainsi une pénétration homogène.

✓ Lavage



Après fixation, les échantillons ont été rincés à l'eau courante à température ambiante pendant environ 2 heures. Cette étape permet d'éliminer les résidus de formol libre susceptibles d'interférer avec les étapes suivantes du protocole histologique.

✓ **Déshydratation et clarification**

La déshydratation vise à éliminer l'eau contenue dans les tissus en la remplaçant progressivement par de l'éthanol. Les échantillons ont été successivement plongés dans des bains d'alcool éthylique à concentrations croissantes : 70° (1 bain), 90° (1 bain), 95° (1 bain) (**annexe 4**) puis trois bains à 100°, assurant une déshydratation complète.

Les tissus déshydratés ont ensuite été clarifiés dans trois bains successifs de butanol pur (8 heures chacun). Le butanol, moins toxique que le xylène, a été utilisé ici comme agent intermédiaire, car il est miscible à la fois avec l'alcool et la paraffine.

✓ **Infiltration en paraffine**

L'infiltration consiste à imprégner les tissus de paraffine fondue. Elle s'est déroulée en deux étapes :

- D'abord, immersion des échantillons dans un mélange 1:1 de butanol et de paraffine à 65 °C pendant 2 heures.
- Ensuite, transfert dans deux bains successifs de paraffine pure fondue à la même température (1 heure par bain).

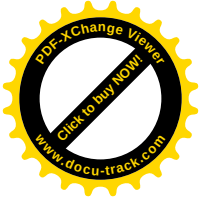
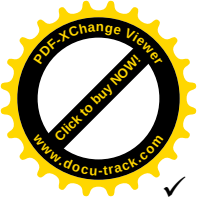
✓ **Inclusion et mise en bloc**

Les tissus infiltrés ont été inclus dans de la paraffine liquide, coulée dans des moules métalliques (barres de Leuckart). Après solidification au congélateur, des blocs de paraffine rigides ont été obtenus, renfermant les échantillons fixés, prêts à être sectionnés.

✓ **Confection des coupes histologiques**

Les blocs de paraffine ont été sectionnés à l'aide d'un microtome rotatif, produisant des coupes de 7 µm d'épaisseur. Les rubans de coupes ont été délicatement étalés dans un bain-marie à 45 °C contenant de l'eau distillée tiède, permettant l'étalement des sections. Les coupes ainsi

redressées ont été récupérées à l'aide de lames de verre propres, puis séchées sur une plaque chauffante à 40 °C pendant 15 minutes.



✓ Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage a été effectué en immergeant les lames dans deux bains successifs de xylène (15 minutes chacun), afin de dissoudre complètement la paraffine. Les coupes ont ensuite été réhydratées progressivement à travers une série de bains d'alcool éthylique à concentrations décroissantes (100°, 90°, 70° ; 2 minutes par bain), suivis d'un rinçage à l'eau distillée.

✓ Coloration à l'hématoxyline-éosine (HE)

La coloration HE est une méthode classique permettant de distinguer les structures cellulaires en fonction de leur affinité pour les colorants acides ou basiques. Les structures acides, comme les noyaux cellulaires riches en ADN, sont colorées en bleu-violet par l'hématoxyline (colorant basique). Les structures basiques, telles que le cytoplasme et les composants extracellulaires, sont colorées en rose par l'éosine (colorant acide).

Étapes de la coloration

- Les lames ont été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 3 minutes, permettant de colorer les noyaux en bleu-violet.
- Un rinçage à l'eau courante pendant 2 minutes a été réalisé afin d'éliminer l'excès de colorant.
- Les lames ont ensuite été immergées dans un bain d'éosine pendant 15 secondes, ce qui a permis de colorer le cytoplasme en rose.
- Un rinçage final a été effectué : d'abord dans l'eau du robinet, puis dans deux bains d'eau distillée, afin de retirer le surplus d'éosine et de préparer les coupes aux étapes suivantes.

✓ Déshydratation finale et clarification

Les lames colorées ont été de nouveau déshydratées à travers des bains d'alcool éthylique (70°, 90°, 100°), puis clarifiées dans un bain de xylène (3 minutes), afin de préparer les coupes pour le montage.

✓ Montage et observation microscopique

Les coupes ont été montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage permanent (Baume du Canada), assurant leur conservation à long terme. L'observation a été effectuée au



microscope optique à différents grossissements ($\times 4$, $\times 10$, $\times 40$) pour l'analyse morphologique du tissu hépatique.

II.2.3. Etude *in silico*

L'analyse prédictive des propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des composés étudiés a été réalisée à l'aide de la plateforme en ligne ADMETlab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com>), développée par le Shanghai Institute of Materia Medica. Cet outil repose sur des algorithmes d'apprentissage automatique exploitant de vastes bases de données expérimentales pour prédire, à partir de la structure moléculaire, un ensemble étendu de paramètres ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité). Dans cette étude *in silico*, les structures moléculaires des trois composés sélectionnés, sulforaphane, acide α -lipoïque et silymarine (silibinine), ont été introduites sous forme de SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System), puis soumises au serveur. Les paramètres pharmacocinétiques suivants ont été évalués :

Absorption : perméabilité intestinale (modèle Caco-2, HIA), biodisponibilité orale (F20, F30, F50), test PAMPA, interaction avec la P-glycoprotéine (substrat ou inhibiteur).

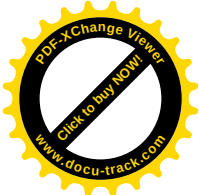
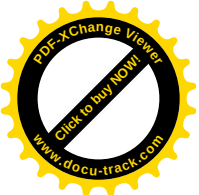
Distribution : volume de distribution à l'état d'équilibre (VD_{ss}), liaison aux protéines plasmatiques (PPB), capacité de passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB).

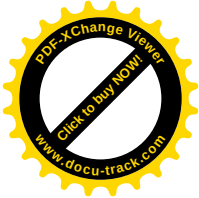
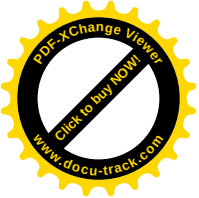
Métabolisme : interactions avec les principales isoformes du cytochrome P450 (CYP1A2, 2C9, 2D6, 3A4, etc.).

Excrétion : clairance plasmatique prédite (CL_{plasma}), demi-vie d'élimination (T_{1/2}).

Toxicité : mutagénicité (test d'Ames), hépatotoxicité, cytotoxicité, génotoxicité, sensibilisation cutanée, entre autres.

Les résultats obtenus ont été interprétés selon les seuils standards proposés par le logiciel, puis confrontés aux données expérimentales disponibles dans la littérature scientifique. Cette approche permet une première évaluation du profil pharmacologique et de sécurité des molécules sélectionnées, en vue de leur inclusion dans la formulation finale du produit.

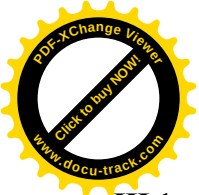




CHAPITRE III :

RESULTATS ET

DISCUSSION



III.1. résultats et discussion de l'étude *in vitro*

III.1.1. Résultats de l'extraction et de la concentration des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie

L'extraction méthanolique des poudres de brocoli « *Brassica oleracea* » et de chardon-Marie « *Silybum marianum* » a été réalisée à l'aide d'un appareil Soxhlet. Les extraits obtenus, de couleur brunâtre et d'aspect visqueux, suggèrent une richesse en composés phytochimiques. Après concentration par évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor, les extraits se sont présentés sous forme de résidus huileux, révélant la présence de constituants peu volatils. Afin d'optimiser leur conservation et d'en faciliter la manipulation pour les analyses biologiques, ces extraits ont été lyophilisés, donnant des formes pâteuses stables. Le Tableau 3 présente les caractéristiques physiques des extraits et leurs rendements.

Tableau 3 : Caractéristiques et rendements des extraits méthanolique de brocoli et chardon-Marie

Extrait méthanolique	Couleur	Aspect	Forme	Masse de l'extrait (g)	Rendement (%)
Brocoli	Brunâtre	Visqueux	Pâte compacte	0,999	5,00
Chardon-Marie	Brunâtre	Visqueux	Pâte compacte	2,54	12,70

Nos résultats du **Tableau 3** montrent une différence notable entre les deux extraits végétaux. Bien que les extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie présentent des caractéristiques physiques similaires (couleur brunâtre, aspect visqueux et forme pâteuse compacte), l'extraction méthanolique effectuée sur le brocoli et le chardon-Marie a donné des rendements respectifs de 5 % et 12,7 %. Cette différence s'explique par la nature chimique des composés présents dans chaque plante et leur affinité pour le méthanol, un solvant polaire couramment utilisé pour extraire les polyphénols, flavonoïdes et autres métabolites secondaires hydrosolubles (Azwanida, 2015). Le chardon-Marie semble ainsi contenir une concentration plus élevée ou une meilleure disponibilité de ces composés dans les conditions d'extraction utilisées.

III.1.2. Criblage phytochimique

Une analyse de criblage phytochimique a été effectuée sur les deux espèces végétales afin d'identifier qualitativement les principaux métabolites secondaires présents dans la matière végétale brute. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résultats du criblage phytochimique des poudres de brocoli et de chardon-Marie

Composé	Brocoli	Chardon-Marie
Composés phénoliques	(+)	(+)
Flavonoïdes	(+)	(+)
Tanins condensés	(-)	(-)
Tanins hydrolysables	(+)	(+)

+ : Positif (présence du composé chimique dans l'extrait)

- : Négatif (absence du composé chimique dans l'extrait)

Les résultats de notre étude révèlent que le brocoli « *Brassica oleracea* » et le chardon-Marie « *Silybum marianum* » contiennent des composés phénoliques, des flavonoïdes ainsi que des tanins hydrolysables, ce qui corrobore leur potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Gülçin et al. (2010) pour le chardon-Marie et Podsędek (2007) pour le brocoli, qui ont montré que ces deux plantes sont riches en composés phénoliques. En revanche, les tanins condensés n'ont pas été détectés dans nos extraits, suggérant que ce type de métabolite n'est pas prédominant dans leur composition phytochimique. Cette absence apparente peut être attribuée à la faible sensibilité des tests qualitatifs classiques, qui ne permettent pas toujours de détecter les composés présents en faibles concentrations (Tiwari et al., 2011). Par ailleurs, les tanins condensés peuvent être liés à d'autres constituants végétaux sous forme de complexes, rendant leur détection plus difficile lors des criblages classiques (Makkar & Becker, 1993). En revanche, les dosages quantitatifs, plus sensibles et réalisés dans des conditions analytiques contrôlées, permettent leur libération et leur détection, confirmant ainsi leur présence effective dans les extraits.

Nos observations rejoignent celles de Al-Farsi et al. (2005) et de Sultana et al. (2009), qui ont également constaté une faible détection qualitative des tanins condensés malgré leur présence mesurable dans certains extraits végétaux riches en polyphénols.

➤ Teneur en composés phénoliques totaux des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie

La quantification des composés phénoliques totaux dans les extraits méthanoliques de brocoli « *Brassica oleracea* » et de chardon-Marie « *Silybum marianum* » a été réalisée par spectrophotométrie, en se basant sur la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (AG) comme standard. L'absorbance a été mesurée à 765 nm, et les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (Tableau 5). La Figure 5 illustre la courbe d'étalonnage correspondant à différentes concentrations d'acide gallique (mg/ml). Celle-ci montre une corrélation linéaire positive entre la concentration en AG et l'absorbance mesurée, traduisant une bonne sensibilité du test. L'équation de régression obtenue est :

$Y = 0,0098x - 0,0108$ avec un coefficient de détermination $r^2 = 0,9986$, indiquant une excellente linéarité. Cette équation a été utilisée pour calculer les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits végétaux analysés.

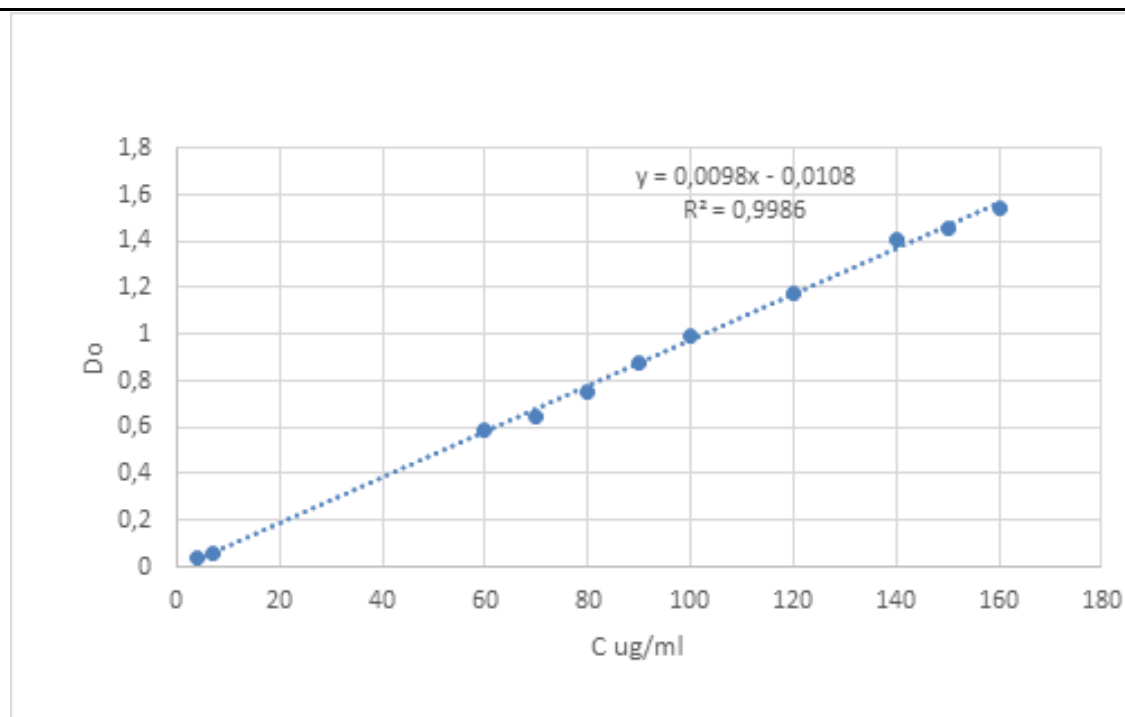
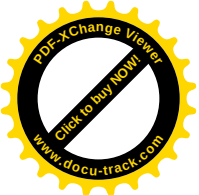


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux (originale)



L'analyse quantitative des composés phénoliques, exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS), a révélé une teneur significativement plus élevée en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique de brocoli « *Brassica oleracea* » (1647,41 mg EAG/g) comparée à celle du chardon-Marie « *Silybum marianum* » (534,88 mg EAG/g), comme indiqué dans le Tableau 5. Cette richesse en composés phénoliques chez le brocoli suggère un potentiel antioxydant intrinsèque élevé, soutenant son intérêt en tant que candidat prometteur dans le cadre de stratégies phytothérapeutiques à visée hépatoprotectrice. Nos résultats sont en accord avec ceux de Podsedek (2007), qui a rapporté une forte teneur en composés phénoliques dans le brocoli, contribuant à son activité antioxydante élevée. De même, Zhou et al. (2016) ont montré que les extraits méthanoliques de *Brassica oleracea* contiennent des quantités importantes de flavonoïdes et de phénols totaux, justifiant leur effet protecteur contre le stress oxydatif. Concernant le chardon-Marie, nos données rejoignent les observations de Karkanis et al. (2011), qui ont identifié une concentration modérée en polyphénols, notamment la silymarine, bien que moins élevée que celle retrouvée dans le brocoli.

Tableau 5 : Teneur des extraits de la matière première en Composées phénoliques

Paramètre	Brocoli	Chardon-Marie
Composées phénoliques (mg EAG/g MS)	1769,41	572,08

EAG : Equivalent acide gallique; MS : matière sèche

➤ **Teneur en flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques de brocoli (*Brassica oleracea*) et de chardon-Marie (*Silybum marianum*) a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine comme standard. Cette courbe, dont l'équation de régression est $Y = 0,0681x + 0,1467$ avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,9995$, a permis d'exprimer les résultats en mg équivalent quercétine (mg EQ/g de matière sèche) (Tableau 6). La Figure 6 illustre la relation linéaire entre la concentration de quercétine (mg/mL) et l'absorbance mesurée, démontrant une corrélation directe entre ces deux paramètres. Ce résultat confirme la présence de flavonoïdes dans les deux extraits végétaux analysés, avec des teneurs variables selon l'espèce.

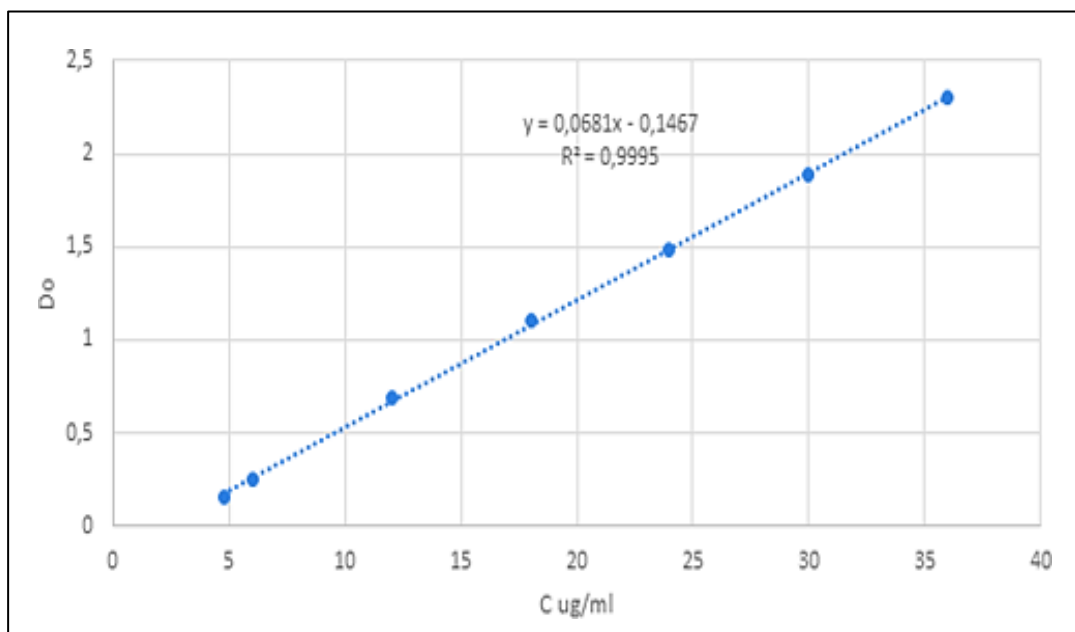


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée pour le dosage des flavonoïdes

(Originale)

L'analyse quantitative des flavonoïdes, exprimée en milligrammes équivalents quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) (Tableau 6), révèle une teneur nettement plus élevée dans l'extrait méthanolique de chardon-Marie (133,78 mg EQ/g) comparée à celle du brocoli (14,69 mg EQ/g). Cette richesse en flavonoïdes confère au chardon-Marie un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire important, susceptible de jouer un rôle clé dans ses effets biologiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Siddiqui et al. (2018) et de Karkanis et al. (2020), qui ont également rapporté une concentration notable en flavonoïdes dans les extraits de *Silybum marianum*, confirmant ainsi la prédominance de ces composés dans cette espèce et justifiant son usage traditionnel comme agent hépatoprotecteur.

Tableau 6 : Teneur des extraits de la matière première en flavonoïdes

Paramètre	Brocoli	Chardon-Marie
Flavonoïdes (mg EQ/g MS)	14,69	133,78

EQ : Equivalent quercétine ; MS : matière sèche

➤ **Teneur en tanins hydrolysables des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie**

La teneur en tanins hydrolysables des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique comme standard. Cette courbe a été obtenue en traçant la relation entre la concentration en acide tannique (mg/ml) et l'absorbance mesurée (nm), aboutissant à une équation de régression linéaire de la forme : $Y = 0,0016x + 0,001$, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9936$, indiquant une excellente linéarité. Cette équation a permis d'estimer les teneurs en tanins hydrolysables dans les échantillons, exprimées en mg équivalents d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS) (Tableau 7). La Figure 7 illustre cette courbe d'étalonnage, démontrant que l'absorbance est proportionnelle à la concentration en acide tannique, ce qui confirme la présence significative de tanins hydrolysables dans les deux extraits.

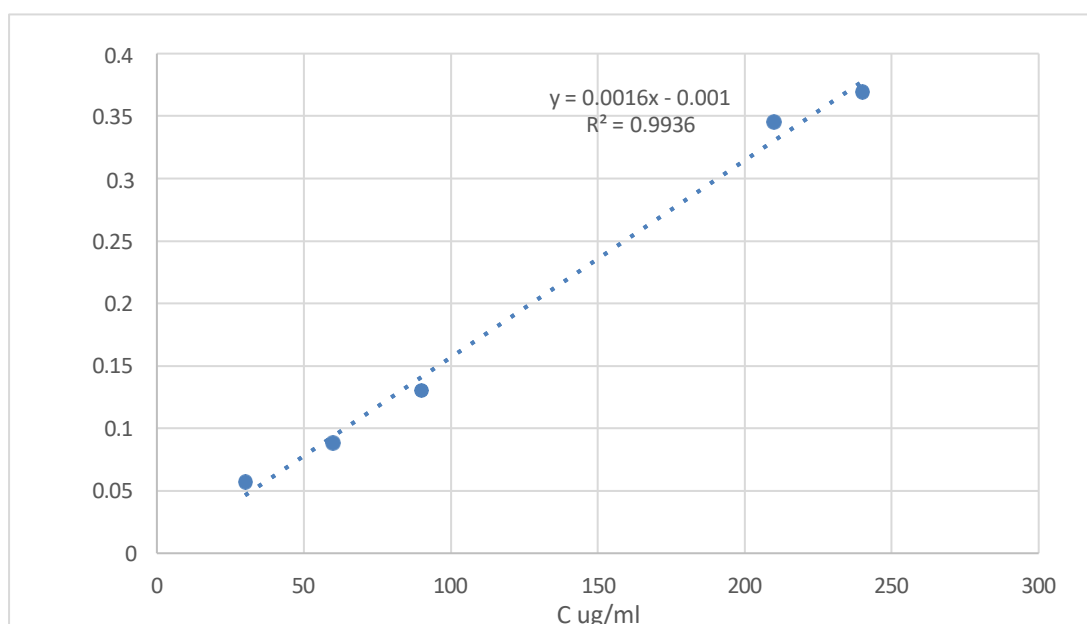
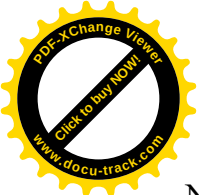


Figure 7: Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysable.



Nos résultats analytiques indiquent une teneur plus élevée en tanins hydrolysables dans l'extrait de chardon-Marie par rapport à celui du brocoli, traduisant une richesse plus marquée en composés phénoliques hydrolysables chez le chardon-Marie (Figure 7). La quantification a révélé une teneur significativement plus élevée en tanins hydrolysables dans l'extrait méthanolique de chardon-Marie (293,86 mg EAT/g de matière sèche) par rapport à celui de brocoli (155,41 mg EAT/g MS), renforçant ainsi le profil bioactif plus marqué du chardon-Marie (Tableau 7).

Tableau 7 : Teneur des extraits de la matière première en tanins hydrolysables

Paramètre	Brocoli	Chardon-Marie
Tanins hydrolysables (mg EAT/g MS)	155,41	293,86

EAG : Equivalent acide tannique ; MS : matière sèche

III.1.3. Identification des principes actifs par chromatographique en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse chromatographique des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), avec détection à une longueur d'onde de 254 nm (Figures 8 et 9). Cette méthode a permis l'identification et la caractérisation des principaux composés phénoliques présents dans les extraits, en se référant aux temps de rétention (RT) des standards (les détails sont présentés en Annexe 04).

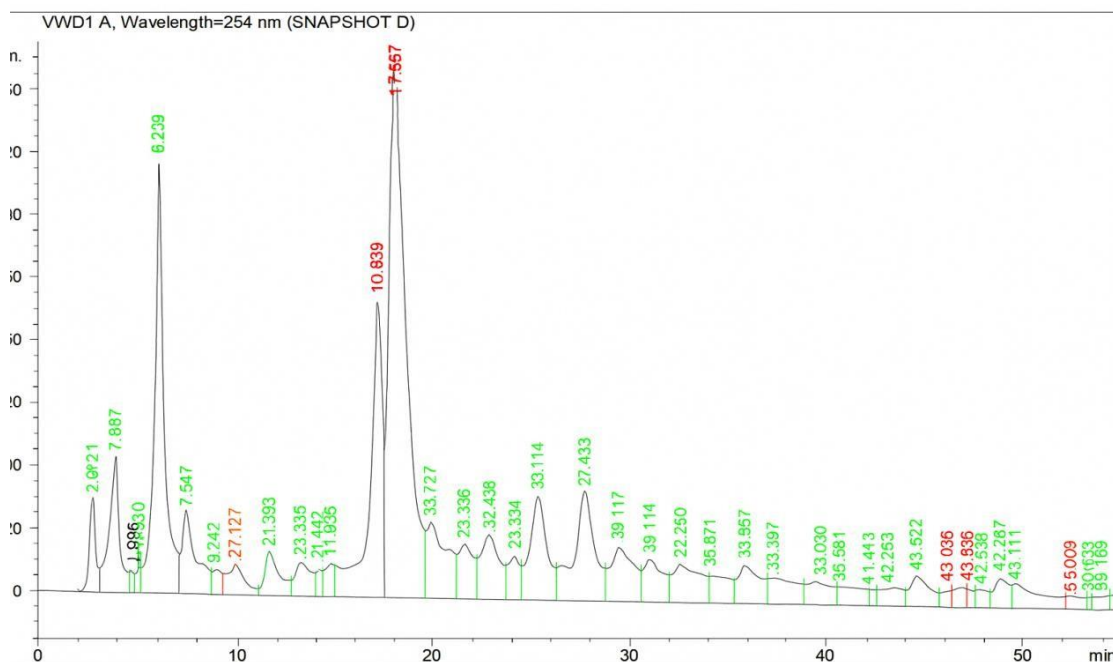


Figure 8 : Profil chromatographique de l'extract éthanologique de brocoli obtenu par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Original)

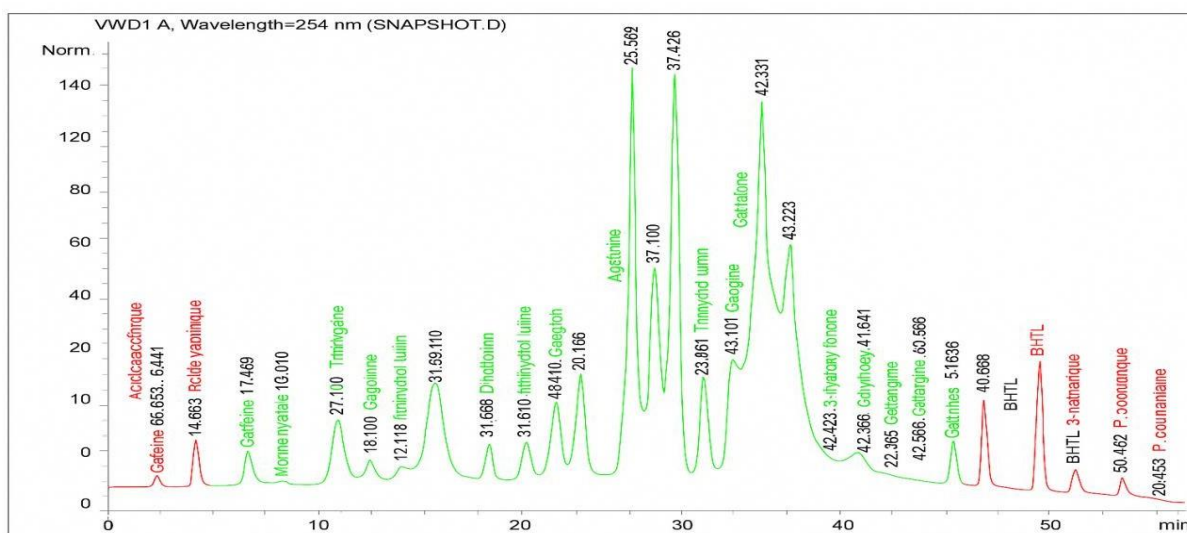
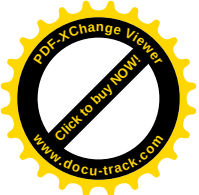


Figure 9 : Profil chromatographique de l'extract éthanologique de chardon-Marie obtenu par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Original)



Le Tableau 8 illustre et compare le profil chromatographique des composés phénoliques bioactifs détectés dans les extraits éthanoliques de brocoli « *Brassica oleracea* » et de chardon-Marie « *Silybum marianum* », obtenus par HPLC. L'identification des composés repose sur la comparaison des temps de rétention (RT) observés avec ceux des standards de référence.

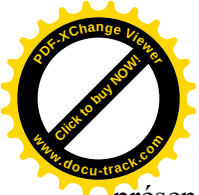
Les extraits analysés présentent un profil polyphénolique à la fois riche et comparable, caractérisé par la détection de flavonoïdes majeurs tels que l'apigénine, l'acacétine, le 7-hydroxyflavone, le 5-hydroxyflavone, la quercétine et le kaempférol.

D'autres composés standards, tels que l'acide vanillique, l'acide gallique ou certains flavonoïdes acétoniques, ont également été inclus dans l'analyse. Cependant, leur présence n'a pas été systématiquement confirmée dans les extraits, ce qui pourrait s'expliquer soit par une absence réelle de ces molécules dans la matrice végétale, soit par des concentrations inférieures au seuil de détection de la méthode utilisée. Le Tableau 9 présente les composés supplémentaires détectés, les plages de rétention associées, ainsi que les classes moléculaires supposées sur la base des données de la littérature.

Le Tableau 9 propose des affectations hypothétiques pour certains pics chromatographiques n'ayant pas pu être corrélés aux standards utilisés, en se basant sur les temps de rétention et des données bibliographiques. Les analyses chromatographiques HPLC réalisées sur les extraits de brocoli et de chardon-Marie révèlent une richesse notable en flavonoïdes et polyphénols, deux familles moléculaires bien connues pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices et anticancéreuses (Manach et al., 2004). Parmi les composés identifiés, la quercétine se distingue par sa capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à inhiber les voies de signalisation pro-inflammatoires comme NF- κ B, contribuant ainsi à la protection cellulaire (Boots et al., 2008).

L'apigénine, également présente dans les deux extraits, présente des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques via l'inhibition de la voie PI3K/AKT, soulignant son intérêt en prévention de la tumorigenèse (Shukla & Gupta, 2010). Quant au kaempférol et à la myricétine, ils sont impliqués dans la modulation des enzymes de détoxification hépatique, renforçant l'activité protectrice globale de ces extraits (Calderón-Montaña et al., 2011).

L'extrait de brocoli se distingue par la présence d'un pic chromatographique spécifique à 6,25 minutes, attribué à l'acide alpha-lipoïque. Ce composé, reconnu comme un antioxydant universel, joue un rôle clé dans la régénération des vitamines C et E, ainsi que dans l'activation de la voie Nrf2, essentielle à la réponse cellulaire contre le stress oxydatif (Shay et al., 2009). L'absence de ce composé dans l'extrait de chardon-Marie reflète une spécificité chimique propre au brocoli, soulignant sa singularité métabolique. À l'inverse, l'extrait de chardon-Marie est caractérisé par la



présence de flavonolignanes, notamment la diosmine et la galangine, deux molécules largement documentées pour leur potentiel hépatoprotecteur (Křen & Walterová, 2005). Cette spécificité chimique corrobore l'usage traditionnel du chardon-Marie dans la protection et la régénération du foie, via des mécanismes d'action moléculaires bien établis.

La diosmine, flavonoïde aux propriétés vasoprotectrices, intervient dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la stimulation des enzymes antioxydantes endogènes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), limitant ainsi les dommages oxydatifs au niveau des hépatocytes (Chatterjee et al., 2016). Elle exerce également une action anti-inflammatoire puissante, via l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, COX-2) et améliore la microcirculation hépatique par stabilisation de l'endothélium vasculaire, favorisant l'apport en nutriments et en oxygène. Par ailleurs, elle confère une protection contre les hépatotoxines, en préservant l'intégrité mitochondriale et en limitant l'apoptose cellulaire.

La galangine, pour sa part, renforce ces effets hépatoprotecteurs par une action antioxydante directe, notamment en inhibant la peroxydation lipidique, processus majeur dans la dégradation des membranes cellulaires. Elle stimule également les enzymes de détoxification de phase II (UGT, GST), contribuant à l'élimination des xénobiotiques et à l'amélioration des fonctions hépatiques. Sa capacité à stabiliser les membranes cellulaires réduit les fuites enzymatiques (ALT, AST) caractéristiques d'une atteinte hépatique. Enfin, elle exerce un effet cytoprotecteur via l'inhibition des voies pro-apoptotiques (Bax/Bcl-2), augmentant ainsi la résistance des cellules hépatiques face aux agressions chimiques (Křen & Walterová, 2005).

D'autres composés bioactifs ont été détectés dans les deux extraits, renforçant leur potentiel thérapeutique. Parmi eux, la trihydrol lutine intervient dans la régulation de la signalisation oxydative et la protection contre les dommages lipidiques (Vale et al., 2015). La curcumine, bien connue pour son effet anti-inflammatoire puissant, agit en modulant la production de cytokines et en inhibant la voie de signalisation NF- κ B (Aggarwal & Harikumar, 2009). La robinine, un glycoside de flavonol, contribue à la stabilisation des membranes cellulaires et à la réduction de l'inflammation. La acacétine, détectée dans les deux extraits mais avec une intensité légèrement plus élevée dans celui de chardon-Marie, inhibe l'activité des enzymes pro-inflammatoires telles que COX-2, bloque la génération des ROS, et protège les mitochondries, lui conférant une activité à la fois antioxydante et neuroprotectrice (Mao et al., 2015). L'acide férulique, détecté à des concentrations modérées, participe à la défense antioxydante globale et favorise la régénération cellulaire (Srinivasan et al., 2007). Enfin, la présence de 7-hydroxyflavone et 5-hydroxyflavone, deux composés connus pour leurs propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires au niveau cérébral, suggère un potentiel intéressant contre le stress oxydatif neuronal (Maher, 2009).

Bien que certains composés bioactifs soient communs aux deux extraits, le brocoli et le chardon-

Marie présentent chacun un profil chimique distinct. Cette complémentarité suggère des applications nutraceutiques intégrées, visant à renforcer leurs effets protecteurs et thérapeutiques sur la santé.

III.1.4. Identification et quantification de composés alcaloïdiques dans les extraits éthanoliques de brocoli et chardon-Marie par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse LC-MS des extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie a permis l'identification de quatre composés alcaloïdiques. Ces molécules ont été détectées avec des coefficients de linéarité élevés (r^2), garantissant la précision et la fiabilité des quantifications (Figures 10, 11, 12, et 13). Le tableau ci-dessous (Tableau 10) résume les temps de rétention (RT), les concentrations mesurées dans chaque extrait, ainsi que les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) associées à chaque analyte.

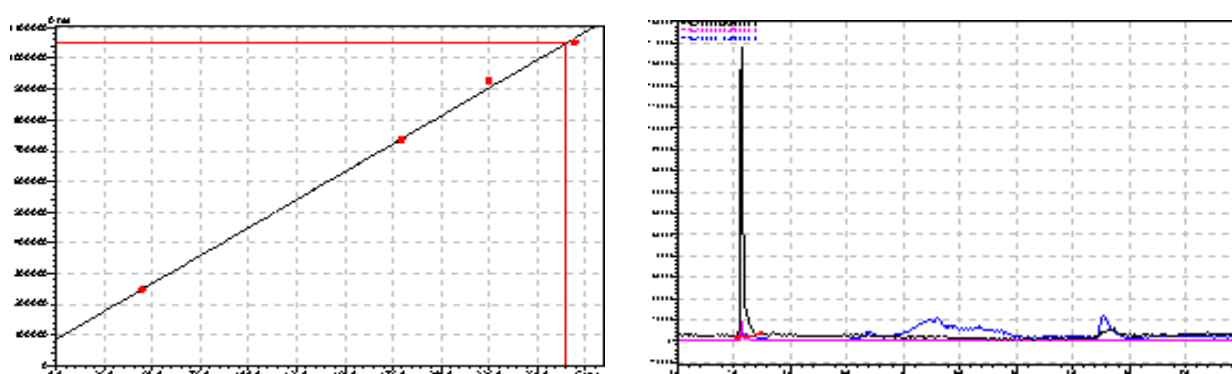


Figure 10 : Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la proline détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie (Originale)

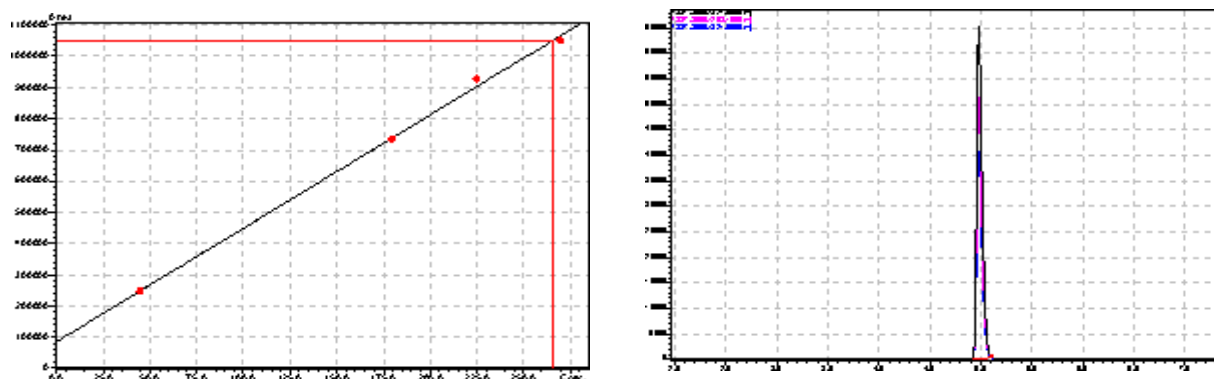


Figure 11 : Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la berbérine détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie (Originale)

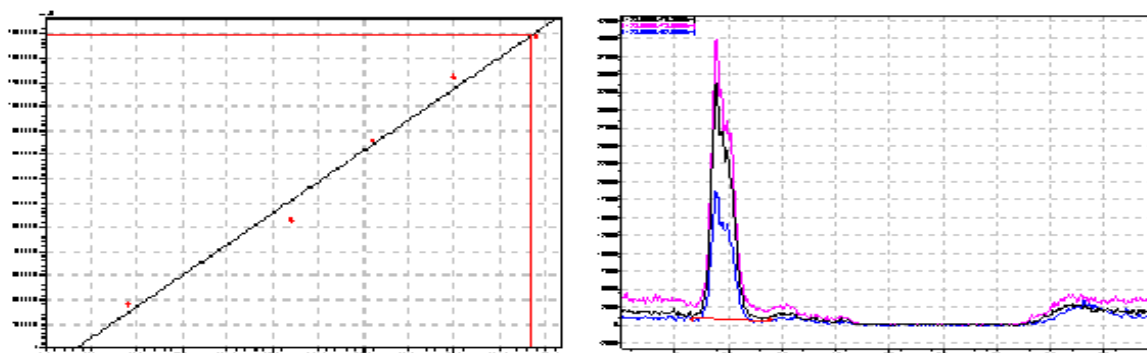


Figure 12 : Chromatogramme LC-MS représentant le pic de l'acide nicotinique détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie (Originale)

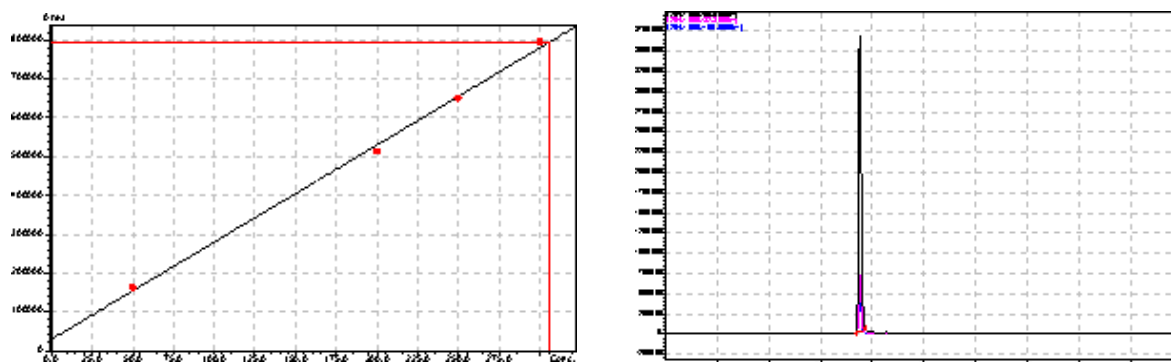


Figure 13 : Chromatogramme LC-MS illustrant le pic de la 4-aminoantipyrine détecté dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie (Originale)

Tableau 10 : Données chromatographiques LC-MS des principaux alcaloïdes présents dans les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie

Analyte	TR (min)	Linéarité (r^2)	Conc. (ppb) - Brocoli	Conc. (ppb) - Chardon-Mar ie	LOQ (ppb)	LOD (ppb)
4-Aminoantipyrine	3.75 – 4.003	0.987 – 0.997	133.55	184.84	0.47 – 1.40	0.16 – 0.46
Proline	1.135 – 1.154	~0.997	112.33	85.66	4.58 – 5.72	1.51 – 1.89
Berberine	4.597 – 4.978	~0.997	115.45	146.77	0.37 – 15.88	0.12 – 5.24
Nicotinic Acid	1.749 – 1.934	~0.997	215.33	166.40	41.98 – 51.76	10.4 – 17.08

TR : temps de rétention ; **r^2 :** coefficient de linéarité ; **LOQ :** limite de quantification ; **LOD :** limite de détection

Nos résultats indiquent que les extraits éthanoliques de brocoli et de chardon-Marie renferment plusieurs composés alcaloïdiques bioactifs, identifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Tableau 10). Parmi les alcaloïdes détectés figurent la proline, la berbérine, l'acide nicotinique et la 4-aminoantipyrine, chacun caractérisé par un temps de rétention spécifique et un coefficient de linéarité élevé ($r^2 > 0,98$), garantissant la fiabilité des mesures analytiques. Ces résultats témoignent de la diversité chimique et du potentiel pharmacologique de ces deux matrices végétales.

Les temps de rétention observés sont conformes aux données de la littérature et à ceux des étalons utilisés. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Shah et al. (2020) pour la berbérine et l'acide nicotinique, ainsi que par Vale et al. (2015) pour la proline et les composés azotés présents dans le brocoli. Ces alcaloïdes sont largement documentés pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, métaboliques et hépato-protectrices (Chatterjee et al., 2016 ; Křen & Walterová, 2005).

L'étude chromatographique menée sur les extraits de brocoli « *Brassica oleracea* » et de chardon marie « *Silybum marianum* » a permis d'identifier plusieurs métabolites bioactifs agissant en synergie pour renforcer la protection des cellules hépatiques. La berbérine, majoritairement détectée dans le chardon-Marie, active la voie transcriptionnelle Nrf2/ARE et inhibe NF- κ B, favorisant ainsi l'expression d'enzymes antioxydantes telles que HO-1, SOD et NQO1. Cette double action contribue à la régulation du stress oxydatif, de l'inflammation et de l'apoptose hépatocytaire (Zhou et al., 2016).

De plus, son noyau aromatique et ses groupes méthoxyles lui confèrent une activité chélatrice vis-à-vis des ions métalliques redox-actifs (Fe^{2+} , Cu^{2+}), limitant ainsi les réactions de type Fenton et préservant l'intégrité mitochondriale (Li et al., 2020). L'acide nicotinique, détecté en quantité notable dans le brocoli, joue un rôle central dans la biosynthèse du NAD^+ , cofacteur clé de la voie des sirtuines telles que SIRT1, impliquées dans la détoxification hépatique, la réparation de l'ADN et la modulation du métabolisme lipidique (Rajman et al., 2018). La proline contribue quant à elle à la stabilité redox via le cycle mitochondrial PRODH/P5C, qui génère du NADP^+ , tout en assurant l'équilibre osmotique et la protection structurale des hépatocytes soumis au stress oxydatif (Phang et al., 2015). Enfin, la 4-aminoantipyrine présente une activité piègeuse de radicaux libres, grâce à sa structure aromatique stabilisée, suggérant un potentiel antioxydant secondaire (Chakraborty et al., 2011).

Ces résultats révèlent une synergie d'effets antioxydants, anti-inflammatoires, positionnant les extraits de brocoli et de chardon-Marie comme des plantes prometteuses pour la prévention des altérations hépatiques provoquées par des composés réactifs ou des éléments trace toxiques. Dans ce contexte, l'ensemble de ces mécanismes peut être synthétisé dans la Figure 14, qui en illustre les interactions et effets biologiques principaux.

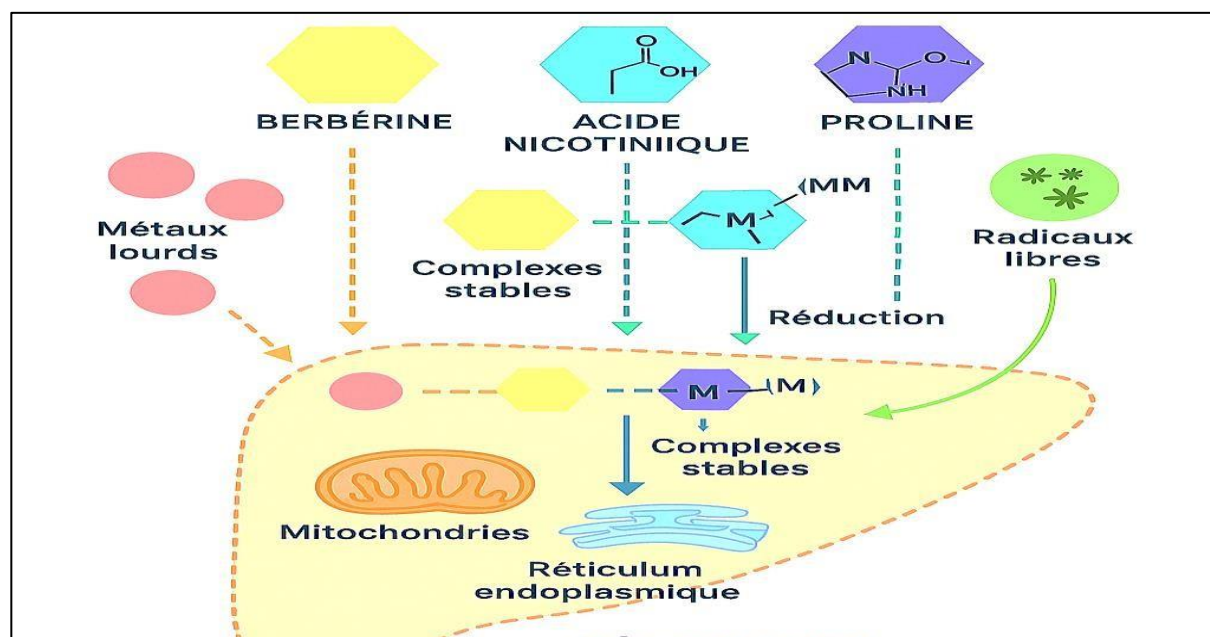
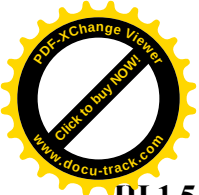


Figure 14 : Mécanismes de chélation des métaux lourds par les composés bioactifs et protection des organites hépatiques contre le stress oxydatif



III.1.5. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et l'activité anti-inflammatoire

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie a été évaluée à l'aide du test DPPH, en utilisant l'acide ascorbique comme standard de référence. Les courbes d'étalonnage (Figure 15) illustrent le pourcentage de piégeage du radical libre DPPH en fonction des concentrations croissantes des extraits testés. À partir de ces courbes, les concentrations efficaces à 50 % (CE_{50} ou IC_{50}) ont été déterminées. Les résultats (Tableau 10) révèlent que l'extrait de chardon-Marie présente une capacité antioxydante plus marquée ($CE_{50} = 0,125$ mg/mL) comparée à celle du brocoli ($CE_{50} = 0,212$ mg/mL), malgré une teneur polyphénolique globale inférieure.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire visait à vérifier *in vitro* l'effet inhibiteur des extraits méthanoliques sur la dénaturation de l'albumine d'œuf, un mécanisme couramment utilisé comme modèle de l'inflammation. Cette activité a été quantifiée à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le diclofénac sodique comme anti-inflammatoire de référence. L'équation de la

régression linéaire correspondant à cette courbe est la suivante : $Y = 0,1274x - 64,178$, avec un coefficient de corrélation élevé ($r^2 = 0,9984$), témoignant de la fiabilité du modèle.

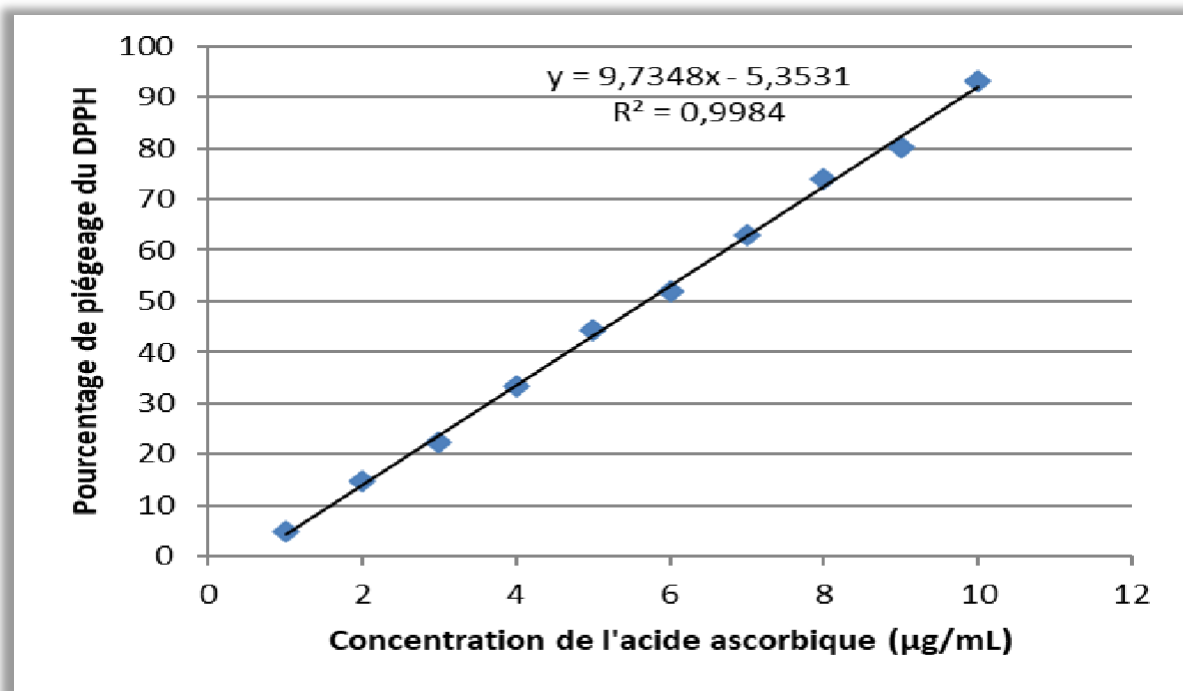


Figure 15 : Evaluation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique (activité antioxydante)

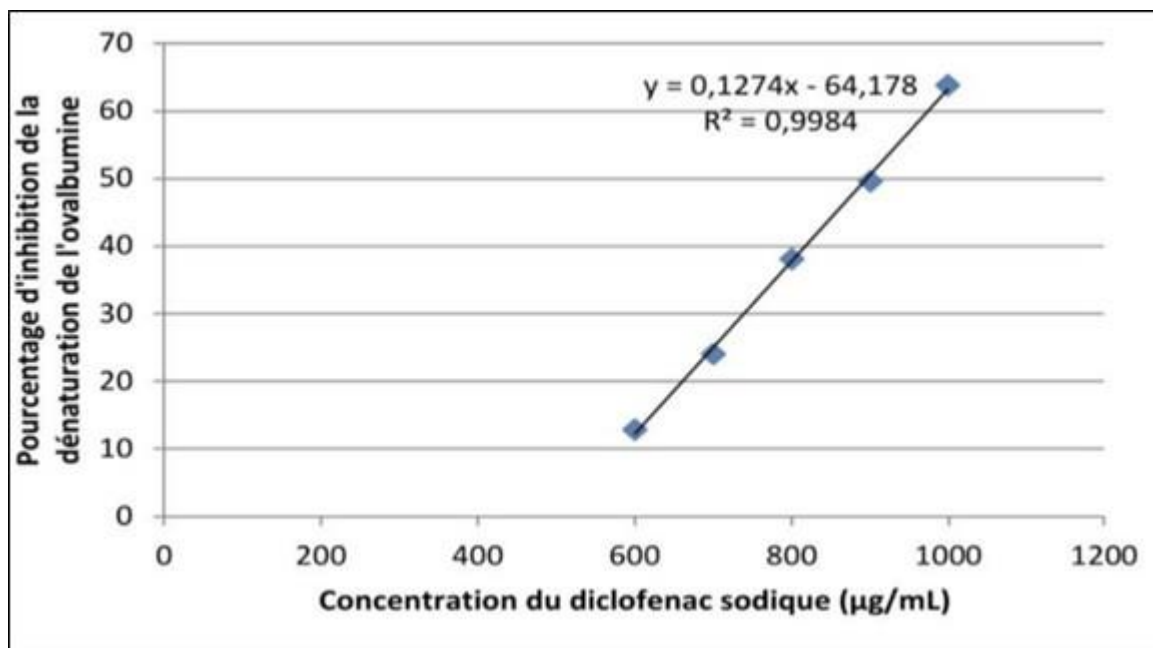


Figure 16 : Courbe d'étalonnage du diclofénac sodique pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation de l'albumine (activité anti-inflammatoire)

Tableau 11 : Valeurs des CE₅₀ des extraits méthanoliques de brocoli et de chardon-Marie pour les activités antioxydante et anti-inflammatoire

Plante	CE ₅₀ antioxydante (mg/mL)	CE ₅₀ anti-inflammatoire (mg/mL)
Brocoli	0,452	1,45
Chardon-Marie	0,1554	0,426

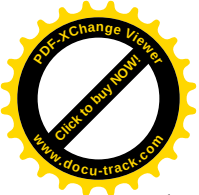
➤ L'activité antioxydante et anti-inflammatoire du Brocoli

L'extrait méthanolique de brocoli montre une activité antioxydante importante, avec un CE₅₀ de 0,452 mg/mL (Tableau 11), légèrement supérieur à celui du chardon-Marie, mais toujours proche du standard, l'acide ascorbique (Figure 15). Contrairement au chardon-Marie, l'action du brocoli repose principalement sur un mécanisme indirect, via l'activation de la voie Nrf2/ARE, induisant l'expression d'enzymes antioxydantes clés telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et l'hème oxygénase-1 (HO-1). Ce mode d'action contribue au renforcement durable des défenses cellulaires contre les ERO, tout en stimulant la biosynthèse du glutathion et la détoxification intracellulaire (Marshall et al., 2023).

En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, le brocoli présente un CE₅₀ de 1,45 mg/mL (Tableau 11), révélant une efficacité plus modérée dans cette étude (Figure 16). Ce résultat indique une concentration plus élevée est nécessaire pour atteindre une inhibition équivalente à celle du chardon-Marie. Néanmoins, le brocoli conserve un potentiel thérapeutique intéressant. Le sulforaphane, un isothiocyanate dérivé du brocoli, exerce des effets anti-inflammatoires indirects, notamment par la modulation du microbiote intestinal et la stimulation de métabolites à activité anti-inflammatoire, selon Marshall et al. (2023). Ce mécanisme est indirect, est particulièrement pertinent *in vivo*.

➤ L'activité antioxydante et anti-inflammatoire du chardon-Marie

Les résultats de notre étude révèlent que l'extrait méthanolique de chardon-Marie présente une activité antioxydante remarquable, avec une concentration efficace à 50 % (CE₅₀ = 0,1554 mg/mL) (Tableau 11), indiquant une forte capacité à neutraliser les radicaux libres (Figure 15). Cette activité peut être attribuée à sa richesse en flavonolignanes, notamment la silibinine ainsi qu'en flavonoïdes polyméthoxylés (quercétine, apigénine) et en tanins hydrolysables (0,452 mg EAT/g). Ces composés possèdent des groupes hydroxyles capables de céder un électron ou un atome d'hydrogène aux radicaux libres, interrompant ainsi les chaînes de peroxydation lipidique. Par ailleurs, la silymarine agit sur d'autres cibles biologiques, notamment par l'inhibition de la 5-lipoxygénase, limitant la



production de leucotriènes pro-oxydants, ainsi que par la réduction de l'expression de l'iNOS, ce qui diminue la production de monoxyde d'azote (NO•), un radical azoté hautement réactif (Surai et al., 2024).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, réalisée par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine, montre également que le chardon-Marie possède une efficacité significative, avec un CE₅₀ de 0,426 mg/mL (Figure 16). Cela indique une forte capacité à stabiliser les structures protéiques face aux agents stressants. Nos résultats montrés dans le Tableau 11 confirment le potentiel du chardon-Marie en tant qu'agent anti-inflammatoire, notamment grâce à la silymarine, qui, selon Mukhtar et al. (2023), inhibe les enzymes COX-2 et module la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α. De plus, Radko et Cybulski (2007) ont également souligné les propriétés antioxydantes de la silymarine, contribuant à la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs liés à l'inflammation.

➤ Synergie bioactive entre le chardon-Marie et le brocoli

Les résultats de cette étude mettent en évidence une synergie fonctionnelle entre les extraits méthanoliques de chardon-Marie et de brocoli, reposant sur la complémentarité de leurs mécanismes d'action. Le chardon-Marie, riche en flavonolignanes tels que la silymarine, agit de manière rapide et directe en neutralisant les radicaux libres et en inhibant les médiateurs pro-inflammatoires. En parallèle, le brocoli, concentré en sulforaphane, active la voie Nrf2/ARE, stimulant ainsi l'expression de gènes antioxydants et anti-inflammatoires (Figure 17), ce qui permet un renforcement durable des défenses cellulaires.

Cette étude souligne l'intérêt pharmacologique de plantes médicinales telles que le brocoli et le chardon-Marie dans la modulation du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire.

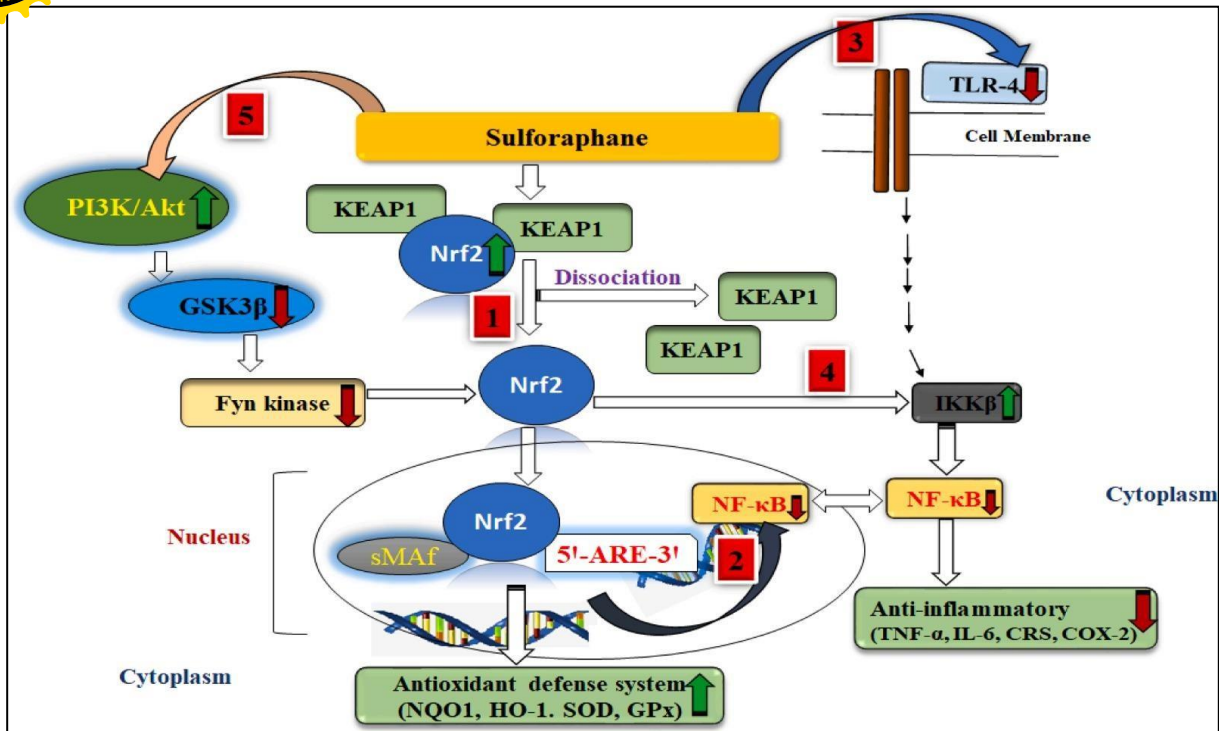


Figure 17 : Mécanismes moléculaires de l'activation de Nrf2 par le sulforaphane et ses implications antioxydantes, anti-inflammatoires. L'activation de la voie Nrf2/ARE par le sulforaphane, composé majeur du brocoli, joue un rôle clé dans la régulation du stress oxydatif, de l'inflammation et des troubles métaboliques comme le diabète de type 2. Ce composé favorise la dissociation du complexe Nrf2-KEAP1, permettant la translocation de Nrf2 dans le noyau, où il active l'expression de gènes antioxydants (1). Il module également la voie NF-κB de façon indirecte via l'activation des éléments de réponse antioxydants (ARE), contribuant à une réponse anti-inflammatoire accrue (2). En inhibant les récepteurs TLR-4 et en stimulant IKKβ, le sulforaphane réduit l'activation de NF-κB (3-4). Par ailleurs, l'activation de la voie PI3K/Akt entraîne l'inhibition de GSK3β et de la kinase Fyn, renforçant la stabilité et l'activité de Nrf2 (5).

III.2. Résultats et discussion de l'étude *in vivo*

III.2.1. Résultats de l'évolution du poids corporel des rats durant le traitement au paracétamol

L'analyse de l'évolution du poids corporel des animaux traités exclusivement au paracétamol a révélé des variations importantes entre les différents sous-groupes expérimentaux, bien que tous aient reçu la même substance active. Le groupe témoin négatif, n'ayant reçu aucun traitement, a présenté une prise de poids progressive et régulière, traduisant un développement physiologique normal en l'absence de stress médicamenteux. En revanche, les groupes traités au paracétamol ont tous montré une évolution pondérale, influencée par le traitement. Les données relatives à l'évolution du poids durant la période d'administration du paracétamol sont illustrées dans la Figure 18.

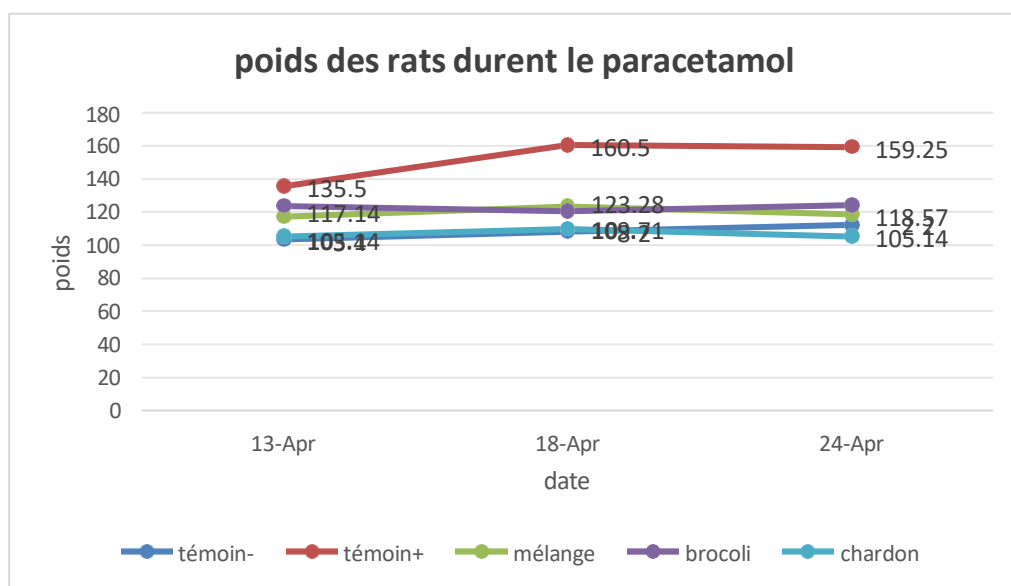


Figure 18 : Évolution du poids corporel des rats pendant le traitement au paracétamol.

Le groupe témoin positif a présenté une augmentation marquée du poids corporel au début de l'expérimentation, suivie d'une légère régression. Cette réponse pourrait être attribuée à une rétention hydrosodée ou à un déséquilibre métabolique induit par le stress oxydatif provoqué par le paracétamol, comme l'ont rapporté plusieurs études de Jaeschke et al., (2012) et Lee, (2017). Nos résultats sont en accord avec ces travaux, indiquant l'impact potentiel du paracétamol sur la régulation métabolique et la croissance corporelle. Les autres groupes traités ont présenté des profils pondéraux similaires, avec des variations modérées qui pourraient être liées à une sensibilité variable au stress oxydatif induit. Ces résultats suggèrent que le paracétamol administré seul est capable d'altérer le métabolisme corporel et de perturber la croissance pondérale normale chez le rat.

III.2.2. Résultats de l'évolution du poids corporel des rats au cours de la période de traitement.

Afin d'évaluer l'impact du traitement au paracétamol et des extraits végétaux (brocoli et chardon-Marie) sur l'état général des rats, une surveillance régulière du poids corporel a été effectuée tout au long de l'expérimentation. La Figure 19 illustre l'évolution du poids moyen des animaux dans les différents lots expérimentaux. Cette analyse permet d'apprécier les effets du paracétamol ainsi que le potentiel protecteur et thérapeutique des extraits de brocoli, de chardon-Marie et de leur combinaison sur la croissance pondérale.

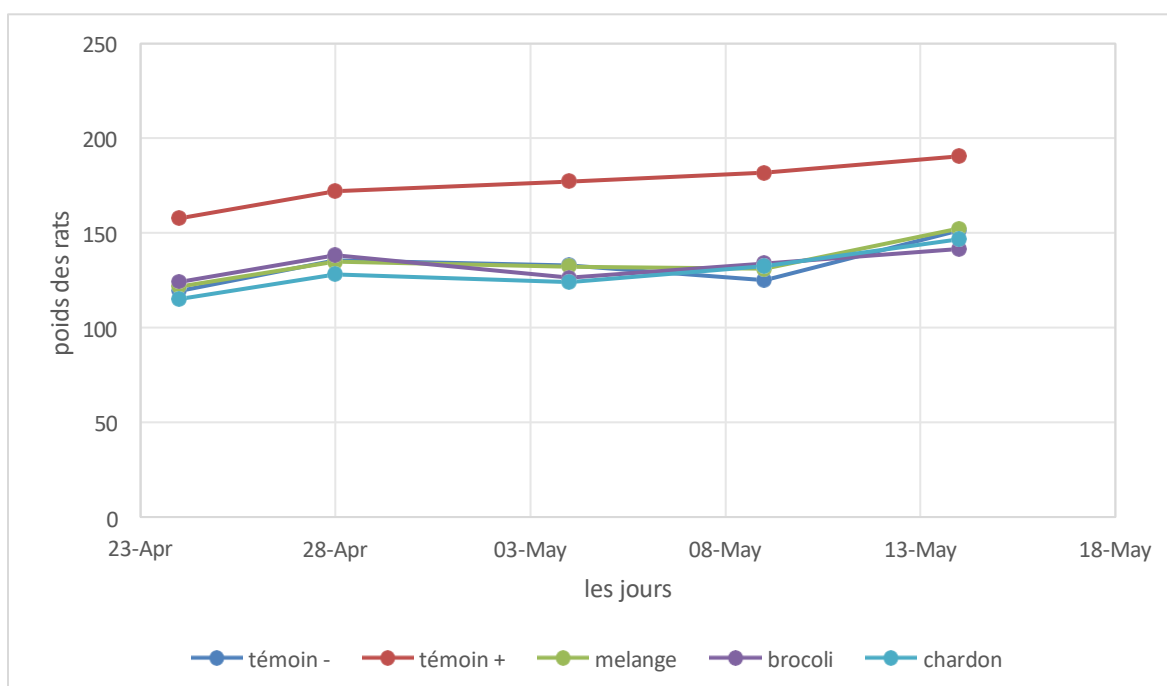
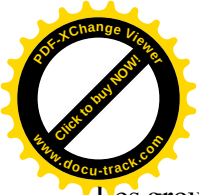


Figure 19 : Évolution du poids corporel des rats au cours de la période de traitement.

Nos résultats montrent une évolution pondérale différenciée entre les groupes expérimentaux, traduisant à la fois l'effet toxique du paracétamol et le potentiel protecteur des extraits végétaux testés. Le groupe témoin négatif, recevant uniquement de l'eau, a maintenu un poids relativement stable tout au long de l'expérimentation, reflétant un état physiologique normal en l'absence d'agression hépatique. À l'inverse, le groupe témoin positif, traité exclusivement au paracétamol, a présenté une prise de poids importante. Ce phénomène pourrait être expliqué par une rétention hydrique (Jaeschke et al., 2002), et une réponse inflammatoire (McGill & Jaeschke, 2013), ou un déséquilibre métabolique induit par le stress hépatique. Cette réponse est considérée comme pathologique.



Les groupes ayant reçu le paracétamol en association avec un extrait végétal (brocoli, chardon- Marie ou leur combinaison) ont montré une évolution pondérale moins marquée, indiquant un effet protecteur potentiel. Le groupe traité avec le mélange des deux extraits a affiché une réduction du poids final (152,42 g contre 190,5 g pour le témoin positif), ce qui suggère une action synergique dans la limitation des effets indésirables du paracétamol (Wagner et al., 1999). Le groupe chardon-Marie a présenté une valeur finale de 146,71 g, en cohérence avec les effets hépatoprotecteurs bien documentés de la silymarine, notamment son action antioxydante, stabilisatrice des membranes cellulaires et inhibitrice de la peroxydation lipidique (Flora et al., 1998). Le brocoli a permis d'obtenir le poids final le plus bas (141,57 g), ce qui s'explique par la présence de sulforaphane, un composé actif connu pour induire les enzymes de phase II impliquées dans la détoxification hépatique (Fahey et al., 2001). Nos résultats sont cohérents avec les résultats de Jaeschke et al. (2002), McGill & Jaeschke (2013), Flora et al. (1998), Wagner et al. (1999) et Fahey et al. (2001), qui ont tous montré les effets toxiques du paracétamol ainsi que les propriétés protectrices des extraits de chardon-Marie et de brocoli. Ces résultats renforcent l'idée que les extraits végétaux testés possèdent un potentiel thérapeutique capable de réduire les perturbations physiologiques causées par le paracétamol.

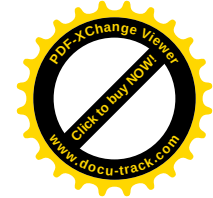
III.3. Résultats et discussion de l'étude *in silico*

L'étude *in silico*, menée à l'aide de la plateforme ADMETlab 3.0, a permis une première prédiction des propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des composés bioactifs sélectionnés. Ces données théoriques ont constitué une base essentielle pour orienter les choix expérimentaux et indiquer les effets indésirables potentiels. Afin de valider ces prédictions, une surveillance rigoureuse des signes cliniques de toxicité a été assurée tout au long de la phase expérimentale. Durant toute la période expérimentale, les animaux ont fait l'objet d'une observation quotidienne rigoureuse, visant à détecter d'éventuelles manifestations cliniques témoignant d'une toxicité induite par les extraits administrés. Plusieurs signes ont été relevés, notamment un pelage anormalement terne, parfois jaunâtre, une hypoactivité associée à une léthargie post-administration, ainsi qu'un comportement agressif entre congénères. Des troubles neuromusculaires, tels que des tremblements, ont été observés

chez certains sujets (Figure 25), en plus de symptômes digestifs incluant diarrhée et vomissements. Des altérations respiratoires et muqueuses, telles que des éternuements répétés, des écoulements nasaux et des saignements, ont également été constatées. Par ailleurs, quelques cas ont présenté des lésions cutanées purulentes, une coloration bleuâtre de la langue, ainsi qu'une diminution significative de la consommation d'eau. L'ensemble de ces manifestations a été consigné systématiquement et a contribué à l'évaluation globale de la tolérance des extraits administrés au cours de l'étude. Cette approche intégrée, alliant prédiction *in silico* et validation *in vivo*, a constitué une étape clé pour identifier les molécules les plus sûres et les plus efficaces, aboutissant ainsi à la formulation rationnelle et sécurisée du produit final.



Figure 25 : Signes cliniques de toxicité observés chez les animaux traités durant l'expérimentation *in vivo*.

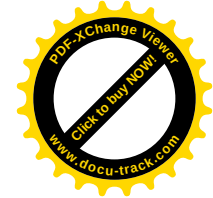
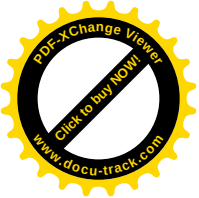


IV Les étapes de l'approche ADMET :

1. Absorption

Property	Value	Decision	Comment
Caco-2 Permeability	-6.37	●	Optimal: higher than -5.15 Log unit

MDCK Permeability	-5.164	●	■ low permeability: $< 2 \times 10^{-6}$ cm/s ■ medium permeability: $2-20 \times 10^{-6}$ cm/s ■ high passive permeability: $> 20 \times 10^{-6}$ cm/s
PAMPA	0.104	●	■ The experimental data for Peff was logarithmically transformed (logPeff). ■ Molecules with log Peff values below 2.0 were classified as low-permeability (Category 0), while those with log Peff values exceeding 2.5 were classified as high-permeability (Category 1).
Pgp-inhibitor	0.984	●	■ Category 1: Inhibitor; ■ Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being Pgp-inhibitor
Pgp-substrate	0.328	●	■ Category 1: substrate; ■ Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being Pgp-substrate
HIA	0.003	●	■ Human Intestinal Absorption ■ Category 1: HIA+(HIA < 30%); ■ Category 0: HIA-(HIA $\geq$ 30%); ■ The output value is the probability of being HIA+
F 20%	0.014	●	■ 20% Bioavailability ■ Category 1: F 20% + (bioavailability < 20%); ■ Category 0: F 20% - (bioavailability $\geq$ 20%); ■ The output value is the probability of being F 20% +
F 30%	0.95	●	■ 30% Bioavailability ■ Category 1: F 30% + (bioavailability < 30%); ■ Category 0: F 30% - (bioavailability $\geq$ 30%); ■ The output value is the probability of being F



			30% +
F 50%	0.999	●	■ 50% Bioavailability ■ Category 1: F 50% + (bioavailability < 50%); ■ Category 0: F 50% - (bioavailability $\square$ 50%); ■ The output value is the probability of being F 50% +

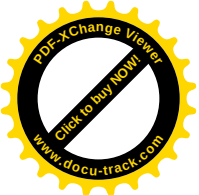
2. Distribution

Property	Value	Decision	Comment
PPB	95.085	●	■ Plasma Protein Binding Optimal: < 90%. ■ Drugs with high protein-bound may have a low therapeutic index.

VDss	0.119	●	■ Volume Distribution ■ Optimal: 0.04-20L/kg
BBB	0.001	●	■ Blood-Brain Barrier Penetration ■ Category 1: BBB+; Category 0: BBB-; ■ The output value is the probability of being BBB+
Fu	4.059	●	■ The fraction unbound in plasms ■ Low: <5%; Middle: 5~20%; High: > 20%
OATP1B1 inhibitor	0.999	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
OATP1B3 inhibitor	1.0	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
BCRP inhibitor	0.987	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.
MRP1 inhibitor	0.894	●	■ Category 0: Non-inhibitor; Category 1: inhibitor. ■ The output value is the probability of being inhibitor, within the range of 0 to 1.

3. Metabolism

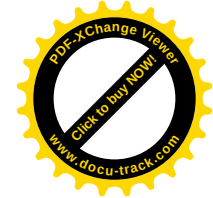
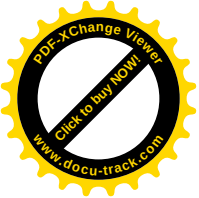
Property	Value	Decision	Comment
----------	-------	----------	---------



CYP1A2 inhibitor	0.0	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP1A2 substrate	0.842	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2C19 inhibitor	0.0	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.

CYP2C19 substrate	0.0	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2C9 inhibitor	0.018	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP2C9 substrate	0.246	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2D6 inhibitor	0.0	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.

CYP2D6 substrate	0.29	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP3A4 inhibitor	0.792	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
CYP3A4 substrate	0.424	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2B6 inhibitor	0.105	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of



			being inhibitor.
CYP2B6 substrate	0.0	●	■ Category 1: Substrate; Category 0: Non-substrate; ■ The output value is the probability of being substrate.
CYP2C8 inhibitor	0.893	●	■ Category 1: Inhibitor; Category 0: Non-inhibitor; ■ The output value is the probability of being inhibitor.
HLM Stability	0.029	●	■ human liver microsomal (HLM) stability ■ Category 0: stable+ (HLM > 30 min); Category 1: unstable- (HLM $\leq$ 30 min). The output value is the probability of human liver microsomal instability, where a value closer to 1 indicates a higher likelihood of instability. The range is between 0 and 1.

4. Excretion

Property	Value	Decision	Comment
CL _{plasma}	5.633	●	■ The unit of predicted CL_{plasma} penetration is ml/min/kg. >15 ml/min/kg: high clearance; 5-15 ml/min/kg: moderate clearance; < 5 ml/min/kg: low clearance.
T _{1/2}	2.476	●	■ The unit of predicted T_{1/2} is hours. ■ ultra-short half-life drugs: 1/2 < 1 hour; short half-life drugs: T_{1/2} between 1-4 hours; intermediate short half-life drugs: T_{1/2} between 4-8 hours; long half-life drugs: T_{1/2} > 8 hours.

5. Toxicity

Property	Value	Decision	Comment
hERG Blockers	0.089	●	■ Molecules with IC₅₀ ≤ 10⁻⁶ M or ≥ 50% inhibition at 10⁻⁶ M were classified as hERG+ (Category 1), ■ while molecules with IC₅₀ > 10⁻⁶ M or < 50% inhibition at 10⁻⁶ M were classified as hERG - (Category 0). ■ The output value is the probability of being hERG+, within the range of 0 to 1.

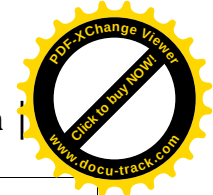
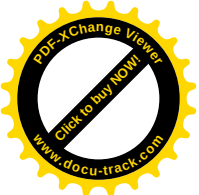
hERG Blockers (10um)	0.277	●	■ Molecules with IC₅₀ ≤ 10⁻⁶ M are classified as hERG+ (Category 1), ■ and molecules with IC₅₀ > 10⁻⁶ M are classified as hERG- (Category 0). ■ The output value is the probability of being hERG+, within the range of 0 to 1.
DILI	0.926	●	■ Drug Induced Liver Injury. ■ Category 1: drugs with a high risk of DILI; ■ Category 0: drugs with no risk of DILI. ■ The output value is the probability of being

			toxic.
AMES Muta genicity	0.928		■ AMES Toxicity ■ Category 1: Ames positive(+); ■ Category 0: Ames negative(-); ■ The output value is the probability of being toxic.
Rat Oral Acute Toxicit y	0.475		■ Rat Oral Acute Toxicity. ■ Category 0: low-toxicity, > 500 mg/kg; ■ Category 1: high-toxicity; < 500 mg/kg. ■ The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.
FDAMDD	0.252		■ FDA Maximum (Recommended) Daily Dose. ■ Category 1: FDAMDD (+); ■ Category 0: FDAMDD (-); - The output value is the probability of being positive.

Skin Sensiti zation	0.999		■ Category 1: Sensitizer; ■ Category 0: Non-sensitizer. ■ The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.
Carcinogeni city	0.609		■ Category 1: carcinogens; ■ Category 0: non-carcinogens; ■ The output value is the probability of being toxic.
Eye Corrosio n	0.0		■ Eye Corrosion ■ Category 1: corrosives; Category 0: noncorrosives; ■ The output value is the probability of being corrosives.

Eye Irritation	0.849	●	■ Eye Irritation ■ Category 1: irritants; Category 0: nonirritants; ■ The output value is the probability of being irritants.
Respiratory	0.379	●	■ Category 1: respiratory toxicants; ■ Category 0: non-respiratory toxicants. ■ The output value is the probability of being toxic, within the range of 0 to 1.
Human Hepatotoxicity	0.948	●	■ Human Hepatotoxicity ■ Category 1: H-HT positive(+); ■ Category 0: H-HT negative(-); ■ The output value is the probability of being toxic.
Drug-induced Nephrotoxicity	0.943	●	■ Category 0: non-nephrotoxic (-); ■ Category 1: nephrotoxic (+). ■ The output value is the probability of being nephrotoxic (+), within the range of 0 to 1.

Ototoxicity	0.669		■ Category 0: non-ototoxicity (-); ■ Category 1: ototoxicity (+). ■ The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Hematotoxicity	0.447		■ Category 0: non-hematotoxicity (-); ■ Category 1: hematotoxicity (+). ■ The output value is the probability of being hematotoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Genotoxicity	0.986		■ Category 0: non-Genotoxicity (-); ■ Category 1: Genotoxicity (+). ■ The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
RPMI-8226 Immunotoxicity	0.279		■ Category 0: non-cytotoxicity (-); ■ Category 1: cytotoxicity (+). ■ The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
A549 Cytotoxicity	0.928		■ Category 0: non-cytotoxicity (-); ■ Category 1: cytotoxicity (+). ■ The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Hek293 Cytotoxicity	0.881		■ Category 0: non-cytotoxicity (-); ■ Category 1: cytotoxicity (+). ■ The output value is the probability of being ototoxicity (+), within the range of 0 to 1.
Drug-induced Neurotoxicity	0.559		■ Category 0: non-neurotoxic (-); ■ Category 1: neurotoxic (+). ■ The output value is the probability of



city			being neurotoxic (+), within the range of 0 to 1.
------	--	--	---

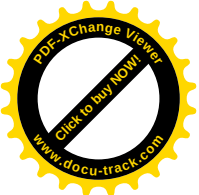
6. Environmental toxicity

Property	Value	Comment
Bioconcentration Factors	0.964	■ Bioconcentration factors are used for considering secondary poisoning potential and assessing risks to human health via the food chain. ■ The unit is $\square \log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
IGC ₅₀	3.582	■ Tetrahymena pyriformis 50 percent growth inhibition concentration. ■ The unit is $\square \log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
LC ₅₀ FM	4.17	■ 96-hour fathead minnow 50 percent lethal concentration. ■ The unit is $\square \log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$
LC ₅₀ DM	4.943	■ 48-hour daphnia magna 50 percent lethal concentration. ■ The unit is $\square \log_{10}[(\text{mg/L})/(1000 \cdot \text{MW})]$

Les résultats comparatifs sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 12), et mettent en évidence des profils différenciés en termes d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité.

Tableau 12 : Paramètres ADMET prédits des trois composés bioactifs étudiés

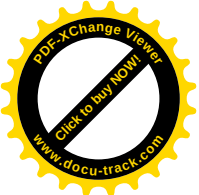
Paramètre	Sulforaphane	Acide α -lipoïque	Silymarine (Silibinine)
HIA (Absorption intestinale)	✗ 0.003	✓ 0.923	✗ 0.003
Caco-2 perméabilité	✓ -5.124	✓ -4.98	✗ -6.37
F30% / F50% biodispo orale	✗ <0.05	✓ >0.85	✗ F30%=0.95, F50%=0.999
PPB (liaison protéines)	Élevée >90%	Élevée >90%	✓ 95.08%
BBB (passage cérébral)	✗ 0.01	✓ 0.946	✗ 0.001
Substrat CYP450	Oui (CYP3A4, 2C19...)	Oui (CYP2B6, 2C9)	Oui (CYP1A2, 2D6, 3A4)
CL _{plasma} (Clearance)	8.32 ml/min/kg	6.87 ml/min/kg	5.63 ml/min/kg
T _{1/2} (Demi-vie)	2.8 h	3.4 h	2.47 h
Ames test (mutagénicité)	✓ Positif	✗ Négatif	✓ Positif (0.928)
Hépatotoxicité humaine	✗ 0.005	⚠ 0.994	⚠ 0.948
Skin sensitization	✓ 0.981	✓ 0.999	✓ 0.999
Genotoxicité	✓ Élevée (0.933)	✗ Faible (0.018)	✓ Élevée (0.986)



Cytotoxicité (A549)	✓ 0.928	⚠ 0.659	✓ 0.928
Réactivité chimique	✓ 0.933	⚠ 0.423	⚠ 0.37

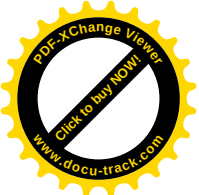
L'analyse *in silico* met en évidence des profils pharmacocinétiques intéressants, parmi les trois composés étudiés. Le sulforaphane et la silymarine présentent une absorption intestinale très faible ($HIA \approx 0.003$) et une biodisponibilité orale limitée, probablement en raison de leur faible solubilité, d'un métabolisme hépatique intensif et d'une perméabilité réduite à travers la barrière intestinale. En revanche, l'acide α -lipoïque se distingue par une absorption élevée ($HIA \approx 0.92$) et une bonne biodisponibilité orale, ce qui en fait un candidat favorable pour une administration per os. Les trois molécules présentent une forte liaison aux protéines plasmatiques ($>90\%$), ce qui peut réduire la fraction libre active dans la circulation systémique. Toutefois, seul l'acide α -lipoïque traverse efficacement la barrière hémato-encéphalique (BBB), ce qui suggère un potentiel thérapeutique dans les pathologies neurologiques, à la différence du sulforaphane et de la silymarine. Par ailleurs, tous les composés sont substrats de diverses isoformes du cytochrome P450, traduisant une métabolisation hépatique significative et un risque d'interactions médicamenteuses, en particulier chez les patients polymédiqués. Leur clairance est modérée et leur demi-vie courte ($T_{1/2} < 4\text{ h}$), ce qui pourrait justifier le recours à des formes galéniques à libération prolongée pour maintenir une concentration plasmatique efficace. Enfin, l'évaluation toxicologique *in silico* révèle plusieurs points de vigilance : le sulforaphane et la silymarine présentent un profil génotoxique et cytotoxique élevé, associé à une forte sensibilisation cutanée, tandis que l'acide α -lipoïque est associé à un risque potentiel d'hépatotoxicité, probablement dose-dépendant.

Ces résultats *in silico* obtenus par l'outil ADMETlab 3.0, sont en accord avec les données expérimentales décrites dans la littérature. Le sulforaphane, extrait du brocoli et d'autres crucifères, est reconnu pour ses effets antioxydants et anticancéreux. Toutefois, sa faible biodisponibilité orale déjà rapportée par Zeng et al. (2017), découle de sa dégradation rapide et de son métabolisme intensif. Sa forte réactivité chimique, liée au groupe isothiocyanate, pourrait expliquer ses effets biologiques puissants mais aussi son potentiel toxique. L'acide α -lipoïque est bien

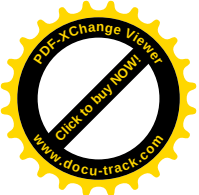


documenté pour ses effets neuroprotecteurs, antioxydants et hépatoprotecteurs. Son excellente absorption orale confirmée ici est en cohérence avec les études de Shay et al. (2009). Néanmoins, la prédiction d'une hépatotoxicité suggère une prudence posologique, en accord avec les observations chez l'animal à forte dose.

Quant à la silymarine, et plus particulièrement la silibinine, elle est largement utilisée pour ses effets protecteurs sur le foie. Sa faible biodisponibilité est bien connue (Bijak, 2017), et les prédictions d'hépatotoxicité et de génotoxicité pourraient refléter des effets contextuels liés à l'accumulation ou à des interactions métabolique



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

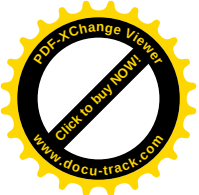


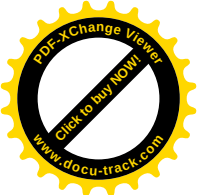
Conclusion et perspectives

Cette étude visait à valoriser deux plantes médicinales d'intérêt thérapeutique : le brocoli « *Brassica oleracea* » et le chardon-Marie « *Silybum marianum* », reconnues pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices. Pour ce faire, plusieurs approches complémentaires ont été adoptées, combinant des analyses phytochimiques, des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une modélisation toxicologique *in silico*. À partir de ces données, une formulation méthanolique à base d'extraits des deux plantes a été conçue et testée.

Les résultats ont mis en évidence une teneur élevée en polyphénols, notamment en flavonoïdes et acides phénoliques, ainsi qu'une activité antioxydante significative. Les tests anti-inflammatoires ont montré une inhibition dose-dépendante de la dénaturation des protéines, comparable à celle obtenue avec les anti-inflammatoires de référence. L'analyse histologique a confirmé un effet hépatoprotecteur marqué chez les rats traités, avec une restauration presque complète de l'architecture hépatique et une nette réduction des signes de nécrose et de stress oxydatif induits par le paracétamol. Par ailleurs, les analyses *in silico* ont renforcé ces observations en prédisant une bonne biodisponibilité orale pour des composés majeurs comme la silymarine et le sulforaphane, et un profil toxicologique modéré, suggérant une utilisation possible dans un cadre préventif, sous certaines précautions. Ces résultats positionnent ainsi cette formulation comme un candidat prometteur pour la prévention des atteintes hépatiques liées au stress oxydatif ou à l'exposition à des agents hépatotoxiques.

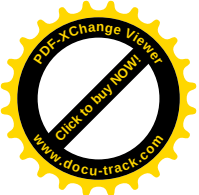
Pour consolider ces résultats, plusieurs perspectives de recherche s'imposent : des études *in vivo* prolongées sur d'autres modèles pathologiques, des essais cliniques de tolérance et d'efficacité chez l'humain, ainsi que des investigations mécanistiques ciblant notamment les voies Nrf2/Keap1 et NF- κ B. En parallèle, une optimisation galénique (forme solide ou liquide à libération contrôlée) pourrait améliorer la stabilité, la biodisponibilité et l'acceptabilité du produit. Enfin, une évaluation du potentiel de valorisation industrielle dans le domaine des phytomédicaments, compléments alimentaires ou produits nutraceutiques ouvrirait la voie à des applications concrètes dans la prévention des maladies chroniques d'origine hépatique et oxydative.





REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE



(A)

Abdelwahab, K. H. (2020, 22 février). L'hépatotoxicité induite par un surdosage en paracétamol (Mémoire de fin d'études de licence, Faculté de Technologie Médicale, Département de Technologie Pharmaceutique, Université de Sebha). Récupéré de <https://repository.sebhau.edu.ly/handle/1/2150>

Abenavoli, L., et al. (2018). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 32(6), 1107–1114.

Adesanya, E. O., Oyesiku, O. O., Adesanya, O. O., Ogunlakin, A. D., Odugbemi, A. I., & Egieyeh, S. A. (2022). Phytochemical components and GC-MS analysis of *Petiveria alliacea* L. fractions and volatile oils. *Pharmaceutical Sciences Research*, 9(1), 1–14.

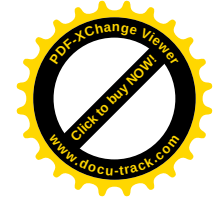
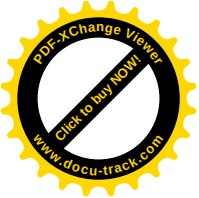
Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milic, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202–2213. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>

Alam, S. D., Ali, I., Beg, M. A., Kanamarlapudi, V., et al. (2024). Separation and identification of berberine in plant extracts using LCMS for antibacterial activity against *E. coli* determination and artificial intelligence prediction for other activities. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4013947/v1>

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F. (2005). Compositional and sensory characteristics of dates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7586–7591.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.

araniak, M., & Kalembe-Drożdż, M. (2020). Gummy dietary supplements – A modern dosage form. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(2), 121–127.



(B)

Baenas, et all 2015 “Metabolism and antiproliferative effects of sulforaphane and broccoli sprouts in human intestinal (Caco2) and hepatic (HepG2) cells”, dans *Phytochemistry Reviews*, volume 14, pages 1035–1044

Baraniak, M., & Kalembe-Drożdż, M. (2020). Gummy dietary supplements – A modern dosage form. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(2), 121–127.

Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian, S., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). *Silybum marianum*: Beyond hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(4), 292–301. <https://doi.org/10.1177/2156587215571116>

Bussler, W., DeZego, K., Chandler, H., Reid, R. W., & Komarnytsky, S. (2025). Nutrient-nutrient interactions among broccoli glucosinolates and their implications for breeding cruciferous crops to enhance human health. *Nutrients*, 17(344).

Bijak, M. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.

Bijak, M. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.

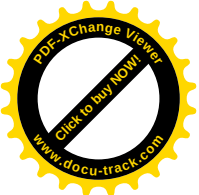
(C)

Chalal, T., & Cherguelaine, M. (2022). Évaluation de quelques activités biologiques du brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) (Mémoire de Master, Université Saad Dahlab – Blida 1). Récupéré de <https://di.univ-blida.dz/jspui/handle/123456789/21920>

CheikhZouaoui, K. Z. (2023). L'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez le rat albinos Wistar (Mémoire de Master, Université Mohammed Cherif Messaadia –

Constantine

<https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2023/L'hépatotoxicité%20induite%20par%20le%20paracétamol.pdf>



Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(25), 8082–8091.

Chakraborty, M., et al. (2011). Antioxidant and radical scavenging activity of novel pyrazolone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(5), 1887–1894.

Chatterjee, T. K., Rana, S., & Ghosh, M. (2016). Mechanisms of action of diosmin in oxidative stress and inflammation. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1234–1245.

(D)

Decock, C. (2018). Le foie et la phytothérapie (Mémoire de fin d'études, Université de Lille). Récupéré de https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/Th_Pharma/2018/2018LILUE152.pdf

Decock, C. (2018). Le foie et la phytothérapie (Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Lille, Faculté de Pharmacie). Université de Lille.

Dubé, P.-A. (2010). La silymarine dans l'intoxication aux amatoxines. *Bulletin d'information toxicologique*, 26(2), 1–7. Institut national de santé publique du Québec.

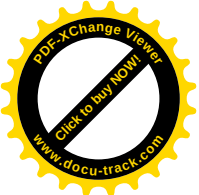
(E)

Eisa, S., Youssef, S., & Abd Elshafy, S. (2024). Effect of paracetamol on the liver of adult male albino rats and the possible protective effect of folic acid. *Al-Azhar International Medical Journal*, 5(11), Article 9. <https://doi.org/10.58675/2682-339X.2740>

(F)

Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10367–10372. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10367>

Freitas, J. A., Santamarina, A. B., Otoch, J. P., & Pessoa, A. F. M. (2024). Silymarin: A natural compound for obesity management. *Obesities*, 4(3), 292–313.



Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*, 22(2), 191.

(G)

Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(11), 1553–1568.

Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210–218.

Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210–218.

(H)

Harborne, J. B. (1999). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer.

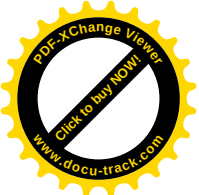
Huet, M., & Fleurentin, J. (2013). Curcuma, thé vert et chardon-marie : quelle stratégie adopter en prévention du cancer ou en complément des traitements ? *Hegel*, 3(4), 268–281.

(J)

Jebelli Javan, A., Mirhaj, F., Khorshidian, N., & Mohammadi, M. (2025). Effet de la marinade au jus de brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) et à la sauce soja sur les propriétés physicochimiques, structurales et oxydatives du steak de bœuf. *Applied Food Research*, 5, 100713.

(K)

Khamla, K., & Khaldi, A. (2022). Évaluation de l'effet thérapeutique de *Silybum marianum* contre l'hépatotoxicité (in vivo) et l'activité antimicrobienne (in vitro) (Mémoire de Master, Université de Biskra). Récupéré de <http://archives.univ-biskra.dz/handle/123456789/22927>



Koshak, M. F., El-Readi, M. Z., Elzubier, M. E., Refaat, B., Almaimani, R. A., Idris, S., Althubiti, M., Al-Amodi, H. S., & Eid, S. Y. (2022). Antioxidative and anti-inflammatory protective effects of fucoxanthin against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Marine Drugs*, 20(11), 712. <https://doi.org/10.3390/md20110712>

Kew Science. (2024). *Brassica oleracea* L. Plants of the World Online. Récupéré le 26 juin 2025, de <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:280460-1>

Křen, V., & Valentová, K. (2022). Silybin and its congeners: From traditional medicine to molecular effects. *Natural Product Reports*, 39(7), 1264–1281.

Khan, M. U., Raza, F., Zhu, Y., Ali, M., Khan, A., Khan, R. U., & Yuan, J. (2020). Mechanistic understanding and health benefits of phenolic compounds from broccoli (*Brassica oleracea* L.): Recent advances. *Food Chemistry*, 329, 127198.

Křen, V., & Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin—new effects and applications. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic*, 149(1), 29–41

(L)

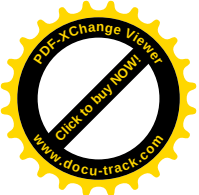
Lecerf, J. M. (2021). Galénique et nutraceutique : modernisation des formes pour une meilleure observance. *Actualités Diététiques et Nutritionnelles*, 47(3), 14–18.

Lee, S. J., et al. (2014). Berberine protects against oxidative stress-induced hepatotoxicity by activating the Nrf2/HO-1 pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 13139–13153.

Li, Y., et al. (2020). Chelation and redox properties of berberine: Implications in cellular protection. *Chemico-Biological Interactions*, 327, 109180.

Lecerf, J. M. (2021). Galénique et nutraceutique : modernisation des formes pour une meilleure observance. *Actualités Diététiques et Nutritionnelles*, 47(3), 14–18.

(M)



Ma, S., Pang, X., Tian, S., Sun, J., Hu, Q., Li, X., & Lu, Y. (2022). The protective effects of sulforaphane on high-fat diet-induced metabolic associated fatty liver disease in mice via mediating the FXR/LXR α pathway. *Food & Function*, 13, 12966–12982. <https://doi.org/10.1039/D2FO02341E>

Marceddu, R., Dinolfo, L., Carrubba, A., Sarno, M., & Di Miceli, G. (2023). Milk thistle (*Silybum marianum* L.) as a novel multipurpose crop for agriculture in marginal environments: A review. *Plants*, 12(3), 574. <https://doi.org/10.3390/plants12030574>

Marshall, K. M., Zhang, Y., & Li, X. (2023). *Sulforaphane-mediated activation of Nrf2 and its role in antioxidant defense*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 115, 109234.

Momenah, M. A., Ebrahim, H. A., Alzamil, N. M., Alfaifi, M., Alshahrani, M. Y., Kamar, S. S., Haidara, M. A., Al-Ani, B., & Dawood, A. F. (2022). Paracetamol poisoning induces acute liver injury in rats: Inhibition of miR-155/CD45 axis-mediated antioxidant depletion and hepatotoxicity using quercetin and resveratrol. *International Journal of Morphology*, 40(5), 1174–1180. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022022000501174>

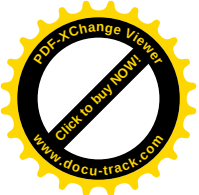
Moslemi, F., Eidi, A., Mortazavi, P., & Rezazadeh, S. (2021). Hepatoprotective effect of broccoli sprout extract against acetaminophen-induced liver injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110994. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110994>

Mukherjee PK. *Quality Control of Herbal Drugs*, 1^{re} édition, Business Horizons, New Delhi, 2002, pp. 380–422

MacDonald-Ramos, K., Michán, L., Martínez-Ibarra, A., & Cerbón, M. (2021). La silymarine est un allié contre la résistance à l'insuline : Une revue. *Annals of Hepatology*, 23, 100255.

Montaut, S., Rollin, P., De Nicola, G. R., Iori, R., & Tatibouët, A. (2012). Composés bioactifs des Crucifères : un apport bénéfique dans notre quotidien. *Phytothérapie*, 10(5), 342–349.

Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1993). Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 19(4), 613–621. <https://doi.org/10.1007/BF00984996>



Marshall, K. M., Zhang, Y., & Li, X. (2023). Sulforaphane-mediated activation of Nrf2 and its role in antioxidant defense. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 115, 109234.

(N)

Nandini, D. B., Rao, R. S., Deepak, B. S., & Reddy, P. B. (2016). Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(2), 317–323. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.185924>

Nandini, D., Rao, R., Deepak, B., & Reddy, P. (2020). Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 24(2), 405.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661.

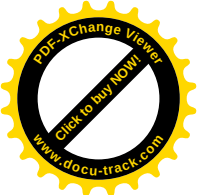
(P)

Phang, J. M., et al. (2015). Proline metabolism and redox: emerging roles in cancer biology. *Amino Acids*, 47(10), 2143–2151.

Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.

Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>

(Q)



Quizhpe, J., Ayuso, P., Rosell, M. d. l. Á., Peñalver, R., & Nieto, G. (2022). Brassica oleracea var. italica and their by-products as source of bioactive compounds and food applications in bakery products: A review. *Antioxidants*, 11(9), 1835. <https://doi.org/10.3390/antiox11091835>

Quizhpe, J., Ayuso, P., Rosell, M. d. l. A., Peñalver, R., & Nieto, G. (2024). Brassica oleracea var. italica et ses sous-produits comme source de composés bioactifs et applications alimentaires dans les produits de boulangerie. *Foods*, 13(21), 3513.

(R)

Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., & Russo, G. L. (2010). Phytochemicals in cancer prevention and therapy: Truth or dare? *Toxins*, 2(4), 517–551. <https://doi.org/10.3390/toxins2040517>

Ribes, N., Brossard, D., & Courilleau, N. (2017). Nouvelles formes orales : de la formulation à la mise sur le marché. *Pharmaceutiques*, (153), 62–67.

Rai, V., Abdo, J., Alsudyani, A., & Agrawal, D. K. (2017). Cellular and molecular targets for the immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 437(1–2), 13–24

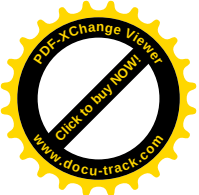
Rajman, L., Chwalek, K., & Sinclair, D. A. (2018). Therapeutic potential of NAD⁺-boosting molecules: the in vivo evidence. *Cell Metabolism*, 27(3), 529–547.

Revollo, J. R., Grimm, A. A., & Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50754–50763.

(S)

Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.

Shah, R. M., Sulaiman, S. A., & Mohamed, M. (2020). Berberine in the treatment of metabolic syndrome: A review. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 1–10.



Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2009). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104(3), 1106–1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.019>

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(Suppl), 215S–217S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>

Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8th ed.). Elsevier.

Surai, P. F., Surai, A., & Earle-Payne, K. (2024). Silymarin and inflammation: Food for thoughts. *Antioxidants*, 13(1), 98.

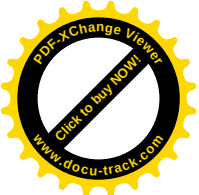
Shaker, E., Mahmoud, H., & Mnaa, S. (2010). Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 803–806. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.011>

Sharma, A., Sharma, M. K., & Kumar, M. (2018). Protective effect of *Silybum marianum* on histopathological changes in liver of paracetamol intoxicated rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56(2), 130–137.

Shelp, B. J., Liu, L., & McLellan, D. (1993). Glucosinolate composition of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) grown under various boron treatments at three Ontario sites. *Canadian Journal of Plant Science*, 73(4), 885–888. <https://doi.org/10.4141/cjps93-115> de Freitas, J. A., Santamarina, A. B., Otoch, J. P., & Pessoa, A. F. M. (2022).

Silymarin: A natural compound for obesity management. *Nutrients*, 14(1), 89. <https://doi.org/10.3390/nu14010089>

Stephen J. Polyak et al., publié dans *Antiviral Therapy* en 2013, "Silymarin for HCV infection." *Antivir Ther.* 2013;18(2):141–147. doi:10.3851/IMP2402



Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768–780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>

Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1149-1160

(T)

Tandon, V. R., Khajuria, V., Kapoor, B., Kour, D., & Gupta, S. (2005). Hepatoprotective activity of silymarin in experimental liver injury models: A review. *International Journal of Green Pharmacy*, 1(2), 80–83.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.

(V)

Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V., & Rosa, E. A. S. (2015). Phytochemicals and antioxidant activity of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. *Food Chemistry*, 167, 429–436.

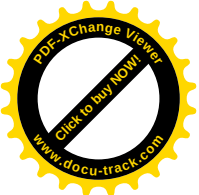
Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V., Fernandes, D., Rosa, E., Oliveira, M. B. P. P., & Bento, A. (2015). Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated storage and maturity stage. *Food Chemistry*, 173, 177–185.

(X)

Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., & Hou, T. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5–W14.

(Y)

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*,



59(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>

(Z)

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *PNAS*, 89(6), 2399–2403. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2399>

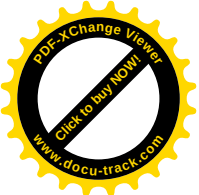
Zhao et al. (2010) décrivent dans *World Journal of Gastroenterology* l'effet protecteur du SFN contre les lésions hépatiques induites par une ischémie/réperfusion intestinale, via l'activation de Nrf2ARE

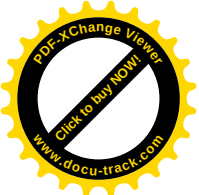
Zhang, X., Liu, M., Wang, Z., Wang, P., Kong, L., Wu, J., Wu, W., Ma, L., Jiang, S., Ren, W., Du, L., Ma, W., & Liu, X. (2024). A review of the botany, phytochemistry, pharmacology, synthetic biology and comprehensive utilization of *Silybum marianum*. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1417655.

Zhao, X., Wang, H., Yang, Y., Gou, Y., Wang, Z., Yang, D., & Li, C. (2021). Protective effects of silymarin against D-Gal/LPS-induced organ damage and inflammation in mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 1903–1914.

Zeng, W., Jin, L., Zhang, F., Zhang, C., & Liang, W. (2017). Sulforaphane protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via Nrf2-mediated detoxification and GSH replenishment. *Food & Function*, 8(3), 1383-1392.

Zhou, H., et al. (2016). Berberine attenuates hepatic oxidative stress and inflammation in diet-induced obese mice through activation of AMPK pathway. *Phytomedicine*, 23(11), 1130–1139.





ANNEXES

Annex 01



Figure 26 : les graines de chardon marie



Figure 27: les graines brocoli

Annex 02

Tableau 12: Conditions d'expérimentation animale .

Paramètre	Détail
Espèce	Rat mâle de souche Wistar
Nombre total	30 rats
Poids initial	Entre 80 et 100 g
Origine	Centre d'élevage de l'Institut Pasteur de Kouba, Alger
Lieu d'expérimentation	Animalerie de la station expérimentale, Université Blida 1
Durée d'expérimentation	8 semaines + 2 jours
Période d'adaptation	1 semaine
Type de cages	Cages en polyéthylène identifiées
Litière	Copeaux de bois, changés tous les 2 jours
Température ambiante	25 ± 2 °C
Humidité relative	35 %
Cycle lumière/obscurité	12 h / 12 h
Régime alimentaire durant l'étude	Aliment standard
Suivi du poids	Pesée tous les 5 jours

Annexe 03



Figure 28 : alimentation des rats de souche Wista

Annex 04

Tableau 13: Matériel non biologique

Verreries et les autre	Réactives chimiques
• Béchers • Erlenmeyer • Ballon • Flacon • Micropipette (de 200µl à 1000µl) • éprouvette • Seringue • Sonde oro-gastrique • Les boîtes stériles rouges • Compresses • Lames de bistouri • Ciseaux. • Trousses de dissection • Plateaux de dissection • Cotton • lames et lamelles • Papier absorbant. • Papier aluminium • Cassettes d'inclusion en plastique	• Méthanol (99,5 %) • Solvant pour préparation injectable • formaldéhyde à 36% • Acide éthylique 96° • Acide éthylique 100° • Buthanole • Parafine • eau distillée. • Xylène • Hemato xylène • 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) • acétate de sodium • acide chlorhydrique • acide sulfurique • carbonate de sodium • chlorure de sodium • dihydrogénophosphate de potassium • DMSO

Appareil :



Condenseur/Réfrigérant

Corps de l'extracteur

Tube de distillation/ Siphon

Ballon

Chauffe ballon

Figure 29 : appareil de Soxhlet



Figure 30 : chromatographie en phase liquide haute performance

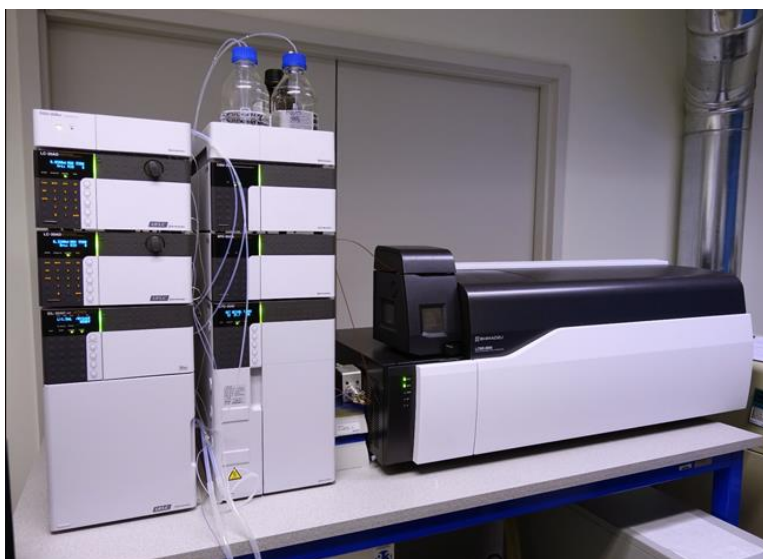


Figure 31 : La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse



Figure 32 :L'appareille évaporateur rotatif (Rotavap)



Figure 33 : lyophilisateur

Annex 03

Pour diluer du formaldéhyde à 36% afin d'obtenir une solution de formol à 10% pour la conservation du foie de rats, on applique la formule de dilution :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donc pour préparation de 500ml :

C_1 = concentration initiale = 36%

C_2 = concentration finale souhaitée = 10%

V_2 = volume final désiré = 500 mL

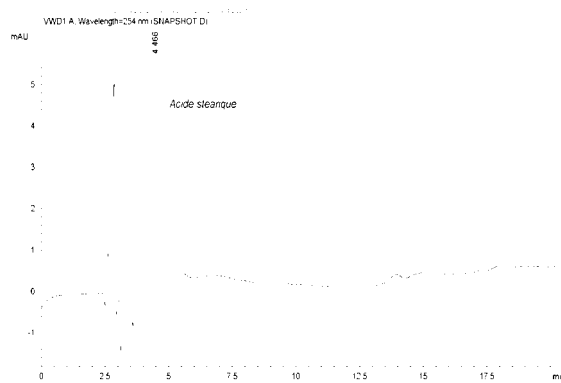
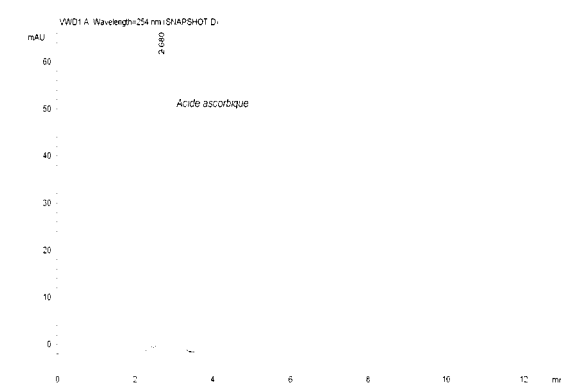
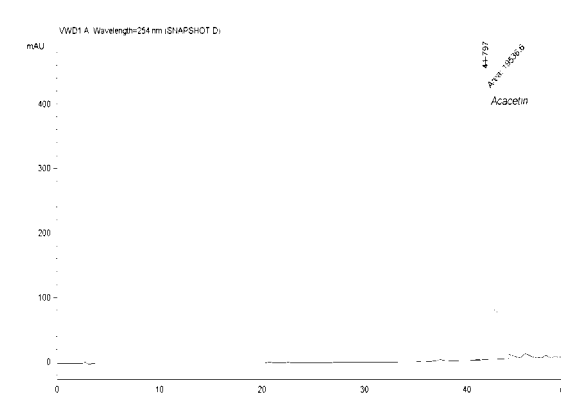
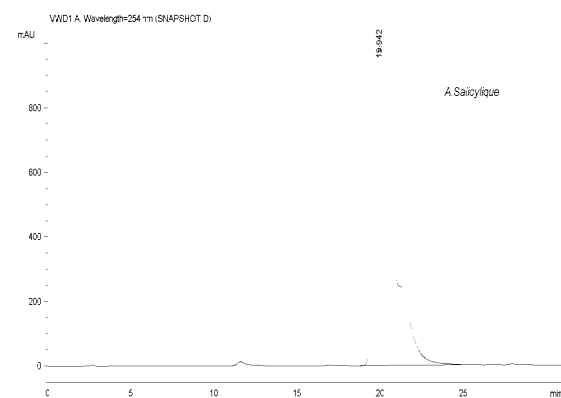
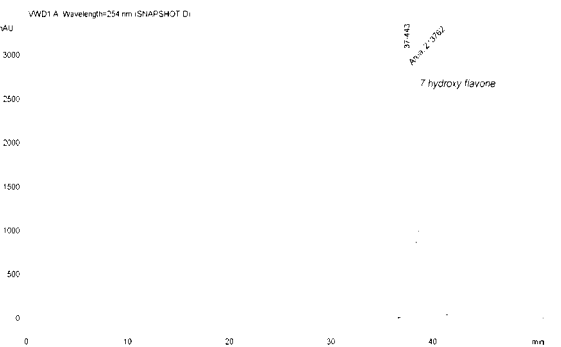
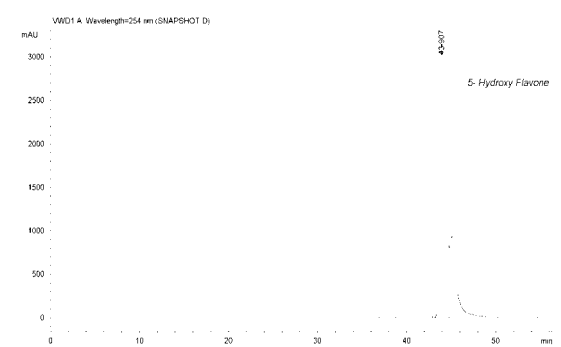
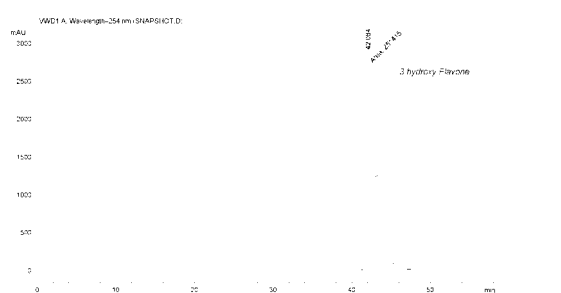
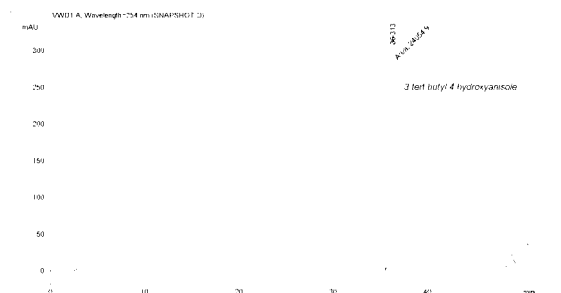
V_1 = volume de du formaldéhyde à 36%= **138,9 mL**

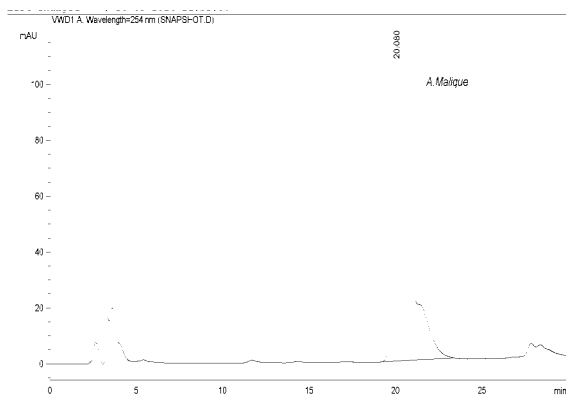
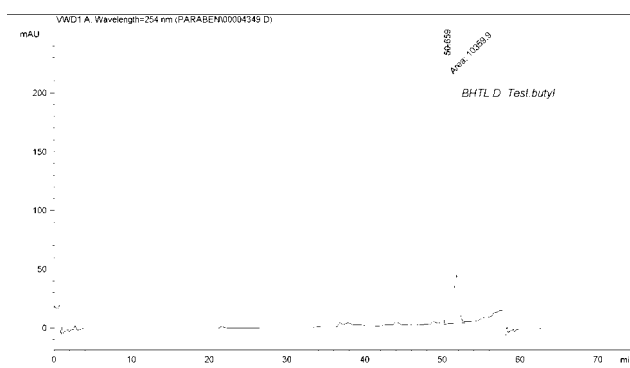
Le mélange a été réalisé dans un flacon en verre propre, fermé hermétiquement.

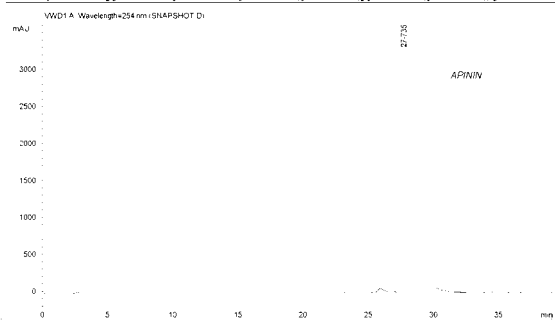
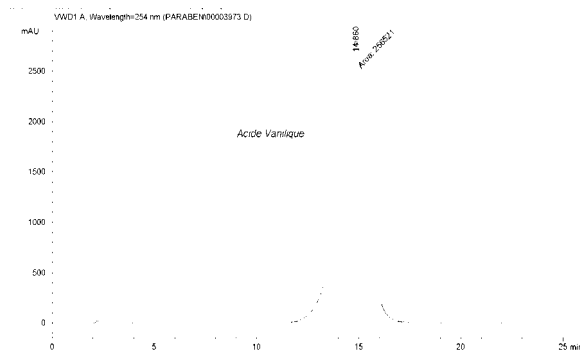
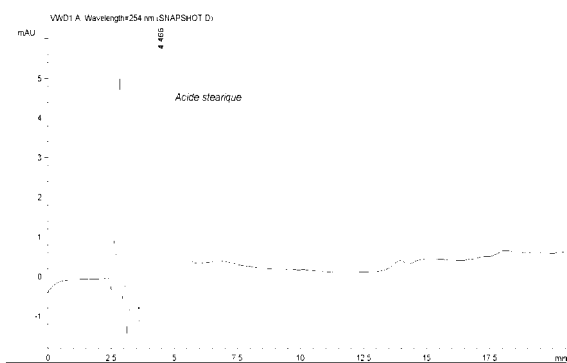
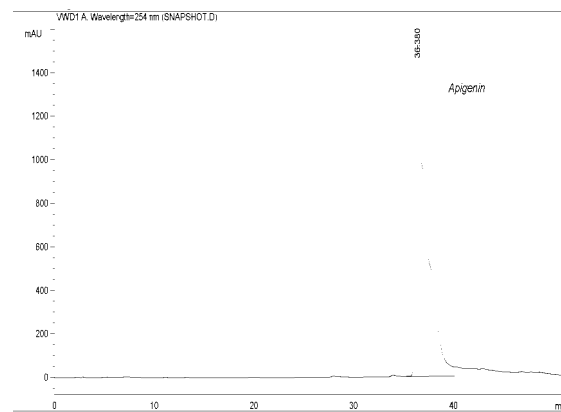
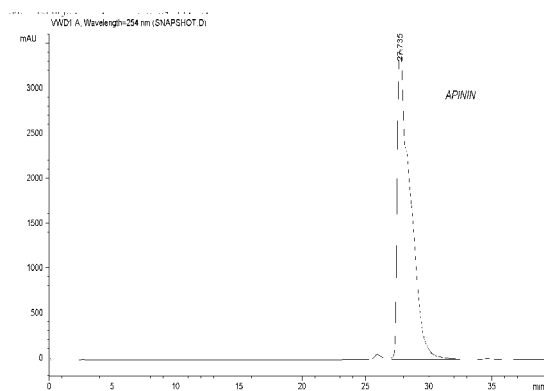
La solution ainsi obtenue a été conservée à température ambiante dans un endroit bien ventilé.

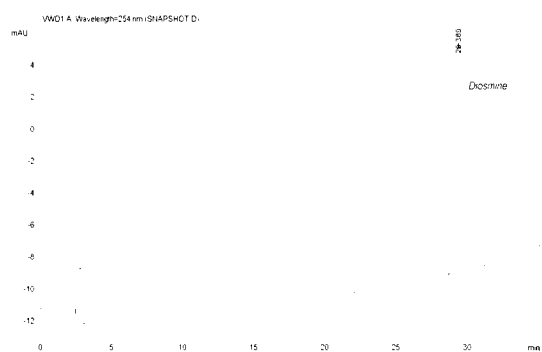
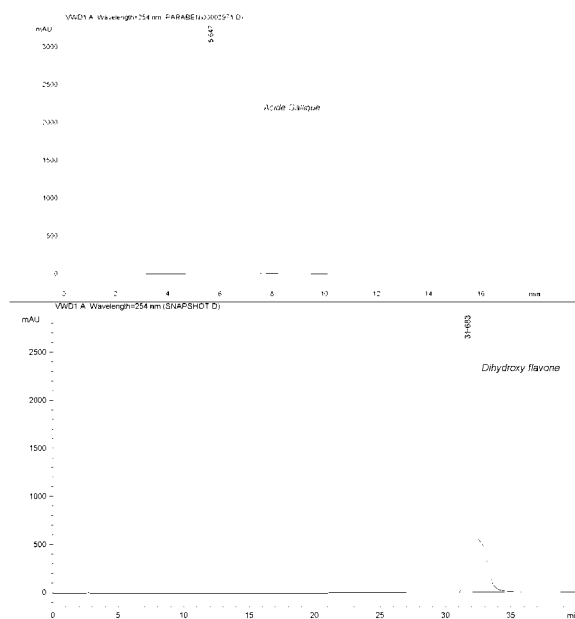
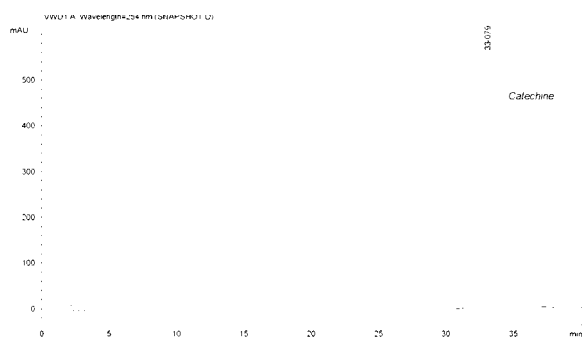
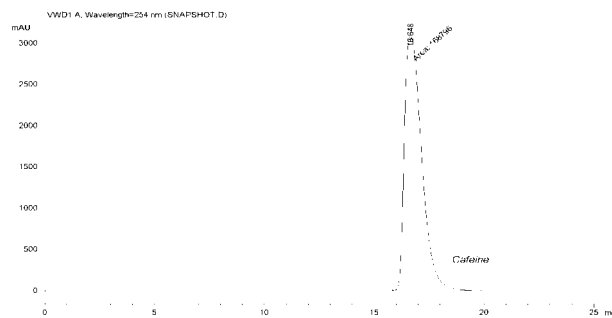
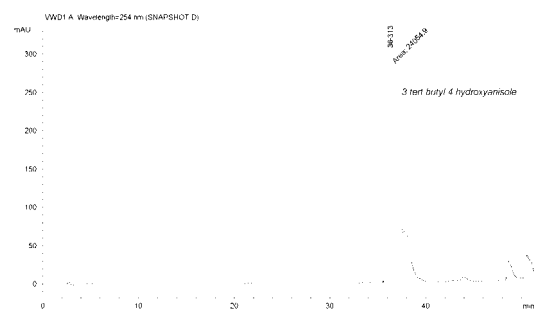
Annex 04

Les standard de HPLC :

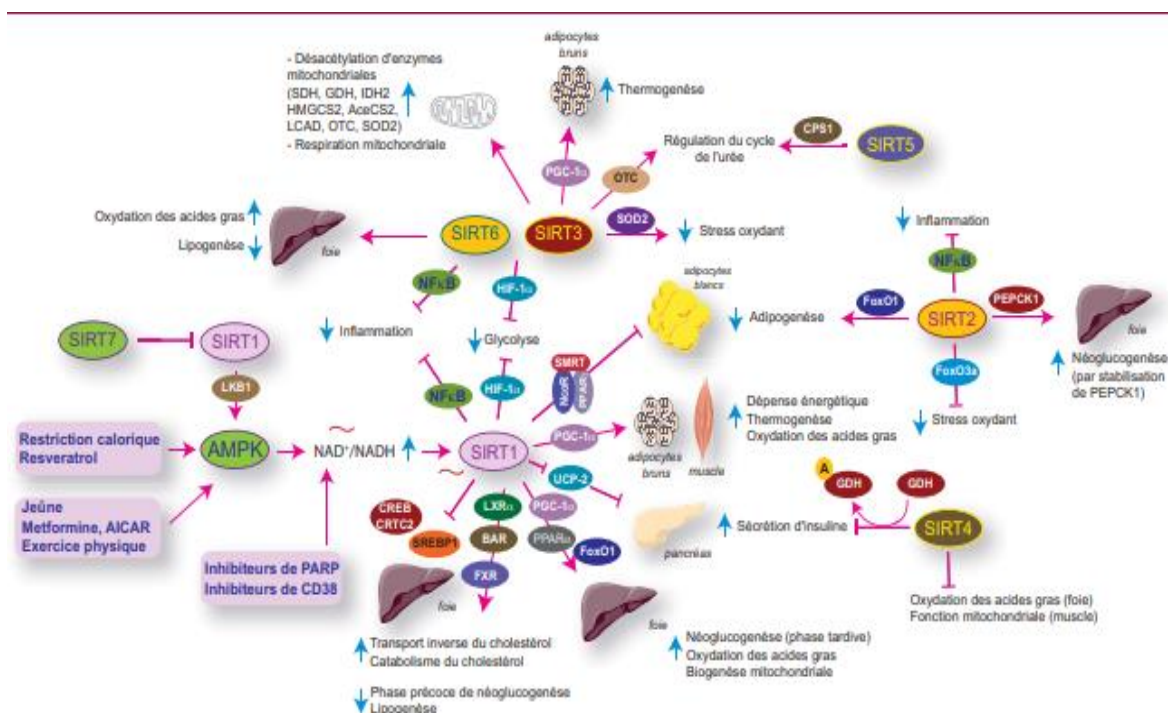








Annex 05



AMPK : kinase activée par l'AMP ; AICAR : 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide ; LKB1 : liver kinase B1 ; FXR : récepteur farnésioïde X ;
LXR : récepteur X du foie ; BAR : récepteur des acides biliaires ; SREBP1 : protéine de liaison à l'élément régulateur des stérols 1 ; CREB : protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique ; CRT2 : coactivateur transcriptionnel régulé par CREB 2 ; PARP : poly(ADP) ribose polymérase ; CD38 : cluster de différenciation 38 (hydrolase de l'ADP ribose cyclique) ; FoxO1 & FoxO3a : protéines forkhead box O1 et O3a ; PPARα & PPARγ : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes alpha et gamma ;
PGC-1α : coactivateur 1α du PPARγ ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; SIRT1 : déacétylase dépendante du NAD, sirtuine 1 ; UCP2 : protéine découplante 2 ;
NcoR1 : corépresseur des récepteurs nucléaires 1 ; SMRT (NcoR2) : médiateur silencieux des récepteurs aux rétinoïdes ou aux hormones thyroïdiennes ;
HIF-1α : facteur induit par l'hypoxie 1α ; GDH : glutamate déshydrogénase ; A-GDH : glutamate déshydrogénase ADP-ribosylée ;
SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; OTC : ornithine transcarbamylase ; CPS1 : carbamoyl phosphate synthétase 1 ; SDH : succinate déshydrogénase ; IDH : isocitrate déshydrogénase ; HMGCS2 : 3-hydroxy, 3-méthylglutaryl coenzyme A synthase 2 ;

AceCS2 : acétyl coenzyme A synthétase 2 ; LCAD : acyl-coenzyme A déshydrogénase spécifique aux longues chaînes ; NFκB : facteur nucléaire kappa B ;
PEPCK1 : phosphoénolpyruvate carboxykinase 1.
~ : régulation circadienne ; SIRT1 contrôle de manière oscillatoire la production de son coenzyme le NAD⁺ et contrôle l'expression des gènes circadiens.

Annexe 06

Pour la préparation des différentes concentrations d'éthanol (70°, 80°, 90°, 95°), à partir d'un éthanol de 96° pour déshydratation histologique, la dilution a été réalisée selon les valeurs du tableau de Gay-Lussac:

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	66,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
	15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64
	10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85

Tableau 14 : les valeurs du tableau de Gay-Lussac

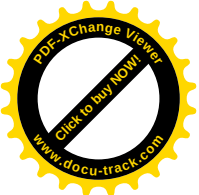
les volumes d'eau distillée ajoutés à 100 mL d'éthanol à 96° :

Tableau 15 : les valeur pour la dilution de acide éthylique

Concentration finale souhaitée (°)	Volume d'éthanol à 96° (mL)	Volume d'eau distillée à ajouter (mL)
70°	100	42.85
80°	100	22.45
90°	100	7.73
95°	100	1.25

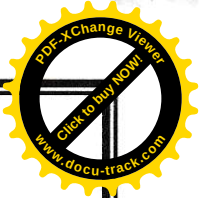
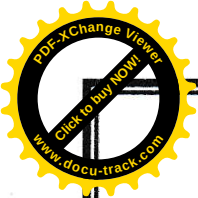
Annexe 07

Rang	Graines	Nom latin	Activités principales	Références abrégées	Commentaires
🏆 1	Nigelle	Nigella sativa	Antioxydante, anti-inflammatoire, hépatoprotectrice, antitumorale	(Alrashedy & Alqahtani, 2016 ; Ríos et al., 2020 ; Hamden et al., 2010)	Très polyvalente, bien documentée
2	Chardon-Marie	Silybum marianum	Hépatoprotectrice, antioxydante, antifibrosante, anti-cancer (silymarine)	(Křen & Walterová, 2005 ; Luper, 1998)	Référence clinique validée
3	Brocoli (graines germées)	Brassica oleracea	Antioxydante via Nrf2, détoxifiante enzymatique, anti-cancer hépatique (sulforaphane)	(Fahey et al., 1997 ; Mandal et al., 2015)	Forme germée indispensable
4	Fenugrec	Trigonella foenum-graecum	Hépatoprotecteur, antioxydant, hypoglycémiant, régénérant hépatocytaire	(Ríos et al., 2020 ; Hamden et al., 2010)	Intéressant pour foie + métabolisme glucidique
5	Ajowan	Trachyspermum ammi	Antioxydant, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire	(Jahan et al., 2017)	Moins connu, mais très prometteur
6	Carvi	Carum carvi	Antioxydant, détoxifiant hépatique	(Ríos et al., 2020 ; Jahan et al., 2017)	Données animales soutenues
7	Coriandre (graines)	Coriandrum sativum	Antioxydant, effet chélateur des métaux, hépatoprotecteur	(Choi et al., 2013 ; Patra et al., 2021)	Complémentaire dans les formulations
8	Persil (graines)	Petroselinum crispum	Antioxydant, hépatoprotecteur modéré	(Ríos et al., 2020 ;	Moins puissante mais utile en synergie



				Jahan et al., 2017)	
9	Céleri	Apium graveolens	Antioxydant, anti- inflammatoire, modulateur enzymatique	(Patra et al., 2021)	Peu d'études, mais résultats encourageants

Tableau 16 : Graines à effet hépatoprotecteur



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie



Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Développement d'un complément alimentaire à partir des
plantes médicinales

Présenté par M.: BEZARI Ikrame

CHERIF Mouna

Mme Lounaci L.
Mouna

Devant le Jury :

Mme ROUAKI F	MCA	SNV, Blida1	Présidente.
Mme LOUNACI L	MCB	SNV, Blida1	Examinatrice.
Mme MOKRANE A	MCA	SNV, UMMTO	Promotrice.
Melle NADJI S	PDG	Orpin Center, Blida	Co-Promotrice.
Mme Bechokra L	MCA	FSB-USTHB	Invité.

Session 2024 / 2025