



**UQAC**

Université du Québec  
à Chicoutimi

**Extraction enzymatique du myrique baumier (*Myrica gale* L) et évaluation de l'activité biologique des extraits**

Par Marie Dubreuil

Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en Maîtrise en ressource renouvelables

Québec, Canada

© Marie Dubreuil, 2023

## RESUMÉ

Les solvants organiques fréquemment utilisés pour extraire des composés à partir de matières premières végétales, tels que le chloroforme, l'hexane et le benzène, sont reconnus pour leurs effets nuisibles sur l'environnement et la santé humaine. Pour remédier à ces inconvénients, de nouvelles méthodes alternatives d'extraction écoresponsables, telles que l'extraction enzymatique, également connue sous le nom d'extraction aqueuse assistée par enzymes, ont été développées. Cette approche d'éco-extraction repose sur l'utilisation d'enzymes spécifiques qui dégradent les structures cellulaires, facilitant ainsi la libération des constituants de la matière végétale. L'extraction enzymatique présente plusieurs avantages, notamment l'emploi de conditions douces qui permettent de préserver les composés sensibles à la chaleur. De plus, cette méthode offre des rendements plus élevés. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi le myrique baumier (*Myrica gale* L). Cet arbuste aromatique est utilisé comme épice, thé, et autrefois, dans la fabrication de la bière. Le principal objectif de ce projet visait à évaluer le potentiel de l'extraction enzymatique sur *M. gale*, de tester leur activité biologique et de comparer les résultats avec l'extraction par solvant. Nous avons testé trois mélanges d'enzymes incluant : Celluclast 1.5 L, Viscozyme L et Pectinex Ultra SP-L. L'extraction enzymatique a été réalisée en milieu aqueux suivi par l'ajout d'huile végétale pour isoler les composés liposolubles. Conséquemment, pour chaque mélange d'enzyme, deux extraits sont obtenus l'un aqueux et l'autre huileux. Premièrement, les résultats montrent que les rendements d'extraction des extraits enzymatique aqueux sont supérieurs aux extractions aqueuses classiques et éthanoliques. Le mélange enzymatique Pectinex Ultra SP-L (*Aspergillus aculeatus*) à la concentration de 1% a permis d'obtenir le rendement le plus élevé. La concentration en composés phénoliques de cet extrait étaient également plus élevée que les extraits aqueux classiques et similaires aux extraits éthanoliques. L'activité antioxydante des extraits enzymatiques aqueux a été évaluée en utilisant le test ORAC et un essai cellulaire. Les résultats montrent que ceux-ci sont aussi actifs que les extraits éthanoliques. D'autre part, les activités antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits huileux ont été évaluées. Les extraits huileux obtenus à l'aide d'enzyme ont démontré une activité antibactérienne supérieure à ceux sans enzyme contre *Staphylococcus aureus*, alors que les extraits à l'heptane étaient inactifs. De plus, l'extrait huileux obtenu avec Pectinex (1%) a révélé une activité anti-inflammatoire supérieure à celle de l'extrait huileux sans enzyme, sans aucune toxicité. À notre connaissance, cette étude est la première à montrer l'activité anti-inflammatoire de *M. gale*. L'approche d'extraction à l'aide d'enzyme a permis d'obtenir des extraits aqueux riches en composés phénoliques et des extraits huileux riche en composés hydrophobes en une seule étape d'extraction. Cette méthode très prometteuse permettra de développer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée à partir de la biomasse forestière boréale.

**Mots clés :** *Myrica gale*, Extraction enzymatique, Phase aqueuse, Phase lipidique, Activité antioxydante, Activité anti-inflammatoire, Activité antibactérienne

## TABLE DES MATIÈRES

RESUMÉ .....	3
TABLE DES MATIÈRES .....	4
LISTES DES TABLEAUX.....	6
LISTES DES FIGURES.....	7
REMERCIEMENTS .....	9
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	10
1.1. Mise en contexte .....	11
1.2. Objectifs .....	15
CHAPITRE II. REVUE DE LITTÉRATURE.....	16
2.1. Description et écologie de <i>Myrica gale</i> .....	17
2.2. Utilisation traditionnelle.....	19
2.3. Propriétés pharmacologiques .....	21
CHAPITRE III. LA PUBLICATION .....	25
Extraction enzymatique du myrique baumier ( <i>Myrica gale</i> L) et évaluation de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes .....	25
3.1. Résumé.....	26
Antioxydant, anti-inflammatory and antibacterial activities of <i>Myrica gale</i> L. enzymatic extracts.....	27
3.2. Abstract .....	28
3.3. Introduction:.....	29
3.4. Materials and Methods .....	32
3.4.1. Plant material and chemicals.....	32
3.4.2. Enzymatic extraction using water and sunflower oil as alternative solvent.....	32
3.4.3. Aqueous-oil extraction without enzymes .....	33
3.4.4. Hydroalcoholic extraction .....	33
3.4.5. Methanolic extraction of the enzymatic sunflower oil extract.....	34
3.4.6. Enzymatic extraction with heptane addition.....	34
3.4.7. Total phenolic content .....	34
3.4.8. ORAC <sub>FL</sub> assay.....	35
3.4.9. Cell culture .....	35
3.4.10. Antioxidant cell assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA).....	36
3.4.11. Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification .....	36
3.4.12. Antibacterial assay—Hydrophobic.....	37
3.4.13. Statistical analysis.....	37

3.5. Results and discussion .....	38
3.5.1. Aqueous Extraction yield and total phenolic content.....	38
3.5.2. Evaluation of antioxidant activity using ORAC and Cell-based Assays.....	41
3.5.3. Evaluation of antibacterial activities on sunflower oil enzymatic extract.....	45
3.5.4. Evaluation of anti-inflammatory activities of enzymatic oil extracts .....	48
3.6. Conclusion.....	53
3.7. Acknowledgment .....	53
3.8. Supplementary material and method .....	54
3.9. Supplementary results .....	56
CHAPITRE IV. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	59
RÉFÉRENCES .....	63

## LISTES DES TABLEAUX

**TABLEAU 1 :** USAGE TRADITIONNEL DE *M. GALE* À TRAVERS LE MONDE

**TABLEAU 2 :** PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE *M. GALE*

**TABLE 3:** EXTRACTION YIELDS AND PHENOLIC COMPOUNDS WITH VARIOUS ENZYME CONCENTRATIONS COMPARED TO WATER (H<sub>2</sub>O) AND HYDROETHANOLIC EXTRACTION (ETOH-H<sub>2</sub>O)

**TABLE 4:** ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF VARIOUS ENZYME CONCENTRATIONS COMPARED TO WATER (H<sub>2</sub>O) AND HYDROETHANOLIC EXTRACTION (ETOH-H<sub>2</sub>O)

**TABLE 5:** COMPARISON OF YIELD, PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF HEPTANE EXTRACT AND METHANOLIC FRACTION OF THE ENZYMATIC SUNFLOWER OIL

**TABLE 6:** DETERMINATION OF THE MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF SUNFLOWER OIL EXTRACT AGAINST *S. AUREUS*

**TABLE 7:** COMPARISON OF LIPOPHILIC EXTRACTS IN THE INHIBITION OF NO OVERPRODUCTION

**TABLE 8:** COMPOSITION OF VOLATILE COMPOUNDS IN AN OIL EXTRACT OF *M. GALE* FROM THE SUNFLOWER OIL EXTRACT WITHOUT ENZYMATIC TREATMENT (0%) AND WITH PECTINEX ULTRA SP-L (AT A 1% CONCENTRATION)

**TABLE 9:** IDENTIFIED PHENOLIC COMPOUNDS IN PECTINEX ULTRA SP-L AT 1% CONCENTRATION EXTRACT

## LISTES DES FIGURES

**FIGURE 1 :** DISTRIBUTION DE *M. GALE* À TRAVERS LE MONDE

**FIGURE 2 :** FEUILLAGES ET CHATONS MÂLES DE *M. GALE*

**FIGURE 3:** EFFECT OF ENZYMES AT 1% CONCENTRATION ON BACTERIAL SURVIVAL OF *S. AUREUS* IN FUNCTION OF A GRADIENT OF SUNFLOWER OIL ENRICHED WITH *M. GALE*.

**FIGURE 4:** EFFECT OF OIL EXTRACTS FROM *M. GALE* ON CYTOTOXICITY AND ON NO OVERPRODUCTION IN LPS-STIMULATED RAW 264.7 MACROPHAGES

**FIGURE 5:** THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC) OF HEPTANE AND METHANOLIC EXTRACTS FROM *M. GALE*

**FIGURE 6:** CHEMICAL STRUCTURE OF COMPOUNDS 1 (GALLIC ACID), 2 (P-COUMARIC ACID) AND 5 (QUERCETIN)

**FIGURE 7:** UV SPECTRA OF IDENTIFIED COMPOUND IN THE PECTINEX ULTRA SP-L EXTRACT AT A 1% CONCENTRATION. GALLIC ACID (A), P-COUMARIC ACID (B), RUTIN (C) AND QUERCETIN (D)

## LISTE DES SIGLES

**°C** : DEGRÉ CELSIUS

**μG** : MICROGRAMME

**μL** : MICROLITRE

**μM** : MICROMÈTRE

**μM** : MICROMOLAIRE

**μMOL** : MICROMOLE

**AAPH** : 2,2-AZOBIS (2-MÉTHYL-PROPIONAMIDE) DIHYDROCHLORIDE

**A-549** : LIGNÉE CELLULAIRE DE CARCINOME PULMONAIRE HUMAIN

**CM** : CENTIMÈTRE

**CMI<sub>90</sub>** : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE À 90%

**DCFH-DA** : 2',7'-DICHLOROFLUORESCÉINE DIACÉTATE

**EC** : CLASSIFICATION ENZYME COMMISSION

**EAE** : EXTRACTION ASSISTÉE PAR ENZYMES

**EtOH** : ÉTHANOL

**H<sub>2</sub>O** : EAU

**IC<sub>50</sub>** : CONCENTRATION INHIBITRICE À 50%

**Km<sup>2</sup>** : KILOMÈTRES CARRÉS

**L-NAME** : NΩ-NITRO-L-ARGININE MÉTHYL ESTER CHLORHYDRATE

**LPS** : LIPOPOLYSACCHARIDES

**M. GALE** : *MYRICA GALE* LINNÉ

**MIC<sub>90</sub>** : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE À 90%

**MYB** : MYRIGALONE B

**NAHCO<sub>3</sub>** : BICARBONATE DE SODIUM

**NO** : OXYDE NITRIQUE

**ORAC** : CAPACITÉ D'ABSORPTION DES RADICAUX OXYGÉNÉS

**RAW 264.7** : LIGNÉE CELLULAIRE DE MACROPHAGES MURINS

**RPM** : ROTATIONS PER MINUTES

**TE** : TROLOX ÉQUIVALENT

**WS1** : FIBROBLASTE HUMAIN DE LA PEAU



## REMERCIEMENTS

Ma maîtrise a marqué une étape déterminante dans mon cheminement académique, et je tiens à remercier ceux qui ont contribué à cette expérience. Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Professeur Jean Legault, et mon codirecteur, le Professeur André Pichette, pour m'avoir ouvert les portes de cette passionnante aventure de recherche. Mes remerciements s'adressent également aux Professeurs Serge Lavoie et Vakthang Mshvildadze pour leurs échanges constructifs qui ont contribué à l'avancement de mes travaux. Au sein de l'équipe du laboratoire, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Catherine Dussault et Karl Lalancette pour leur expertise en matière de culture cellulaire et d'activités biologiques, ainsi que pour leur disponibilité lors de mes interrogations. Un grand merci à Héroïse Coté, Audrey Bélanger et Jessica Fortin-Mimeault d'avoir contribué à l'ambiance collaborative au sein du laboratoire. Merci à Laurie Girard pour les moments agréables et les discussions enrichissantes que nous avons eues. Une mention spéciale à Klara Michalsky pour ses compétences et sa collaboration, qui ont joué un rôle important dans les résultats prometteurs que nous avons aujourd'hui.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le laboratoire Phytochemia pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mon stage de fin d'études au sein de leur équipe, une expérience qui s'est avérée fortement enrichissante. Je tiens à remercier chaleureusement Alexis St-Gelais pour son enseignement exceptionnel en phytochimie, ainsi que Hubert Marceau, Laurie Caron, Sylvain Mercier, Rachelle Fontaine et tous les autres membres de l'équipe pour leurs accueils et leurs contributions à mon parcours académique. Merci à Benoit Roger pour avoir stimulé mes réflexions et pour m'avoir permis de distiller une huile essentielle chez Alchemia Solution.

Enfin, j'ai une pensée pour mon entourage. Je tiens particulièrement à remercier mon cher papa, mon époux Colin Bouchard, et mes amis pour leurs encouragements, leur présence et leur confiance en mes capacités qui ont été une source de motivation tout au long de mon parcours.

## CHAPITRE I. INTRODUCTION

## 1.1. Mise en contexte

La forêt boréale du Canada est une vaste région riche en ressources renouvelables, s'étendant sur un territoire de plus de 3,47 millions de km<sup>2</sup> (Statistique Canada 2020). Elle renferme de nombreuses espèces de plantes médicinales utilisées depuis des siècles dans les traitements traditionnels autochtones. Plus de 546 taxons utilisés par les peuples indigènes de cette région pour traiter 27 catégories de maladies ont été recensés par Uprety *et al.* (2016). Cette richesse végétale, associée à leur large gamme d'applications médicinales, suggère un potentiel intéressant de la forêt boréale canadienne pour la recherche et le développement de bioproduits (Wetzel *et al.* 2006). Les méthodes d'extraction couramment employées comportent toutefois des inconvénients, car elles requièrent l'utilisation de quantités importantes de solvants organiques lesquels peuvent être nocifs pour l'environnement et la santé humaine (Wypych 2019). En effet, les solvants organiques sont largement utilisés dans de nombreux processus industriels. Ils représentent près de 60 % de toutes les émissions industrielles à l'échelle mondiale. (Anastas et Eghbali 2010). De plus, les techniques d'extraction conventionnelles entraînent des temps d'extraction prolongés, des rendements d'extraction parfois faible, une production de déchets importants et une qualité d'extrait inférieure en raison de la présence inévitable de traces de solvants organiques (Grodowska et Parczewski 2010). En raison de ces préoccupations et de l'intérêt croissant pour la chimie verte, plusieurs chercheurs se concentrent désormais sur des procédures alternatives d'extraction écoresponsables pour contrecarrer les inconvénients des méthodes conventionnelles (Fraterrigo Garofalo *et al.* 2021). Parmi les méthode d'éco-extraction disponibles, on peut citer : l'extraction par fluide supercritique (S-CO<sub>2</sub>), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (UAE) et l'extraction assistée par enzymes (EAE) (Sik *et al.* 2020). Cette dernière suscite un intérêt croissant, car les enzymes sont déjà largement adoptées à grande échelle dans de nombreuses industries telles que le textile, le pharmaceutique et la pâte à papier. Les enzymes sont également

utilisées dans le domaine alimentaire pour diverses applications, notamment le traitement du jus et la clarification de la bière et du vin (Puri *et al.* 2012).

L'EAE dépend de la propriété unique des enzymes à catalyser des réactions chimiques avec une spécificité et une sélectivité précise (Pinelo *et al.* 2006). Les polysaccharides présents dans les parois cellulaires des végétaux, composés principalement de cellulose, d'hémicellulose et de pectine, réduisent l'efficacité de l'extraction (Nadar *et al.* 2018). À titre d'exemple, la cellulose, un glucane linéaire composé d'unité de glucose liée par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1, 4, est difficile à dégrader en raison de son insolubilité et de la structure cristalline de ses microfibrilles (Dominguez et Muñoz 2017). Or, le groupe d'enzymes des glycosidases (EC 3.2.1<sup>1</sup>) qui comprend des enzymes comme les cellulases (EC 3.2.1.4), les xylanases (EC 3.2.1.8) et les pectinases comme les endo-polygalacturonase (EC 3.2.1.15), permettent la dégradation des composants de la paroi cellulaire afin de libérer plus efficacement les produits bioactifs recherchés de la matrice (Pinelo *et al.* 2006; Gligor *et al.* 2019). Cette méthode permet de convertir les composés bioactifs insolubles, initialement fixés à la paroi matricielle, pour les rendre solubles dans un milieu aqueux (Wijesinghe et Jeon 2012). Sous conditions optimales, cette méthode d'extraction alternative offre des rendements d'extraction élevés pour des composés tels que les polyphénols, les protéines, les huiles, les pigments naturels ainsi que divers composés médicinaux (Yang *et al.* 2010; Puri *et al.* 2012; Nadar *et al.* 2018). Parmi les avantages, l'opération est simplifiée et le procédé est plus efficace au niveau énergétique, similaire aux autres technologiques d'extraction alternatives (Hammed *et al.* 2013). Cette technologie respecte les principes d'éco-extraction, qui favorisent l'utilisation de procédés plus verts et durables, en se déroulant à une température douce et en utilisant l'eau comme principal solvant (Puri *et al.* 2012;

---

<sup>1</sup> La nomenclature EC (*Enzyme Commission Numbers*) est un système international utilisé pour classer les enzymes en fonction de leur activité catalytique. Chaque numéro EC est composé de quatre chiffres, séparés par des points représentant chacun une étape dans la précision de la classification d'enzymes.

Chemat et al. 2019). Ces principes incluent la réduction de l'emploi de solvants toxiques, la minimisation de la consommation énergétique et la maximisation de l'efficacité d'extraction. De plus, les extraits obtenus ne contiennent pas de solvant résiduel, se conservent mieux, et leurs propriétés intrinsèques sont moins altérées (Muniglia 2014). Un avantage supplémentaire de cette méthode est qu'elle permet de produire des huiles végétales sans recourir à l'utilisation de solvants dommageable comme l'hexane. Cet hydrocarbure aliphatique est couramment utilisé pour l'extraction des huiles végétales commerciales (Rosenthal *et al.* 1996).

Le progrès des préparations commerciales, la disponibilité et la diversité des enzymes ont ouvert la voie à de nombreux développements industriels (Mesbah 2022). À titre d'exemple, la société Biolie, basée à Nancy en France, a développé une méthode d'extraction enzymatique innovante qui permet de séparer les différents composants des matières végétales et d'extraire les molécules d'intérêt (Muniglia 2011). Cette technologie française permet de produire plusieurs types d'extraits en une seule opération (phase lipidique, extrait aqueux et tourteau) sans produire de déchets grâce à une bioconversion naturelle (Muniglia 2020). Selon la nature de la matière première, cette technologie nécessite parfois, bien que pas systématiquement, l'utilisation d'une phase lipidique d'origine naturelle, telle que les huiles végétales. Cette approche conduit à l'obtention d'un extrait aqueux riche en composés hydrophiles ainsi qu'à un extrait lipidique ou huileux contenant des composés hydrophobes. D'une part, l'extrait aqueux peut présenter un intérêt en raison de sa richesse en protéines, sucres fermentescibles, polyphénols et polysaccharides (Muniglia *et al.* 2014). D'autre part, l'huile végétale enrichie, riche en composés apolaires, stérols et tocophérols, peut être directement utilisée comme ingrédient dans la composition de bioproduits agronomiques, alimentaires et cosmétiques. (Yara-Varón *et al.* 2017; Portillo-López *et al.* 2021). L'intérêt croissant pour les huiles végétales réside dans leur capacité à remplacer les solvants issus du pétrole en raison de leur caractère biodégradable, non volatil, d'origine agricole, leur facilité de production et leur viabilité économique (Yara-Varón *et al.* 2017).

De plus, le tourteau peut également être valorisé à des fins agronomiques, voire cosmétiques. Par exemple, le tourteau issu de l'extraction enzymatique des graines de sapin blanc (*Abies Alba*) est utilisé comme exfoliant pour la peau, par la société Biolie (Muniglia 2020). Cette méthode, qui peut être mise en œuvre à grande échelle, s'applique à tous les types de matières végétales.

Dans le cadre de cette étude, le choix s'est porté sur le myrique baumier (*Myrica gale* L.). Présentée dans le chapitre II, cette plante révèle un potentiel considérable pour démontrer les capacités de développement de bioproduits aqueux et à base d'huiles végétales obtenus par l'extraction assistée par des enzymes. À notre connaissance, notre étude constitue la première exploration des extraits enzymatiques du myrique baumier.

Dans le cadre de ce projet de recherche, trois préparations d'enzymes commerciales produites par l'entreprise Novozymes (Danemark) ont été utilisées : Celluclast® 1,5 L (*Trichoderma reesei*) une enzyme de type cellulase, Pectinex Ultra SP-L (*Aspergillus aculeatus*) un mélange de pectinases, hemicellulases et  $\beta$ -glucanases et Viszoyme L, (*Aspegillus aculeatus*) un mélange d'arabanase,  $\beta$ -glucanase, hemicellulase et xylanase. L'huile de tournesol a été sélectionnée comme phase lipidique en raison de sa capacité à capturer et à solubiliser une plus grande quantité de composés apolaire par rapport à d'autres huiles étudiées telles que l'huile de pépins de raisin, l'huile d'arachide, l'huile d'olive et l'huile de colza (Li *et al.* 2014; Goula *et al.* 2017). De plus, cette huile présente un intérêt pour le secteur cosmétique car elle est non comédogène pour la peau (Simion 2001).

## 1.2. Objectifs

Le principal objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel des fractions aqueuses et huileuses obtenues par l'extraction enzymatique du myrique baumier en utilisant trois mélanges d'enzymes commerciales (Celluclast 1.5 L, Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L).

Les objectifs secondaires de ce projet sont les suivants :

- Effectuer des extractions enzymatiques, en utilisant de l'huile de tournesol comme phase lipidique.
- Comparer les extraits obtenus par extraction enzymatique avec ceux issus de méthodes conventionnelles impliquant l'utilisation de solvants comme l'eau, l'éthanol et l'heptane.
- Évaluer l'activité biologique des extraits incluant l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne.

## CHAPITRE II. REVUE DE LITTÉRATURE



## 2.1. Description et écologie de *Myrica gale*

Le myrique baumier (*Myrica gale* Linneus) est un arbuste aromatique (1-2 mètres) largement répandu dans les régions septentrionales de l'hémisphère nord (Figure 1). Distribué de l'Alaska jusqu'aux provinces maritimes et dans le nord-est des États-Unis, le *M. gale* est également présent en Europe occidentale et à l'Asie du Nord-Est (Small and Catling 2007). Plusieurs noms communs sont employés pour le décrire : Sweet gale, bog-myrtle en anglais ou encore le piment royal, le bois-sent-bon et le myrte des marais. Cette plante appartient à la famille des Myricacées (Myricaceae), qui compte quatre genres et cinquante-cinq espèces d'arbustes de l'ordre des Fagales. Au Québec, le myrique baumier constitue l'unique espèce du genre *Myrica*. Cette plante est spécifique des sols acides et marécageux, notamment des milieux riverains comme les tourbières, les marais et le long des bords de lacs, des étangs et des ruisseaux (Lapointe 2015).



**Figure 1** : Distribution de *Myrica gale* à travers le monde (Small et Catling 2007)

Cette espèce est dioïque, les fleurs printanières (1-2 cm) appelées chatons (épis cylindriques) sont portées séparément sur les plants mâles ou femelles (Lloyd 1981). Les feuilles (2-6 cm x 2 cm), sont oblancéolées, dentelées et marquées par des points résineux (Figure 2). Le fruit est une polydrupe résineuse (Marie-Victorin 1995). Le *M. gale* se propage de manière végétative à la fois par stratification et par drageons racinaires créant ainsi de grands îlots denses qui s'étendent sur l'eau du rivage (Payette 2013). Le *M. gale* est reconnue pour sa capacité à prospérer sur les sols moins fertiles et de former des nodules analogues à ceux de la famille des Fabacées (légumineuses). Les racines du myrique baumier, abritant des actinobactéries du genre *Frankia* (Frankiaceae), confèrent à *M. gale* la capacité de fixer des quantités substantielles d'azote, pouvant aller jusqu'à 24-34 kg/ha (Simpson *et al.* 1996; Baker et Parsons 1997) La caractéristique du *M. gale* à fixer l'azote atmosphérique est unique parmi les arbustes de tourbières (Schwintzer 1983).



**Figure 2 :** Feuillage et chatons mâles de *Myrica gale*

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myrica-gale-foliage-male-catkins.jpg>)

## 2.2. Utilisation traditionnelle

Pendant des siècles, le myrique baumier a été récolté à l'état sauvage et utilisé de multiples façons, comme en témoigne le Tableau 1. Traditionnellement en Europe, les infusions des feuilles et des fruits de *M. gale* étaient utilisés pour traiter divers problèmes médicaux, notamment les ulcères, les vers intestinaux, les troubles cardiaques et les douleurs musculaires (Svoboda *et al.* 1998; Small 2013). Des études ethnobotaniques indiquent que dans l'ancienne Irlande, cette plante, considérée comme sacrée et porteuse de bonne fortune, était utilisée pour traiter la rougeole, la toux, les maux de gorge ainsi que les troubles rénaux et urinaires (Allen et Hatfield 2004; Nagar *et al.* 2023). Des découvertes archéologiques réalisées dans divers sites à travers l'Europe attestent de l'utilisation du myrique baumier en brasserie depuis le début du Moyen Âge (Behre 1999). À cette époque, cette plante était plus répandue que le houblon en tant qu'ingrédient pour aromatiser la bière. Encore aujourd'hui, cette espèce est utilisée dans la production de boisson alcoolisée. Brassé depuis le 19<sup>e</sup> siècle au Danemark, le « Aalborg Porse Snaps » est une liqueur traditionnelle aromatisée aux feuilles de myrique baumier (Simpson *et al.* 1996).

Les Autochtones d'Amérique du Nord ont aussi utilisé le myrique baumier de manière limitée. La tribu Bella Coola infusait des branches pour ses effets diurétiques et pour traiter la gonorrhée (Turner 1983). Les branches de *M. gale* étaient brûlées par les Potéouatamis (Mississippi) pour éloigner les insectes, tandis que la plante entière était utilisée comme conservateur alimentaire pour empêcher les baies de moisir. La tribu Ojibwée utilisait les branches et les graines bouillies pour produire des pigments brun et jaune, respectivement (Smith 1933). Les Cris, un peuple algonquiens, utilisaient les chatons pistillés comme composant dans la fabrication de leurres pour la chasse et la pêche (Leighton 1985).

**Tableau 1 : Usage traditionnel de *M. gale* à travers le monde**

Usages	Nations	Références
Trouble d'estomac	Asie (Chine), Europe (Écosse)	(Svoboda <i>et al.</i> 1998; Skene <i>et al.</i> 2000)
Trouble cardiaque	Europe (Scandinavie et Grande Bretagne)	(Svoboda <i>et al.</i> 1998)
Vers intestinaux	Europe (Suède, France)	(Skene <i>et al.</i> 2000; Small 2013)
Traiter les ulcères	Europe (Grande Bretagne)	(Small 2013)
Douleur musculaire	Europe (Grande Bretagne)	(Small 2013)
Effet diurétique	Amérique du Nord (Bella Coola)	(Smith 1933)
Anti-gonorrhée	Amérique du Nord (Bella Coola)	(Turner 1983)
Traitement de la rougeole	Europe (Irlande)	(Allen and Hatfield 2004; Nagar <i>et al.</i> 2023)
Toux et maux de gorge	Europe (Irlande)	(Allen and Hatfield 2004; Nagar <i>et al.</i> 2023)
Troubles rénaux et urinaires	Europe (Irlande)	(Allen and Hatfield 2004; Nagar <i>et al.</i> 2023)
Emménagogue et abortif	Europe	(Skene <i>et al.</i> 2000)
Brassage de la bière	Europe (Scandinavie, Grande-Bretagne, Allemagne)	(Behre 1999)
Épices (soupes et ragout)	Europe	(Crellin 1994; Skene <i>et al.</i> 2000)
Spiritueux	Europe (Danemark, Norvège)	(Simpson <i>et al.</i> 1996)
Tisane	Asie (Chine), Amérique du Nord (Terre-Neuve-et-Labrador) et Europe	(Crellin 1994; Svoboda <i>et al.</i> 1998; Skene <i>et al.</i> 2000)
Préservation alimentaire	Amérique du Nord (Potéouatamis)	(Smith 1933)
Traitement de la gale	Europe (Pays non précisé)	(Skene <i>et al.</i> 2000; Smith <i>et al.</i> 2008)
Traitement de l'eczéma	Europe (Pays non précisé)	(Skene <i>et al.</i> 2000; Smith <i>et al.</i> 2008)
Parfumer le lin	Europe (Scandinavie et Grande Bretagne)	(Skene <i>et al.</i> 2000)
Répulsif à insectes	Europe (Scandinavie, Grande-Bretagne) et Amérique du Nord (Potéouatamis)	(Smith 1933; Simpson <i>et al.</i> 1996; Nagar <i>et al.</i> 2023)
Pigment jaune et brun	Amérique du Nord (Ojibwés) et Écosse	(Smith 1933)
Ingrédient dans les leurres	Amérique du Nord (Cri des bois)	Leighton, 1985)

### 2.3. Propriétés pharmacologiques

Le myrique baumier possède plusieurs propriétés biologiques comme le montre le Tableau 2. Les huiles essentielles de *M. gale* possède des activités antibactériennes contre plusieurs bactéries pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) (Krogsbøll *et al.* 2016; Ložienė *et al.* 2020; Wawrzyńczak *et al.* 2021). Les huiles essentielles provenant d'Europe ont des propriétés antifongiques contre de nombreuses souches de levures, notamment *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* (Ložienė *et al.* 2020; Wawrzyńczak *et al.* 2021). Elles ont également une action contre des champignons connus pour altérer les aliments tels que *Cladosporium cladosporioides*, *Byssosclamyces fulva*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium expansum* et *Penicillium corylophilum* (Popovici *et al.* 2008). Selon Popovici (2008), cette activité antimicrobienne peut probablement être expliquée par les principaux composés présents dans l'huile essentielle, en particulier l' $\alpha$ -pinène, le 1,8- cinéole et  $\alpha$ -phellandrène. De plus, la capacité de *M. gale* à conserver la bière a été partiellement attribuée à ses flavonoïdes, qui ont montré une activité contre les bactéries à Gram positif (Malterud et Faegri 1982; Simpson *et al.* 1996).

**Tableau 2 : Propriétés biologiques de *Myrica gale***

Activités	Extrait	Pays d'origine	Références
Antibactérienne	Huile essentielle et hydrolat des feuilles et des fleurs	Pologne	(Wawrzyńczak <i>et al.</i> 2021)
	Huile essentielle de fruits	Lituanie	(Ložienė <i>et al.</i> 2020)
	Extrait au dichlorométhane	Danemark	(Krogsbøll <i>et al.</i> 2016)
Antifongique	Huile essentielle des feuilles et fruits	Pologne	(Wawrzyńczak <i>et al.</i> 2021)
	Huile essentielle de fruits	Lituanie	(Ložienė <i>et al.</i> 2020)
	Huile essentielle de fruits	France	(Popovici <i>et al.</i> 2008)
	Un flavanol glycoside (kaempferol-3-(2,3-diacetoxy-4-p-coumaroyl) rhamnoside) isoler à partir des feuilles	Ecosse	(Carlton <i>et al.</i> 1992)
Insectifuge	Huile essentielle couplé à l'acide salicylique	Angleterre	(Blackwell <i>et al.</i> 2003)
	Huile essentielle de feuilles	Angleterre	(Stuart 1998)
Antioxydante	Extrait à l'éther diéthylique de l'exsudat des fruits	Norvège	(Mathiesen <i>et al.</i> 1995)
	Un dihydrochalcones C-méthylées (Myrigalone B) isolé à partir des fruits	Norvège	(Mathiesen <i>et al.</i> 1995)
	Extrait à l'eau chaude et à l'éthanol	Canada	(Sekhon-Loodu and Rupasinghe 2019)
Cytotoxique	Huile essentielle des feuilles	Canada	(Sylvestre <i>et al.</i> 2005)
	Un cyclo-diarylheptanoïde (Galeon) isolé à partir des tiges	Norvège	(Rahman <i>et al.</i> 2020)
Antidiabétique	Extrait à l'eau chaude et à l'éthanol	Canada	(Sekhon-Loodu and Rupasinghe 2019)
Anti-obésité	Extrait à l'eau chaude et à l'éthanol	Canada	(Sekhon-Loodu and Rupasinghe 2019)
Antiviral	Macération d'eau et d'alcool éthylique	Angleterre	(Chantrill <i>et al.</i> 1952)

Les huiles essentielles de *M. gale* ont une activité insectifuge démontrée contre deux espèces de moustiques, *Aedes aegypti* et *Culicoides impunctatus* (Stuart 1998; Blackwell *et al.* 2003). Des recherches réalisées au laboratoire LASEVE de l'Université du Québec à Chicoutimi, ont démontrés que les huiles essentielles de *M. gale* présentent une activité cytotoxique contre deux lignées de cellules tumorales, soit celle du carcinome pulmonaire humain (A549) et de

l'adénocarcinome du côlon humain (DLD1), en raison de la présence de plusieurs sesquiterpènes (Sylvestre *et al.* 2005). L'alpha-humulène, qui est l'un de ces composés, a aussi montré une activité contre d'autres lignées cellulaires tumorales, notamment celles du carcinome hépatocellulaire (HepG2 et Hep3B) (Chen *et al.* 2019). De plus, une molécule appelée "Galeon," un cyclo-diarylheptanoïde qui a initialement été isolé à partir des tiges de *M. gale*, est connue pour sa cytotoxicité envers la lignée de carcinome pulmonaire A549 ainsi que de nombreuses souches de cellules cancéreuses (HL-60, HeLa, HepG2, T47D, MC7, HCT15) (Malterud *et al.* 1976; Rahman *et al.* 2020). Cette molécule a également démontré des effets thérapeutiques *in vitro* contre la tuberculose (Ting *et al.* 2014).

Les propriétés antioxydantes des extraits aqueux et éthanoliques de *M. gale* ont également été rapportées et expliquées par la présence de composés phénoliques (Sekhon-Loodu et Rupasinghe 2019). Les effets antioxydants de l'exsudat de fruits de *M. gale* et des dihydrochalcones C-méthylées, une classe de flavonoïdes très rares, isolés de cet exsudat ont été examinées sur des hépatocytes et des mitochondries hépatiques de rats. Parmi les molécules antioxydantes isolées, le myrigalone B (MyB) inhibe la peroxydation lipidique dans les hépatocytes ( $IC_{50}$  de  $23 \pm 1 \mu M$ ), et dans les mitochondries ( $IC_{50}$  de  $5,2 \pm 0,1 \mu M$ ) (Mathiesen *et al.* 1995). Le MyB et l'extrait de fruit ont montré un effet antioxydant dans plusieurs autres modèles *in vivo* (Mathiesen *et al.* 1995). Par exemple, le MyB neutralise la peroxydation lipidique dans les lipoprotéines de basse densité (LDL) chez l'homme et chez les lapins nourris au cholestérol (Wang *et al.* 1995; Mathiesen *et al.* 1996). Cette activité suggère un rôle potentiel pour le MyB dans la prévention de l'athérosclérose, une maladie causée par l'accumulation de dépôts gras à la surface interne des artères (Wang *et al.* 1995).

Des propriétés antidiabétiques ont également été observées. Un extrait éthanolique de *M. gale* s'est avéré particulièrement efficace pour inhiber l' $\alpha$ -amylase ( $IC_{50} = 62 \text{ mg/L}$ ) et l' $\alpha$ -glycosidase ( $IC_{50} = 27 \text{ mg/L}$ ) (Sekhon-Loodu et Rupasinghe 2019). L'inhibition de ces enzymes

est l'une des principales approches pour gérer l'hyperglycémie chez les patients atteints de diabète de type 2. L'extrait a démontré une capacité à réduire la formation de produits de glycation avancée (AGEs) avec une  $IC_{50}$  de 70.4 mg/L. Les résultats de cette étude révèlent également des effets bénéfiques de *M. gale* contre l'obésité. Les résultats obtenus avec les adipocytes cultivés *in vitro* de la lignée cellulaire 3T3-L1 ont montré que l'extrait éthanolique de *M. gale* inhibe significativement l'adipogenèse de 54,8 % (Sekhon-Loodu et Rupasinghe 2019).

Une activité antivirale a aussi été détectée sur un extrait obtenu en macérant des parties fraîches de la plante dans une solution composée d'eau et d'alcool éthylique. L'extrait a montré une capacité d'inhibition directe sur le virus de la grippe (Influenza A). Selon les auteurs, cette activité antivirale semble être étroitement liée à la présence de tanins dans les extraits (Chantrill *et al.* 1952).



### **CHAPITRE III. LA PUBLICATION**

Extraction enzymatique du myrique baumier (*Myrica gale* L) et évaluation de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes

### 3.1. Résumé

Les enzymes sont couramment utilisées par l'industrie alimentaires pour les extractions car elles permettent d'augmenter les rendements tout en évitant des conditions opérationnelles sévères. Bien qu'il y ait eu des résultats positifs dans l'industrie alimentaire, peu d'études ont exploré l'utilisation de l'extraction enzymatique écoresponsable pour extraire des espèces végétales indigènes. L'objectif de ce projet était d'évaluer le potentiel des extraits obtenus par extraction enzymatique de *M. gale*. Les parties aériennes de la plante ont été extraite en milieu aqueux à l'aide de trois préparations enzymatiques commerciales différentes incluant : Celluclast 1.5 L, Viscozyme L et Pectinex Ultra SP-L. Par la suite, de l'huile de tournesol a été ajoutée afin d'extraire les composés lipophiles. Conséquemment, deux extraits sont obtenus pour chaque condition l'un aqueux et l'autre huileux. Les résultats pour les extraits aqueux montrent que la présence d'enzyme augmente le rendement d'extraction comparativement à l'utilisation de solvants seuls comme l'eau et/ou l'éthanol. L'extrait obtenu avec l'enzyme Pectinex Ultra SP-L 1% a montré une concentration plus élevée en composés phénoliques en comparaison avec l'extraction aqueuse et similaire aux extraits hydroéthanoliques. L'activité antioxydante suit la même tendance. D'autre part, l'activité antibiotique et anti-inflammatoire des extraits huileux a été évaluée. Les résultats montrent que le mélange d'enzyme Pectinex Ultra SP-L possède des propriétés antibiotiques avec une concentration minimale inhibitrice (CMI<sub>90</sub>) de  $11 \pm 2\%$  (v/v) contre *Staphylococcus aureus* alors que l'extrait huileux sans enzyme est inactif (CMI<sub>90</sub> > 100 (v/v)). De plus, cet extrait montre une activité anti-inflammatoire sur un modèle de cellule RAW 264.7 stimulé avec le LPS. Il inhibe la production d'oxyde nitrique avec une IC<sub>50</sub> de  $4,4 \pm 0,9\%$  (v/v) comparativement à une IC<sub>50</sub> de  $9 \pm 3\%$  (v/v) pour l'extrait huileux sans enzyme. À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer l'activité anti-inflammatoire de *M. gale*.

**Antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of *Myrica gale* L.  
enzymatic extracts**

Marie Dubreuil, André Pichette and Jean Legault\*

**Affiliation**

Centre de recherche sur la Boréale (CREB), Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555, boulevard de l'Université, Chicoutimi, Québec Canada, G7H 2B1

**\*Corresponding author**

E-mail: [jean.legault@uqac.ca](mailto:jean.legault@uqac.ca)

Phone: +1-418-545-5011 ext. 2334

Fax: +1-418-545-5012

### 3.2. Abstract

Enzymes are commonly used by the food industry for extractions because they increase yields while avoiding severe operational conditions. Although there have been positive results in the food industry, few studies have explored the use of eco-responsible enzyme extraction to extract native plant species. The objective of this project was to evaluate the potential of extracts obtained by enzymatic extraction of *M. gale*. The aerial part of the plant was extracted in aqueous medium using three different commercial enzymatic preparations including Celluclast 1.5 L, Viscozyme L and Pectinex Ultra SP-L. Subsequently, sunflower oil was added to extract the lipophilic compounds. Consequently, two extracts are obtained for each condition one aqueous and the other oily. The results for aqueous extracts show that the presence of enzyme increases the extraction yield compared to the use of solvents alone such as water and/or ethanol. The extract obtained with the enzyme Pectinex Ultra SP-L 1% showed a higher concentration of phenolic compounds compared with aqueous extraction and similar to hydroethanolic extracts. Antioxidant activity follows the same trend. On the other hand, the antibiotic and anti-inflammatory activity of oil extracts was evaluated. The results show that the enzyme mixture Pectinex Ultra SP-L has antibiotic properties with a minimum inhibitory concentration (MIC<sub>90</sub>) of 11 ± 2% (v/v) against *Staphylococcus aureus* while the oil extract without enzyme is inactive (MIC<sub>90</sub> > 100 (v/v)). In addition, this extract shows anti-inflammatory activity on a RAW 264.7 cell model stimulated with LPS. It inhibits the production of nitric oxide with an IC<sub>50</sub> of 4.4 ± 0.9% (v/v) compared to an IC<sub>50</sub> of 9 ± 3% (v/v) for the oil extract without enzyme. To our knowledge, this study is the first to show the anti-inflammatory activity of *M. gale*.

### 3.3. Introduction:

The extraction techniques commonly used in the industry employ large quantities of organic solvents, such as hexane and dichloromethane, which have damaging effects on the environment and human health. In addition, these methods require prolonged extraction times and generate chemical waste (Garlantézec *et al.* 2009; Puri *et al.* 2012). Therefore, there is a growing need for new methods to extract diverse phytochemicals. Recent trends in extraction technology have prompted the scientific community to explore sustainable techniques that are more environmentally friendly, adhering to the principles of eco-extraction. A green *extraction*, such as supercritical CO<sub>2</sub> extraction, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, enzymatic extraction, and high-pressure-assisted extraction, is based on the discovery and design of extraction processes which will reduce energy consumption, allows the use of alternative solvents and renewable natural products, and ensures a safe and high-quality product (Chemat *et al.* 2012). Among these green extraction methods, enzymatic extraction is gaining attention due to its effectiveness, sustainability, and eco-friendliness, as well as its ability to enhance the competitiveness of industries (Puri *et al.* 2012). The polysaccharides present in the cell walls, mainly composed of cellulose, hemicellulose, and pectin, reduce the efficiency of the extraction solvent (Muniglia 2014; Nadar *et al.* 2018). Enzymatic extraction has the ability to degrade barrier components through hydrolysis using an enzyme as a catalyst to release bioactive products (Gligor *et al.* 2019). Enzymatic extraction offers several innovative advantages, including selectivity; catalyzing reactions under mild conditions with low amount of energy and gives higher yield (Hammed *et al.* 2013). Moreover, the non-toxic nature of enzymes which unlike chemical solvent, does not have residual effects. This method allows the extraction of thermo-sensitive molecules such as oils, pigments, as well as for polyphenols and other medicinal compounds (Puri *et al.* 2012). Commercial enzyme preparations such as Celluclast 1.5 L (*Trichoderma reesei*), Viscozyme L (*Aspegilus aculeatus*) and Pectinex Ultra-SP-L (*Aspergillus*

*aculeatus*), have shown their effectiveness in extracting desired compounds by targeting plant cell walls of several plants (Latif et Anwar 2009; Ranveer et al. 2013; Ferri et al. 2016). Enzymatic extraction is currently used in combination with vegetable oil as a co-solvent for fractioning raw materials to maximize the value of the process (Muniglia 2020). Indeed, this technology allows for the separation of an aqueous phase rich in hydrophilic compounds and a lipid phase rich in hydrophobic compounds after the enzymatic extraction process. Each phase thus possesses a different property. As an example, aqueous extracts, are often rich in phenolic compounds and has significant antioxidant activity, which can have various applications in cosmetics, agri-food, and nutrition (Shahidi *et al.* 2019; de Lima Cherubim *et al.* 2020). Additionally, vegetable oils enriched with plant extract or spices can be marketed by improving their nutritional values, extend their shelf life or refine their organoleptic properties (Yara-Varón et al. 2017).

In this study, we have investigated the potential of *Myrica gale* L. (Myricaceae) using enzymatic extraction. This plant commonly known as sweet gale or bog myrtle is a native shrub of the boreal forest and is widely distributed in the northern hemisphere. The aromatic, dark green, spirally arranged leaves are oblanceolate, serrated and marked with resinous dots. The flowers are catnip borne separately on male or female plants (dioecious). The fruit is a waxy-winged resinous drupe (Marie-Victorin 1995). *M. gale* is found in bogs, watersides and the edge of lakes and streams. The plant has a rich history of food and medicinal use in Northern America and Northern Europe. *M. gale* was traditionally used in medicine to treat ulcers, intestinal worms, cardiac disorder, and aching muscles (Small 2013). Furthermore, *M. gale* was used in a herb mixture called gruit for the flavouring of beer from the Middle Ages to the 16<sup>th</sup> century (Verberg 2022). Moreover, the leaves of sweet gale can be dried to make tea, while both the catkins and leaves can be ground and used as spices. *M. gale* essential oils and have demonstrated antimicrobial activity against several pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* (Krogsbøll et al. 2016;

Ložienė et al. 2020; Wawrzyńczak et al. 2021). They have also shown efficacy against strains of yeast known to be food spoilage agents: *Cladosporium cladosporioides*, *Byssosclamyces fulva*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium expansum* et *Penicillium corylophilum* as well as *Candida albicans* and *Candida glabrata* (Carlton et al. 1992; Popovici et al. 2008). Furthermore, essential oils extracted from *M. gale* leaves have exhibited cytotoxic effects on two tumor cell lines, namely human lung carcinoma (A549) and human colon adenocarcinoma (DLD-1) (Sylvestre et al. 2005). Finally, the ethanolic and aqueous extracts have also demonstrated antioxidant properties (Sekhon-Loodu et Rupasinghe 2019).

*M. gale*'s therapeutic properties and use in traditional medicine and food culture have prompted us to explore its potential when extracted using alternative enzymatic extraction. In this study, we have evaluated antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of extracts resulting from a green enzymatic extraction of the aerial parts of *M. gale*.

### **3.4. Materials and Methods**

#### **3.4.1. Plant material and chemicals.**

The aerial parts of wild *M. gale* were collected in September 2020 and June 2021 in the Simoncouche forest of the Réserve faunique des Laurentides, Québec (48° 13' 59" N—71° 14' 59" W), Canada. The plant was authenticated by Heloise Côté (Université du Québec à Chicoutimi), and voucher specimens (QFA0637187) were deposited in the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Québec City, Québec, Canada. After collection, leaves and stems were separated, dried at 50 °C for 72 hours before being powdered. Three enzymes: a liquid cellulase Celluclast 1.5 L (*Trichroma reesei*); a cellulolytic enzyme mixture Viscozyme L (*Aspergillus sp*), and Pectinex Ultra SP-L a blend of pectinases, hemicellulases and beta-glucanases (*Aspergillus aculeatus*) were obtained from Sigma Aldrich. Sunflower oil from the brand Selection was bought at the local supermarket.

#### **3.4.2. Enzymatic extraction using water and sunflower oil as alternative solvent.**

Firstly, 20 g of plant aerial part powder added to Thermomix TM6 (Vorwerk, Germany) followed by 200 mL of distilled water. The pH of the water was initially adjusted to 5.0 and the temperature at 50°C which was in the range recommended by the enzyme provider (Novozyme, Denmark) and described as suitable starting parameters (Muniglia 2011). When the Thermomix TM6 has reached the recommended temperature, various percentages (1%, 2%, 4% or 8%) of the enzyme mixture (Celluclast 1.5 L, Viscozyme L or Pectinex Ultra SP-L) were added (% volume/weight). The enzymatic hydrolytic reaction was performed for a total of 8 hours to achieve the desired degree of hydrolysis of the plant material at 50°C with a rpm speed of 100 rpm. After 6 hours of hydrolysis digestion, 50 mL of sunflower oil was added to the pot for an additional 2 hours, with the Thermomix TM6 set at 200 rpm. Following the enzymatic reaction, the digest was heated for 15 min at 90°C to inactivate the enzymes. Then, the sample was clarified by centrifugation (4000 rpm for 20 min) to remove the plant residue and was filtered through a



Whatman #4 (20–25  $\mu\text{m}$ ) paper filter. The aqueous and oily phases of the sample were then separated using a separatory funnel. Afterwards, the aqueous extract was lyophilized for 72 hours. The oily phase was preserved in the freezer until use.

### **3.4.3. Aqueous-oil extraction without enzymes**

Aqueous extractions ( $\text{H}_2\text{O}$ ) were performed in combination with the addition of sunflower oil in the Thermomix TM6. Briefly, 20 g of plant aerial part powder was introduced into the device, followed by the addition of 200 mL of distilled water at pH 5, maintaining a temperature of  $50^\circ\text{C}$  with a speed of 100 rpm for 6 hours. After this initial period, 50 mL of sunflower oil was incorporated into the mixture for an additional 2 hours, with the Thermomix TM6 operating at 200 rpm. Following this step, the extract was heated for 15 minutes at  $90^\circ\text{C}$ . Subsequently, the sample was subjected to clarification through centrifugation (4000 rpm for 20 min) to eliminate plant residues and filtered using a Whatman #4 (20–25  $\mu\text{m}$ ) paper filter. The aqueous and oily phases were then separated using a separatory funnel. Finally, the aqueous extract underwent a lyophilization process lasting 72 hours. The oily phase was preserved in the freezer until use.

### **3.4.4. Hydroalcoholic extraction**

To compare the results obtained with aqueous enzymatic extracts, extractions using a combination of ethanol and water ( $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ ) were performed in a Thermomix TM6 (Vorwerk). In brief, a mass of 20 grams of crushed plant aerial parts was added, followed by the addition of 200 mL of a hydroethanolic mixture. This extraction process was conducted for 8 hours at  $50^\circ\text{C}$  with the device set to a rotation speed of 100 rpm. The hydroethanolic mixtures used included  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  ratios of 95:5, 50:50 and 25:75. Following the extraction, the samples were centrifuged (4000 rpm for 20 minutes) to remove plant material and then filtered through filter paper Whatman #4 (20–25  $\mu\text{m}$ ). The extracts were evaporated under vacuum and subsequently freeze-dried for a period of 72 hours.

#### **3.4.5. Methanolic extraction of the enzymatic sunflower oil extract**

A liquid-liquid extraction using methanol was conducted on the sunflower oil extract. For this purpose, 15 mL of sunflower oil extract and 10 mL of MeOH were vigorously agitated for 40 seconds in a separatory funnel, with repeated degassing performed multiple times. Following the phase separation, the methanol was collected in a 250 mL glass flask. The sunflower oil was then collected to repeat the procedure iteratively until the methanol turned clear (typically 4 to 8 cycles, depending on the sunflower oil extract). Finally, the methanol was evaporated under vacuum to obtain the dried extract.

#### **3.4.6. Enzymatic extraction with heptane addition**

Enzymatic extraction with the addition of heptane was performed to compare the methanolic fraction of sunflower oil. In this procedure, 200 grams of crushed aerial parts of the plant were placed under a chemical hood and mixed with 200 mL of water at pH 5 in a 250 mL Erlenmeyer flask. The mixture was heated to a temperature of 50°C using a water bath on a hot plate (MR Hei-Standard model). Once the mixture reached the required temperature, enzymes were introduced (Celluclast 1.5 L, Viscozyme L or Pectinex Ultra SP-L), and the mixture was stirred with a magnetic stirrer at a speed of 200 rpm for 6 hours. Subsequently, a volume of 50 mL of heptane was added, and the stirring speed was increased to 500 rpm for an additional 2 hours. Afterward, the obtained extract was filtered through filter paper Whatman #4 (20–25 µm) and separated by decantation using a separating funnel. Finally, the organic phase was evaporated under vacuum.

#### **3.4.7. Total phenolic content**

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent according to the procedure reported by Singleton & Rossi (1965) with some modifications. Briefly, a volume of 50 µL containing a gradient of concentrations of extract ranging from 0.39 to 50 mg/ml was mixed with 25 µL of 1:1 distilled water diluted Folin-Ciocalteu reagent in transparent flat-bottom 96-well

plates (*NUNC*). After 5 min, 125  $\mu$ L of sodium carbonate decahydrate solution ( $\text{NaHCO}_3$ ) at 20g/100 mL was added to each well. Absorbance was then measured at 758 nm using an automated Varioskan Ascent plate reader (*Thermo electron*). Analysis was performed in triplicate, and the results were expressed in tannic acid equivalents.

#### **3.4.8. ORAC<sub>FL</sub> assay**

The procedure was performed as described by Ou *et al.* (2001) with some modifications. The ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) test consists of measuring the ability of a sample to inhibit the oxidation of fluorescein, a fluorochrome reagent. The test was carried out in 75 mM phosphate buffer at pH 7.4. Briefly, a gradient of 16 concentrations of the sample and internal standards, quercetin and Trolox, were prepared in a black-flat-bottom 384-wells (Greiner Bio-One). Afterwards, solution of Fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich F6377) was added. The kinetic started when the oxidant, 2,2-azobis (2-methyl-propionamide) dihydrochloride (AAPH, Sigma-Aldrich 440,914) was added to each well. The plate was then read at 37.5 °C using a Fluroskan Ascent FL<sup>TM</sup> (Labsystems, Milford, MA, USA) plate reader ( $\lambda$  excitation: 485 nm,  $\lambda$  emission: 538 nm) for a period of one hour, with a reading every minute. The ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu\text{mol TE/mg}$ ).

#### **3.4.9. Cell culture**

Human skin fibroblast WS1 (ATCC-CRL-1502) and murine macrophage RAW 264.7 (ATCC-TIB-71) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). They were grown in a humidified atmosphere at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  in Dulbecco's Essential Medium supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), solution of vitamin (1x), sodium pyruvate (1x), penicillin (100 IU) and streptomycin (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Mediatech Cellgro ®). The complete medium was refreshed twice a week.

#### **3.4.10. Antioxidant cell assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)**

The procedure was performed as described by Girard-Lalancette *et al.* (2009) with some modifications. Briefly, WS1 cells were plated in 96-well plates at 5,000 cells per well and incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were incubated for one hour with 100 µL HBSS (pH 7.4) containing 5 µM of 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). After removing the supernatant, the cells were incubated for one hour with the different concentrations (0.2- 200 µg/mL) of the tested extracts and the positive standard, quercetin and Trolox (both tested at 0.024 – 12.5 µg/ml). Then, 200 µM *tert*-butyl hydroperoxide (T-BuOOH) was added and the fluorescence was monitored immediately and after two hours. Measurements were performed with a plate reader (Fluoroskan Ascent FL™) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 538 nm. Antioxidant activity was expressed as the concentration of extract inhibiting 50% of DCFH oxidation (IC<sub>50</sub>).

#### **3.4.11. Measurement of anti-inflammatory activity by nitrite quantification**

The assay was performed as described by Legault *et al.* (2011). Control *N* $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (N5751) (L-NAME) was used as positive control (tested at 250 µM and 1 mM). Murine macrophage RAW 264.7 cells were incubated (7.5 x 10<sup>4</sup> cells/well) and incubated for 24 hours. Afterwards, cells were treated with the extract at different concentrations, stimulated with 100 ng/mL of Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 (L4516) (LPS) and incubated at 37 °C. After 24h, 100 µL of the cell-free supernatant was collected and the Nitric Oxide (NO) concentration was determined using 100 µL Griess reagent, prepared as described by Green *et al.* (1990) and the plates were incubated at room temperature and shielded from light for 20 min. NO quantification was estimated using a NaNO<sub>2</sub> standard curve, and the absorbance was read at 540 nm using Varioskan Ascent plate reader (Thermo Electron).

### **3.4.12. Antibacterial assay—Hydrophobic**

The antibacterial activity of the enzymatic oil extracts was tested using the antibacterial hydrophobic assay as described by Côté *et al.* (2016). Briefly, after micro-organisms were grown for 16–18 h at 37 °C in a nutrient broth base (Difco), 20 µL methanol containing different percentages of oil extract (100% to 1,5625%) was transferred onto nutrient agar in 96-well plates. Gentamicin and chloramphenicol were used as positive control (16 µg/mL to 0:25 µg/mL). Bacterial strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25,923), having a concentration of  $2.5 \times 10^5$  colony-forming units (CFU) were then added per mL of nutrient broth. Bacterial suspension without treatment was used as a negative control (where maximal growth was observed), and bacterial suspension plus methanol solvents were tested in parallel to ensure the absence of solvent toxicity. The blank consisted of a culture medium only and was subtracted from all subsequent measurements of each well. The 96-well plates were then incubated at 37 °C for 5 h to foster bacterial growth. Then, 100 µL of resazurin sodium salt solution with a concentration of 50 µg/mL (Sigma R-2127, St-Louis, MO, USA) was added to each well. After two hours, fluorescence was read on an automated Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively.

### **3.4.13. Statistical analysis**

Data were expressed as means ± standard deviation from at least three determinations. Statistical treatments were performed using SigmaStat software version 4.0 (Jandel Scientific). Comparisons between groups were performed using a one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls' or Dunn's *post hoc* test, P values of <0.05 or less were considered statistically significant.

### 3.5. Results and discussion

The main objective of this study was to extract aerial parts of *M. gale* using enzyme-assisted extraction, to assess the biological activities of the aqueous and oily extracts obtained and to compare their efficiency with usual solvent extractions as water, ethanol, or heptane.

#### 3.5.1. Aqueous Extraction yield and total phenolic content

The enzymatic extraction of *M. gale* was conducted using a Thermomix® TM6 (Vorwerk, Germany). Aerial parts of the plant were extracted with commercially available enzyme mixtures including Celluclast 1.5 L, Viscozyme L or Pectinex Ultra SP-L, with a concentration ranging from 1% to 8% (v/w). After 6 hours of the hydrolysis reaction, sunflower oil was introduced into the Thermomix along with the hydrolyzed plant material. To compare the aqueous enzyme-assisted extraction (EAE), water (H<sub>2</sub>O) and hydroethanolic (EtOH-H<sub>2</sub>O) extracts were also employed at three different proportions (95:5, 50:50 et 25:75). The results presented in Table 3 show the extraction yield, total phenolic content in dry extract and in dry plant obtained for each condition tested. Firstly, an increase in yield has been observed related to the enzyme concentrations. Among the tested enzymes, Pectinex Ultra SP-L show the highest efficiency, with yields ranging from 23 to 88% of the dry starting plant material's weight. Moreover, all enzymes tested at every concentration result in higher yields than solvent extractions using H<sub>2</sub>O and EtOH-H<sub>2</sub>O. Indeed, H<sub>2</sub>O extract without enzyme yielded the lowest with  $7.7 \pm 0.5\%$ , while the extraction yield of EtOH-H<sub>2</sub>O 95:5, 50:50 and 25:75 extraction was respectively of 15.1%, 16.5% and 15.6%.

As expected, the incorporation of enzymes increased the yield of extraction probably due to their ability to break down the complex structure of the raw material (Meyer 2010; Sowbhagya et Chitra 2010). The membrane and permeability of cell wall play a crucial role to increase extraction yield (Zhao et al. 2014). These enzymes hydrolyze cell wall components, thereby enhancing cell wall permeability which results in higher extraction yield of compounds.

**Table 3:** Extraction yields and phenolic compounds with various enzyme concentrations compared to water (H<sub>2</sub>O) and hydroethanolic extraction (EtOH-H<sub>2</sub>O).

Concentration enzymes (v/w)	Enzymes	Extraction yield (%) <sup>1</sup>	Phenol content in extract* (g/100 g) <sup>2</sup>	Phenol content in dry plant (g/100 g) <sup>3</sup>
1%	Celluclast 1.5 L	19	19 ± 2	3.6 ± 0.4
	Viscozyme L	20	19 ± 1	3.6 ± 0.2
	Pectinex Ultra SP-L	23	26 ± 4	5.5 ± 0.9
2%	Celluclast 1.5 L	25 ± 4	14 ± 3	3.3 ± 0.4
	Viscozyme L	26 ± 2	14 ± 4	3.6 ± 0.4
	Pectinex Ultra SP-L	32 ± 2	17 ± 3	5.4 ± 0.6
4%	Celluclast 1.5 L	26	6 ± 1	1.5 ± 0.3
	Viscozyme L	37	9.5 ± 0.7	3.5 ± 0.3
	Pectinex Ultra SP-L	49	10.0 ± 0.4	4.8 ± 0.2
8%	Celluclast 1.5 L	51	3.0 ± 0.4	1.5 ± 0.2
	Viscozyme L	55	3.0 ± 0.1	1.60 ± 0.05
	Pectinex Ultra SP-L	88	7 ± 2	6 ± 2
<b>Reference extracts</b>				
	H <sub>2</sub> O	7.7 ± 0.5	22 ± 6	1.7 ± 0.3
	EtOH-H <sub>2</sub> O (95:5)	15.1	34 ± 4	5.1 ± 0.7
	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50)	16.5	40 ± 7	6.6 ± 1.2
	EtOH-H <sub>2</sub> O (25:75)	15.6	40 ± 3	6.2 ± 0.5

\*Each value represents the mean ± S.D. of three determinations. <sup>1</sup> The yield was calculated as: (dry extract weight/dry starting material weight) x100; <sup>2</sup> Data are expressed as grams of phenolics per 100 g of dry extract. Tannic acid was used as internal standard. <sup>3</sup>Quantity of phenols compounds recovered in 100 g of dry plant.

As observed in Table 3, Pectinex Ultra SP-L aqueous extract exhibits the highest phenolic content with 26 g/100g of dry extract at the concentration of 1% in comparison with 19 g/100g for the other enzymes. However, phenol content it is not significantly different from water extract without enzyme. Moreover, total phenol content in dry extract decreases with the percentage of enzyme used and with the increasing of extraction yield. For example, at the concentration of 8% of enzymes, total phenol content decreases by more than 70% in comparison with the concentration of 1%. Hydroalcoholic extracts yield higher content of total phenolic compared to enzymatic extractions with concentrations ranging from 34 to 40 g/100g. However, when examining phenol content related to dry plant the phenolic levels remain comparable to those of hydroalcoholic extracts due to the higher yield provided by enzymes. The EtOH-H<sub>2</sub>O (25:75)

extract recovered  $6.2 \pm 0.5\%$  g of phenol content on 100 g of dry plant, which is comparable to the Pectinex Ultra SP-L at 1% concentration extract recovering  $5.5 \pm 0.9\%$  g of phenol content in 100 g of dry plant. In contrast, water extract without enzyme, recovered  $1.7 \pm 0.3\%$  g of phenol content in 100 g of dry plant. Many studies conducted over the past decades have confirmed that enzymatic extraction leads to an increase in polyphenol yields (Fu *et al.* 2008; Hansen et Laroze 2009; Vardakas *et al.* 2021). Thus, aqueous enzymatic extraction using of *M. gale* allows the preparation of a larger extract proportionally to the enzyme concentration with a similar or lower concentration of phenolic compounds in 100 g of extract. However, at enzyme concentrations of 1 and 2%, the total amount of phenolic compounds extracted from 100 g of dry plant is greater than extraction with water only.



### 3.5.2. Evaluation of antioxidant activity using ORAC and Cell-based Assays.

The antioxidant activity of enzymatic, water and hydroethanolic extracts of *M. gale* were evaluated using ORAC and a cellular antioxidant assay. First, the results presented in Table 4 show that hydroethanolic extracts (95:5; 50:50; 25:75) have interesting antioxidant properties with ORAC values ranging from 1.7 to 2  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  and concentrations that inhibit 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) the oxidation induced by hydroperoxide tert-butyl between 0.7 and 0.8  $\mu\text{g/mL}$ . Previous studies have shown that *M. gale* ethanol extracts exhibit antioxidant activity in various *in vitro* models such as radical trapping activity (DPPH) and ferric reducing antioxidant (FRAP) assay due to the presence of phenolic compounds (Nakata et al., 2013; Sekhon-Loodu and Rupasinghe, 2019). On the other hand, the extract with water only was found to be less active than hydroethanolic extracts with an ORAC value of 0.81  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  and an  $\text{IC}_{50}$  of 4  $\mu\text{g/ml}$ . Interestingly, the results show that the antioxidant activity of enzymatic extracts Celluclast 1.5L and Pectinex Ultra SP-L at the 1% concentration is superior to the water extract and similar to the hydroethanolic extracts with respective ORAC values of 1.5 and 1.6  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  and  $\text{IC}_{50}$  of 0.8 and 0.7  $\mu\text{g/ml}$ . The gallic acid and quercetin identified in Pectinex Ultra SP-L extract may partially explain the antioxidant activity observed (shown in the complementary results). Finally, the increase of the enzyme concentration from 2 to 8% for the three tested mixtures decreases the antioxidant activity of the enzymatic extracts.

**Table 4:** Antioxidant activities of various enzyme concentrations compared to water (H<sub>2</sub>O) and hydroethanolic extraction (EtOH-H<sub>2</sub>O).

Concentration enzymes (v/w)	Enzymes	ORAC (μmol Trolox/mg) <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1</sup>
1%	Celluclast 1.5 L	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.2
	Viscozyme L	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	Pectinex Ultra SP-L	1.6 ± 0.4	0.7 ± 0.1
2%	Celluclast 1.5 L	1.4 ± 0.3	2.8 ± 0.5
	Viscozyme L	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.9
	Pectinex Ultra SP-L	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2
4%	Celluclast 1.5 L	0.99 ± 0.35	7.4 ± 0.8
	Viscozyme L	0.97 ± 0.34	5.8 ± 0.4
	Pectinex Ultra SP-L	1.0 ± 0.3	5.1 ± 0.9
8%	Celluclast 1.5 L	0.5 ± 0.2	8 ± 1
	Viscozyme L	0.4 ± 0.1	12 ± 1
	Pectinex Ultra SP-L	0.24 ± 0.01	14 ± 3
<b>Reference Extracts</b>			
	H <sub>2</sub> O	0.81 ± 0.16	4 ± 1
	EtOH-H <sub>2</sub> O (95:5)	1.7 ± 0.5	0.8 ± 0.3
	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50)	1.97 ± 0.4	0.8 ± 0.1
	EtOH-H <sub>2</sub> O (25:75)	2.0 ± 0.5	0.7 ± 0.1

<sup>1</sup> Quercetin and catechin, employed as ORAC positive controls, exhibited values of 22 ± 4 μmol Trolox/mg and 25 ± 3 μmol Trolox/mg, respectively. <sup>2</sup> Quercetin and Trolox, used as positive antioxidant controls, displayed IC<sub>50</sub> values of 0.56 ± 0.08 μg/mL and 0.08 ± 0.01 μg/mL, respectively. Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.

In this study, EAE were combined with sunflower oil or heptane to extract lipophilic compounds potentially released by enzymes at the concentration of 1%. After settling, sunflower oil was extracted with methanol to concentrate the lipophilic compounds. The results presented in Table 5 show that the extraction yield of methanol varies from 0.25 to 0.49% compared to 0.86 to 1.48% for heptane. The best yields were obtained with Pectinex Ultra SP-L with 0.49%. The phenolic content and antioxidant activity of the extracts were evaluated using the ORAC test and a cell-based assay. First, the methanolic extracts of sunflower oil have a higher content of phenolic compounds (3.1 to 6.1 g/100 g) compared to heptane (1.7 to 2.1 g/100 g). The highest content of phenolic compounds was obtained with Viscozyme L with 6.1 g/100 g of extract. Antioxidant activity is relatively low for all extracts except methanolic extract Viscozyme L which shows moderate antioxidant activity with an ORAC value of 0.9  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  and an  $\text{IC}_{50}$  of 9  $\mu\text{g/ml}$ . These results suggest that phenolic compounds and antioxidant agents possibly remains trapped in the sunflower oil during enzymatic extraction. In vegetable oil, the polar antioxidants tend to be predominantly situated at the interface between oil and water within colloids. This specific location enhances their ability to effectively inhibit oxidation in comparison to nonpolar antioxidants that are dissolved in the lipid phase (Yara-Varón *et al.* 2017). The polar paradox, suggests that polar antioxidants exhibit greater activity in vegetable oils than their nonpolar counterparts, whereas nonpolar antioxidants are more effective in oil-in-water emulsions compared to their polar counterparts (Laguerre *et al.* 2015). The observed antioxidant activity in the sunflower oil could be attributed to polar antioxidants present in the colloids.

Our study provides evidence that EAE exhibit superior antioxidant activity compared to water extract without enzyme and strongly compete with hydroethanolic extractions. As a result, when evaluated alongside other extraction methods, enzymatic extraction emerges as a notably effective approach for the extraction of polyphenols and antioxidants. This is supported by a previous research, which demonstrates that enzymatic extraction enhances *in vitro* antioxidant

activity, surpassing the performance of ultrasonic and heat extraction methods (Zhou *et al.* 2017). Additionally, a minor fraction of phenolic compounds remains trapped in the lipid phase and appears to influence antioxidant activity.

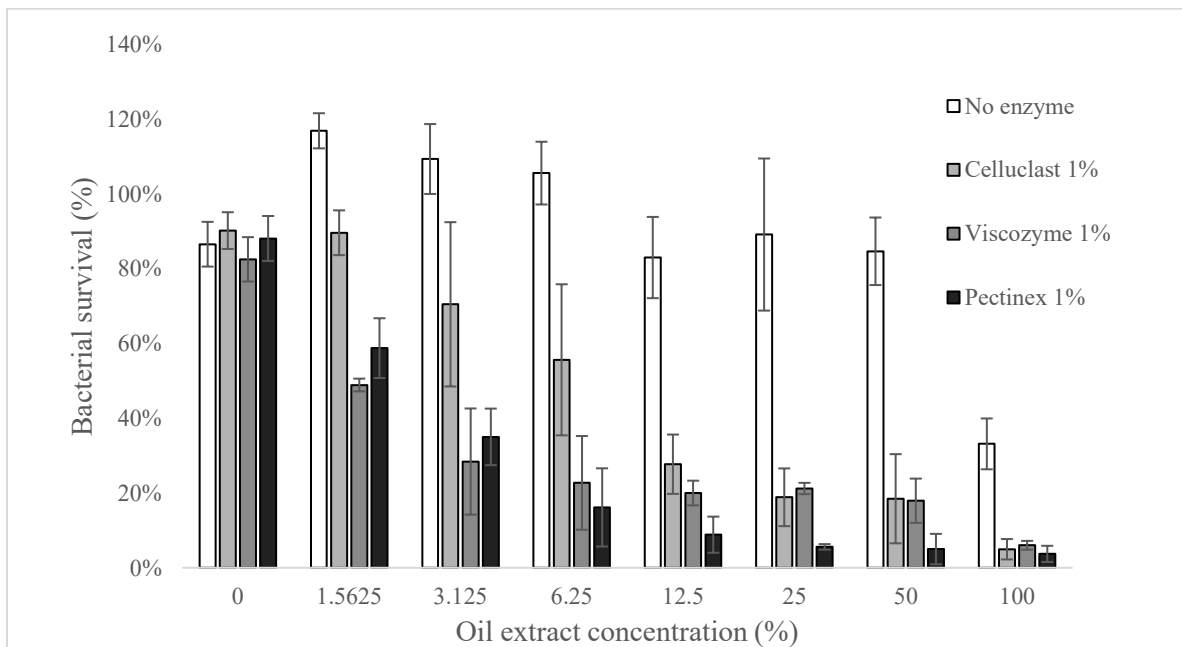
**Table 5:** Comparison of yield, phenolic content, and antioxidant activities of heptane extract and methanolic fraction of the enzymatic sunflower oil.

Solvent	Enzymes	Extraction yield (%) <sup>1</sup>	Phenolic content* (g/100g) <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>3</sup>	ORAC (µmol Trolox/mg) <sup>4</sup>
n-heptane	Celluclast 1.5 L	0.86	2.1 ± 0,2	32 ± 2	0.21 ± 0.03
	Viscozyme L	0.97	1.7 ± 0.6	31 ± 4	0.23 ± 0.03
	Pectinex Ultra SP-L	1.48	1.7 ± 0.5	46 ± 3	0.23 ± 0.03
MeOH	Celluclast 1.5 L	0.41	3.3 ± 0.8	31 ± 3	0.4 ± 0.1
	Viscozyme L	0.25	6.1 ± 0.7	9 ± 3	0.9 ± 0.1
	Pectinex Ultra SP-L	0.49	3.1 ± 0.7	27 ± 5	0.42 ± 0.07

<sup>1</sup> The yield was calculated as: (dry extract weight/dry starting material weight) x100. <sup>2</sup> Data are expressed as grams of phenolics per 100 g of dry extract. Tannic acid was used as internal standard. <sup>3</sup> Quercetin used as a positive antioxidant control, displayed IC<sub>50</sub> values of 0.56 ± 0.08 µg/mL <sup>4</sup>Quercetin employed as ORAC positive controls, exhibited values of 22 ± 4 µmol Trolox/mg. Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.

### 3.5.3. Evaluation of antibacterial activities on sunflower oil enzymatic extract

The antibacterial activity of sunflower oil extracts obtained from aqueous extracts treated or not with the enzymes Celluclast 1.5L, Viscozyme L and Pectinex Ultra SP-L was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. An extract of *M. gale* with sunflower oil only was also tested. Concentrations of 1.56 to 100% (v/v) were tested. All oil extracts were found to be inactive against *E. coli* with minimum inhibitory concentrations (MIC) above 100% (results not shown). The results presented in Figure 3 show that all oil extracts inhibit the growth of *S. aureus* by more than 50% at the concentration of 12.5% (v/v) while the enzyme-free oil extract is inactive.



**Figure 3:** Antibacterial activity against *S. aureus* of oily extracts of *M. gale* obtained from enzymatic extracts Celluclast 1.5L, Viscozyme L and Pectinex Ultra SP-L. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three to five determinations.

**Table 6:** Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of oil extracts against *S. aureus*

Enzyme concentration	Enzymes used	MIC <sub>90</sub> *
0%	Sunflower oil	>100
	Oil Extract	>100
1%	Celluclast 1.5 L	48 ± 1
	Viscozyme L	93 ± 26
	Pectinex Ultra SP-L	11 ± 2
2%	Celluclast 1.5 L	42 ± 4
	Viscozyme L	>100
	Pectinex Ultra SP-L	29 ± 2
4%	Celluclast 1.5 L	79 ± 8
	Viscozyme L	>100
	Pectinex Ultra SP-L	31 ± 3
8%	Celluclast 1.5 L	44 ± 7
	Viscozyme L	>100
	Pectinex Ultra SP-L	26.0 ± 0.5

\*Expressed in percentage (%) of oil extract with or without enzymes (v/v); Each value represents the mean ± S.D. of three to five determinations. Chloramphenicol and gentamicin were used as positive control with MIC<sub>90</sub> of 10.2 µg/ml and 3.9 µg/ml, respectively.

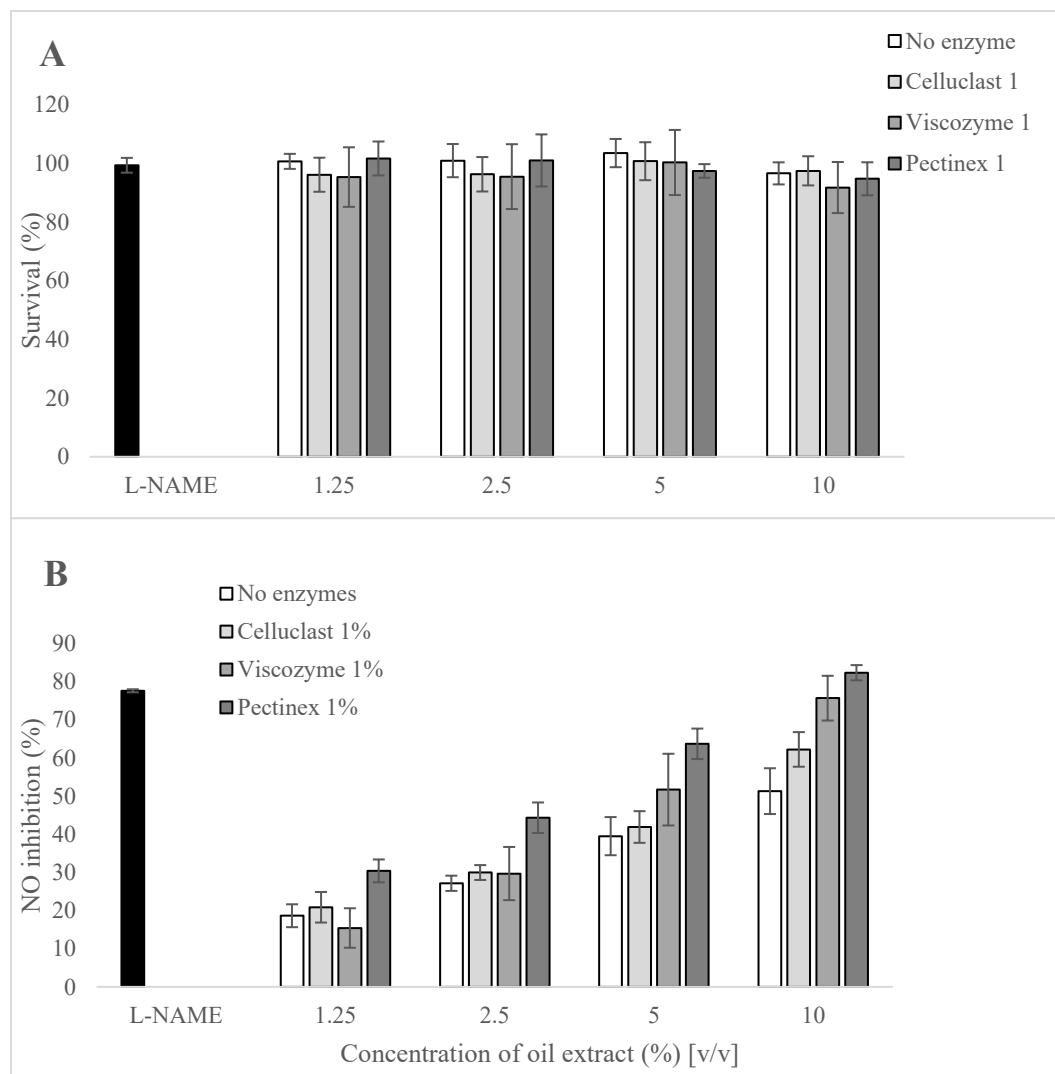
The minimum inhibitory concentration that inhibits more than ninety percent (MIC<sub>90</sub>) bacterial growth was evaluated to identify the most active oil extracts. The results presented in Table 6 show that *M. gale* sunflower oil and enzyme-free oily extract are inactive with MIC<sub>90</sub> greater than 100% v/v. Moreover, aqueous, heptane, hydroethanolic and methanolic extracts showed no antibacterial activity against *S. aureus* (MIC<sub>90</sub> >100 µg/ml). Pectinex oily extract SP-L 1% has the most interesting antibacterial properties with a MIC<sub>90</sub> of 11% (v/v). In comparison, the oil extracts Celluclast 1.5 L and Viscozyme L at 1% are less active with respective MIC<sub>90</sub> of 48% (v/v) and 93% (v/v). Increasing the enzyme concentration decreases the antibiotic activity of most oil extracts. To the best of our knowledge, there is no existing literature detailing the antibiotic effects of an enzymatic sunflower extract from *M. gale*, despite a report of antibacterial activity being detected in such an extract (without the use of enzymes) (Shikov *et al.* 2008). The antimicrobial activity of *M. gale* essential oils and dichloromethane extract against pathogenic

bacteria and yeasts is reported (Krogsbøll *et al.* 2016; Ložienė *et al.* 2020; Wawrzyńczak *et al.* 2021). However, the antibacterial activity of enzymatic sunflower oil extract has not been previously investigated. Our study shows a potential of enzymatic oil extracts as antibacterial agents against *S. aureus*.

#### **3.5.4. Evaluation of anti-inflammatory activities of enzymatic oil extracts**

The anti-inflammatory activity of sunflower oil extracts with or without enzyme was evaluated on RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (Figure 4). First, Figure 4A shows that all extracts tested at concentrations ranging from 1.25 to 10% (v/v) are not cytotoxic to RAW 264.7 macrophages. The results presented in Figure 4B are expressed as a percentage of inhibition of LPS-induced nitric oxide overproduction in RAW 264.7 macrophages. All oil extracts with or without enzyme inhibit the production of NO in a dose-dependent manner. The oil extract from the enzymatic treatment with Pectinex Ultra SP-L is the most active. Indeed, the extract Pectinex Ultra SP-L 10% (v/v) inhibits 82% the production of NO compared to 51% inhibition for the oil extract without enzyme.





**Figure 4:** Effect of oil extracts from *M. gale* on cytotoxicity (A) and on NO overproduction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (B). Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three determinations. L-NAME (1 mM) was used as an anti-inflammatory positive control, produced an inhibition of NO production by 77.6%.

The sunflower oil extract was fractionated using methanol to compare with an enzymatic extraction using the addition of heptane. The results presented in Table 7 demonstrate that, across all three enzymes tested, the methanolic fractions exhibit significantly lower IC<sub>50</sub> values compared to those of the n-heptane extracts, indicating a more potent inhibition of NO overproduction. Specifically, methanol extracts associated with Celluclast 1.5 L, Viscozyme L, and Pectinex Ultra SP-L showed IC<sub>50</sub> values of 54 ± 8 µg/mL, 40 ± 5 µg/mL, and 44 ± 9 µg/mL, respectively, while the n-heptane extracts displayed IC<sub>50</sub> values of 68 ± 15 µg/mL, 76 ± 14 µg/mL, and 67 ± 5 µg/mL. TLC analysis was conducted, clearly demonstrating a distinction in the compounds (shown in supplementary results). In the best conditions, the methanolic fraction of the oil obtained with the Pectinex Ultra SP-L enzyme exhibited an IC<sub>50</sub> of 44 ± 9 µg/mL, while the heptane fraction obtained an IC<sub>50</sub> of 67 ± 5 µg/mL. Our study suggests that the compounds responsible for the activity detected in the sunflower oil are possibly present in the methanolic fraction, outperforming those obtained with n-heptane. Although several species of the *Myrica* genus have demonstrated anti-inflammatory properties (Silva *et al.* 2015), the activity of *M. gale* has not been previously reported. Therefore, our study is the first to demonstrate the anti-inflammatory properties of this plant, observed in an enzymatic green extract.

**Table 7:** Comparison of lipophilic extracts in the inhibition of NO overproduction.

Enzymes	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (%)
	n-heptane	MeOH	Sunflower Oil extract*
Celluclast 1.5 L	68 ± 15	54 ± 8	3.6 ± 0.8
Viscozyme L	76 ± 14	40 ± 5	4 ± 1
Pectinex Ultra SP-L	67 ± 5	44 ± 9	3.2 ± 0.8

\*L-NAME (1 mM), used as a positive anti-inflammatory control, produced a 77.6% inhibition of NO production.

Our study suggests that the application of enzymatic extraction techniques results in an increased biological activity in the extracted oils. In addition, Pectinex Ultra-SP-L oil extract also doubled the quantity of volatiles compared to the sunflower oil extract without enzymes, resulting in a more aromatic oil (as shown in the supplementary section). Prior research has substantiated that this eco-friendly extraction method not only amplifies oil yield, but also enhances overall oil quality and is superior to those obtained via hexane extraction (Womani *et al.* 2008; Latif et Anwar 2011; Marathe *et al.* 2017).

In this present study, Pectinex Ultra SP-L extract presented the higher yield and the most potent biological activity in both the aqueous and sunflower oil phases. The Pectinex Ultra-SP-L has pectolytic activities as do polygalacturonase, hemicellulase, cellulase, protease and amylase enzyme (Mutlu *et al.* 1999). In previous studies, this particular enzyme was highly effective at releasing pigment like chlorophyll from spinach pulp, increasing the oil extraction yield from olives and promote the extraction of flavonoids (Najafian *et al.* 2009; Lotfi *et al.* 2015; Özkan et Bilek 2015). Since Pectinex Ultra SP-L mixture had a combination of different enzymes, the pectinate, hemicellulase, xylanase and cellulase may have synergistic activities on cell wall degradation of *M. gale* and make the active compounds more accessible for extraction. Furthermore, there is a correlation between the hydrolysis time and the enzyme concentration (Muniglia 2014). A shorter extraction time with a high concentration of enzymes would give comparable results to a long extraction at a lower concentration (Gligor et al. 2019). The concentration of the enzyme in the substrate increases the reaction rate until the active site is completely saturated (Berg et al. 2002). At this point, an increase in concentration does not generate higher speed. In this study, we observed a decrease of biological activity proportionally to its concentration. As all treatments had the same extraction time of 8 hours, the high concentration of enzymes may have saturated the active site rapidly. A previous study observed no increase in anthocyanin from saffron (*Crocus sativus*) tepals when the Pectinex enzyme

concentration increases by 1 to 10% in the substrate (Lotfi et al. 2015). Therefore, it is recommended to employ a reduced enzyme concentration over an extended extraction period, such as 8 hours, since augmenting the enzyme concentration does not provide any extra advantages.

### **3.6. Conclusion**

In conclusion, this study highlights the potential of Enzyme-Assisted Extraction (EAE) to improve yields while preserving phenolic compounds and antioxidant activity in the aqueous phase, yielding values surpassing aqueous extraction and comparable to hydroethanolic extractions. This eco-friendly extraction method also enhances the biological activity of sunflower oil extracts, including antibacterial and anti-inflammatory properties. Specifically, the methanolic fraction of the enzymatically treated sunflower oil demonstrates a more significant antioxidant and anti-inflammatory effect compared to the n-heptane extract. The most promising outcomes were achieved using Pectinex enzymes at a 1% concentration. Notably, our study reveals, for the first time, the anti-inflammatory properties of *M. gale*. Both hydrophilic and lipophilic fractions obtained from can be separately processed to yield products with enhanced value for various sectors such as cosmeceuticals and nutraceuticals. Further research is needed to investigate the specific bioactive compounds responsible for the observed biological activity.

### **3.7. Acknowledgment**

The authors would like to express their gratitude to Klara Michalsky for her assistance in the laboratory and her support with the extractions. We also appreciate the help and suggestions provided by Catherine Dussault and Karl Lalancette. Special thanks to Josianne Savard for her assistance during the analytical chemistry analysis.

### **3.8. Supplementary material and method**

#### **3.8.1 Thin-layer chromatography (TLC) conditions**

Thin-layer chromatography (TLC) was performed in normal phase on aluminum plates coated with silica gel 60 F254 from Supelco/Sigma Aldrich. The mobile phase for TLC consisted of a 5:1 mixture of hexane and ethyl acetate. Compounds were detected by spraying with a reagent consisting of 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in MeOH, followed by heating for 5 minutes at 100°C, and then observing them under visible light and at 365 nm wavelength.

#### **3.8.2. Gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS) condition.**

GC-MS analyses of the MeOH oil extracts were carried out on an Agilent 7890B GC equipped with a polar DB-Wax column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The temperature was raised from 40°C (2 minutes) to 270°C (5 minutes) at a rate of 4°C per minute. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The methanolic fraction of the sunflower oils were injected in a non-dried state in a split mode with a 200:1 ratio. Compounds were identified based on their retention indices and mass spectra.

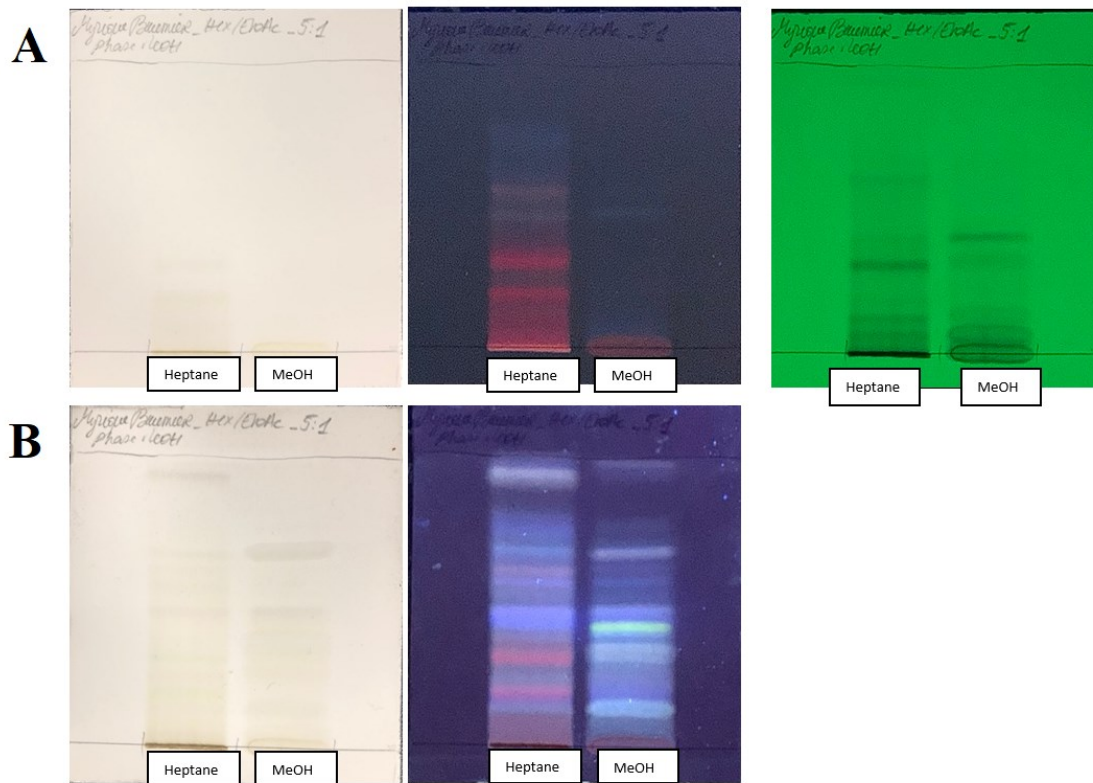
#### **3.8.3. Gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) conditions.**

GC-FID analyses were conducted on an Agilent 7890A GC using both non-polar DB-5 and polar DB-Wax (Agilent) columns (10 m x 0.10 mm x 0.10 µm) and two flame ionization detectors (FID). Separations were carried out on the same capillary column using the same method as in the GC-MS analysis. Compounds were identified based on their retention indices, which were calculated using standard alkanes ranging from C7 to C36.

#### **3.8.4 High-performance liquid chromatography (HPLC) conditions.**

The analysis was performed on the 1260 Infinity II Prime LC System. An injection volume of 2  $\mu$ L of the sample and standards dissolved in MeOH (50 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively) was used. A 3.9 x 150 mm, 2.7  $\mu$ m particle size Infinitylab Proroshell 120 Aqueous C18 column was employed. The flow rate was 1 mL/min, and a gradient method from 10% to 90% MeOH with 0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid was applied over a 30-minute period. Between each sample, a 10-minute washing period with 100% MeOH with 0.1% formic acid was included. The standards used were Gallic acid, p-Coumaric acid, Rutin, Cinnamic acid, and Quercetin.

### 3.9. Supplementary results



**Figure 5:** Thin-layer chromatography (TLC) of heptane and methanolic extracts from *M. gale* using the mobile phase Hex/EtOAc, before (A) and after revelation (B) with sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) under visible light and UV ( $\lambda = 254, 365$  nm). Heptane: Enzymatic extraction with the addition of heptane; MeOH: Methanolic fraction of the sunflower oil extract.



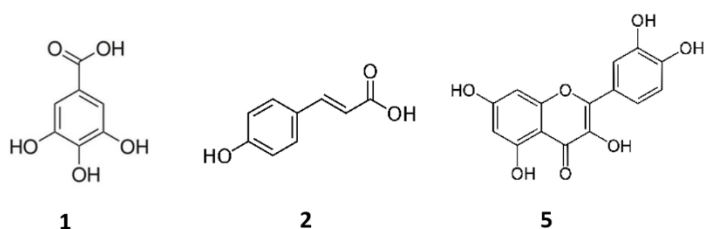
**Table 8:** Composition of volatile compounds in an oil extract of *M. gale* from the sunflower oil extract without enzymatic treatment (0%) and with Pectinex Ultra SP-L (at a 1% concentration).

Oil extract of <i>M. gale</i>				
Compounds	RI <sup>1</sup>	Oil extract (mg/g)	Pectinex Ultra SP-L (mg/g)	
1	$\alpha$ -Pinene	934	0.006	0.008
2	(2E)-Heptenal	958	0.006*	0.033*
3	Benzaldehyde	958	0.002*	0.004*
4	$\beta$ -Pinene	973	0.001*	0.001*
5	Sabinene	973	0.002*	0.001*
6	Myrcene	994	0.014	0.024
7	para-Cymene	1022	0.003	0.008
8	Limonene	1027	0.018*	0.021*
9	1,8-Cineole	1029	0.012*	0.015*
10	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1037	0.003	0.001
11	Linalool	1088	0.002	0.005
12	Terpinen-4-ol	1175	0.001	0.001
13	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.001	0.003*
14	Geraniol	1264	0.024	0.012
15	$\alpha$ -Terpinyl acetate	1348	0.001	0.002*
16	$\beta$ -Caryophyllene	1413	0.005*	0.008*
17	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1435	0.001*	0.001*
18	$\alpha$ -Humulene	1447	0.002	0.002
19	$\beta$ -Selinene	1482	0.001*	0.002*
20	ar-Curcumene	1482	0.003*	0.001*
21	$\delta$ -Cadinene	1521	0.002	0.001
22	(E)-Nerolidol	1565	0.002	0.005
23	Caryophyllene oxide	1575	0.004	0.014
24	Humulene epoxide II	1600	0.004	0.008
25	Eremoligenol?	1620	0.003	0.006
26	Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	1648	0.027	0.067
27	$\alpha$ -Bisabolol	1682	0.009	0.032
28	Germacrone	1686	0.012	0.025
Total :			<b>0.1722 mg/g</b>	<b>0.3107 mg/g</b>

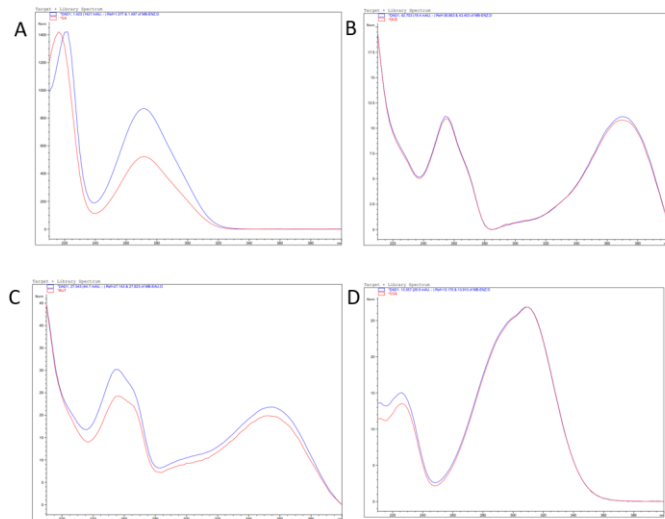
<sup>1</sup>RI: Retention Index, \*Compounds in co-elution

**Table 9:** Identified phenolic compounds in Pectinex Ultra SP-L aqueous extracts.

	Compounds	Retention time (min)	Surface area	ppm (mg/L)
1	Gallic acid	1.417	2302	429.4
2	p-Coumaric acid	13.019	235.7	23
3	Rutin	27.474	91.07	66.4
4	Cinnamic acid	33.674	147.9	7.8
5	Quercetin	42.183	89.62	32.5



**Figure 6:** Chemical structure of compounds 1 (Gallic acid), 2 (p-Coumaric acid) and 5 (Quercetin)



**Figure 7:** UV spectra of identified compound in the Pectinex Ultra SP-L extract at a 1% concentration. Gallic acid (A), p-Coumaric acid (B), Rutin (C) and Quercetin (D).

## CHAPITRE IV. CONCLUSION GÉNÉRALE

Le présent mémoire présente une étude portant sur l'extraction enzymatique de *M. gale*, une plante utilisée dans le domaine alimentaire. Cette approche d'extraction écoresponsable permet de produire simultanément deux types d'extraits en séparant les composés lipophiles et hydrophiles, en une seule étape d'extraction et sans l'usage de solvants organiques. L'objectif principal de ce projet visait à évaluer le potentiel de l'extraction enzymatique de *M. gale*, de comparer cette méthode avec des approches classiques, puis de tester leur activité biologique. Les résultats obtenus avec *M. gale*, ont permis de démontrer l'efficacité de la méthode d'extraction enzymatique notamment en termes de rendement et d'activités biologiques des extraits obtenus. À notre connaissance, cette étude est la première à utiliser l'extraction enzymatiques sur *M. gale* et à évaluer le potentiel des extraits.

Les potentialités de l'extraction enzymatique ont été mises en valeur en étudiant les activités biologiques des différentes phases du fractionnement. La phase aqueuse a d'abord été évaluée en termes de rendement, de composés phénoliques et d'activités antioxydantes. Les résultats de la phase aqueuse ont démontré que les rendements d'extraction enzymatiques étaient nettement supérieurs à ceux des extraits avec de l'eau et/ou de l'éthanol, pour toutes les concentrations et mélange d'enzymes testées. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en enzymes a entraîné une augmentation proportionnelle du rendement. Dans les conditions optimales, la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits enzymatiques s'est révélé supérieur à l'eau uniquement et similaires aux extraits à l'éthanol ou aucune différence significative n'a été observée, malgré le rendement supérieur en présence d'enzyme. Cependant, une diminution de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante a toutefois été constatée en fonction de la concentration d'enzymes. Il est intéressant de noter que l'extraction de la phase aqueuse avec l'huile végétale semble influencer l'effet antioxydant de l'extrait aqueux suggérant qu'une partie des composés responsables de l'activité semble se retrouver dans l'huile. De plus, les résultats obtenus sur la fraction

méthanolique de l'huile de tournesol, ainsi que la comparaison avec l'extrait à l'heptane, suggèrent qu'une certaine quantité de composés polaires demeure emprisonnée dans l'huile. Par ailleurs, en optimisant de manière adéquate les paramètres impliqués dans l'extraction de la phase aqueuse, tels que le pH, la température, la durée d'extraction, la concentration en enzymes et l'ajout de la phase lipidique, il serait envisageable d'obtenir un extrait présentant une activité antioxydante, adaptée à une utilisation commerciale ciblée dans les domaines de l'alimentation, de la cosmétique ou de l'agroalimentaire. Enfin, l'extraction enzymatique se révèle être une approche efficace pour l'extraction des polyphénols et des antioxydants.

Dans un deuxième temps, les extraits huileux de tournesol *M. gale* ont été évalués pour leur activité antibactérienne, révélant des propriétés biologiques significativement supérieures à celles de l'extrait huileux non traité par enzyme et de l'extrait à l'heptane. Bien que l'activité antibactérienne contre *S. aureus* ait déjà été observée dans les huiles essentielles de *M. gale*, elle n'avait jamais été observée dans les extraits d'huiles végétales. Ainsi, notre recherche suggère que la composante huileuse issue de l'extraction enzymatique pourrait être directement incorporée en tant qu'élément dans la fabrication de produits spécifiquement destinés à une utilisation antibactérienne.

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait huileux a également été évalué. L'extrait enzymatique obtenu avec le mélange Pectinex Ultra SP-L a montré une inhibition de l'oxyde nitrique significativement plus élevée que l'extrait huileux sans enzyme. Les fractions d'huile obtenues avec du méthanol ont également présenté une activité anti-inflammatoire pour les trois mélanges d'enzymes testés. Il est intéressant de noter que les fractions MeOH ont montré une activité significativement plus élevée que l'extrait obtenu avec de l'heptane pour tous les groupes d'enzymes. Un extrait huileux aux propriétés anti-inflammatoires pourrait être utilisé et exploité de diverses manières, que ce soit pour la formulation de produits de soins cutanés, capillaires, de bien-être, ainsi que pour la création de suppléments alimentaires et d'aliments fonctionnels.

Cette étude met en évidence que l'utilisation d'enzymes permet d'améliorer la qualité des huiles en renforçant leurs activités biologiques.

Pour conclure, cette étude a démontré que les deux extraits aqueux et huileux présentent des propriétés distinctes qui peuvent être exploitées de manière indépendante dans un large éventail de domaines d'application. Pour faire suite à cette recherche, il serait intéressant de caractériser plus en profondeur la composition chimique des extraits. Il serait intéressant notamment de confirmer la présence de Myrigalone B et de Galeon. En raison des nombreuses contraintes liées à l'usage des solvants organiques, on peut s'attendre dans les années à venir à une croissance de l'utilisation de l'extraction enzymatique pour extraire et fractionner la matière végétale. La technologie d'extraction enzymatique représente une avancée importante dans les processus d'extraction respectueux de l'environnement.

## RÉFÉRENCES

Allen DE et Hatfield G. 2004. Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britain & Ireland. Timber Press.

Anastas P et Eghbali N. 2010. Green chemistry: principles and practice. Chemical Society Reviews, 39 : 301-312.

Baker A et Parsons R. 1997. Rapid assimilation of recently fixed N<sub>2</sub> in root nodules of *Myrica gale*. Physiologia Plantarum, 99 : 640-647.

Behre K-E. 1999. The history of beer additives in Europe—a review. Vegetation history and archaeobotany, 8 : 35-48.

Berg JM, Tymoczko JL et Stryer L. 2002. The Michaelis-Menten model accounts for the kinetic properties of many enzymes. Biochemistry, 5 : 319-330.

Blackwell A, Stuart A et Estambale BB. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica Gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid.

Carlton RR, Waterman PG, Gray AI et Deans SG. 1992. The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (*Myrica gale*)(Myricaceae). Chemoecology, 3 : 55-59.

Chantrill B, Coulthard CE, Dickinson L, Inkley G, Morris W et Pyle A. 1952. The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. Microbiology, 6 : 74-84.

Chemat F, Vian MA et Cravotto G. 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. International journal of molecular sciences, 13 : 8615-8627.

Chemat F, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Strube J, Uhlenbrock L, Gunjevic V et Cravotto G. 2019. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 118 : 248-263.

Chen H, Yuan J, Hao J, Wen Y, Lv Y, Chen L et Yang X. 2019.  $\alpha$ -Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling. Food and Chemical Toxicology, 134 : 110830.

Coté H, Boucher M-A, Pichette A, Roger B et Legault J. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. journal of ethnopharmacology, 194 : 684-689.



de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L et da Silva de Lucca RA. 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of cosmetic dermatology*, 19 : 33-37.

Dominguez H et Muñoz MJG. 2017. Water extraction of bioactive compounds: from plants to drug development. Elsevier.

Ferri M, Bin S, Vallini V, Fava F, Michelini E, Roda A, Minnucci G, Bucchi G et Tassoni A. 2016. Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New biotechnology*, 33 : 338-344.

Fraterrigo Garofalo S, Tommasi T et Fino D. 2021. A short review of green extraction technologies for rice bran oil. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11 : 569-587.

Fu Y-J, Liu W, Zu Y-G, Tong M-H, Li S-M, Yan M-M, Efferth T et Luo H. 2008. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanuscajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food chemistry*, 111 : 508-512.

Garlantézec R, Monfort C, Rouget F et Cordier S. 2009. Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. *Occupational and environmental medicine*, 66 : 456-463.

Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro-and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food chemistry*, 115 : 720-726.

Gligor O, Mocan A, Moldovan C, Locatelli M, Crișan G et Ferreira IC. 2019. Enzyme-assisted extractions of polyphenols—A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88 : 302-315.

Goula AM, Ververi M, Adamopoulou A et Kaderides K. 2017. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics sonochemistry*, 34 : 821-830.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs J et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*, 144 : 278-283.

Grodowska K et Parczewski A. 2010. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 67.

Hammed AM, Jaswir I, Amid A, Alam Z, Asiyani-H TT et Ramli N. 2013. Enzymatic hydrolysis of plants and algae for extraction of bioactive compounds. *Food Reviews International*, 29 : 352-370.

Hansen MZ et Laroze L. 2009. Temperature effect on phenolic antioxidant extraction from raspberry wastes assisted by enzymes. *New biotechnology* : S170.

Krogsbøll L, Karring H et Christensen L. 2016. Chemical composition and antibacterial effect of volatile compounds from different chemotypes of sweet gale (*Myrica gale*). *Planta Medica*, 82 : P335.

Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements DJ, Lecomte J, Decker EA et Villeneuve P. 2015. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55 : 183-201.

Lapointe M. 2015. *Plantes de milieux humides et de bord de mer du Québec et des Maritimes*. Éditions Michel Quintin.

Latif S et Anwar F. 2009. Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86 : 393-400.

Latif S et Anwar F. 2011. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food chemistry*, 125 : 679-684.

Legault J, Perron T, Mshvildadze V, Girard-Lalancette K, Perron S, Laprise C, Sirois P et Pichette A. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. *Journal of medicinal food*, 14 : 1127-1134.

Leighton AL. 1985. *Wild Plant Use by the Woods Cree (Nihithawak) of East-Central Saskatchewan*. Ottawa National Museums of Canada Mercury Series : 46

Li Y, Fabiano-Tixier AS, Ginies C et Chemat F. 2014. Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT-Food Science and Technology*, 59 : 724-731.

Lloyd DG. 1981. The distribution of sex in *Myrica gale*. *Plant Systematics and Evolution*, 138 : 29-45.

Lotfi L, Kalbasi-Ashtari A, Hamed M et Ghorbani F. 2015. Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *Journal of food and drug analysis*, 23 : 210-218.

Ložienė K, Labokas J, Vaičiulytė V, Švedienė J, Raudonienė V, Paškevičius A, Šveistytė L et Apšegaitė V. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of fruit essential oils of *Myrica gale*, a neglected non-wood forest product. *Baltic forestry*, 26 : 1-8.

Malterud K et Faegri A. 1982. Bacteriostatic and fungistatic activity of C-methylated dihydrochalcones from the fruits of *Myrica gale* L. *Acta Pharmaceutica Suecica*, 19 : 43-46.

Malterud KE, Anthonsen T et Hjort J. 1976. 14-Oxa-[7.1]-metapara-cyclophanes from *Myrica gale* L., a new class of natural products. *Tetrahedron Letters*, 17 : 3069-3072.

Marathe SJ, Jadhav SB, Bankar SB et Singhal RS. 2017. Enzyme-assisted extraction of bioactives. Dans : *Food bioactives*. Springer, p. 171-201.

Marie-Victorin F, Rouleau, E. et Brouillet, L. 1995. *Flore Laurentienne* (3rd éd.).

Mathiesen L, Malterud KE et Sund RB. 1995. Antioxidant activity of fruit exudate and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Medica*, 61 : 515-518.

Mathiesen L, Wang S, Halvorsen B, Malterud KE et Sund RB. 1996. Inhibition of lipid peroxidation in low-density lipoprotein by the flavonoid myriganone B and ascorbic acid. *Biochemical pharmacology*, 51 : 1719-1725.

Mesbah NM. 2022. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.

Meyer AS. 2010. Enzyme technology for precision functional food ingredient processes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1190 : 126-132.

Muniglia L. 2014. Chapter 8 : Enzymatic Aqueous Extraction (EAE) - Alternative Solvents for Natural Products Extraction. Springer.

Muniglia L. 2020. Master Aliments - Nutrition -Santé - U.E 9.2.3 - Université de Lorraine. UE 923, Université de Lorraine.

Muniglia L, Girardin M, Piffaut B et Ricochon G. 2014. Enzyme method of extracting oils and proteins from vegetable matter in an aqueous medium. Google Patents.

Muniglia L, ; Michel Girardin, Bernadette Piffaut, Guillaume Ricochet. 2011. Enzyme method of extracting oils and proteins from vegetable matter in an aqueous medium. Canadian Patent.

Mutlu M, Sarioğlu K, Demir N, Ercan MT et Acar J. 1999. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of food engineering*, 41 : 147-150.

Nadar SS, Rao P et Rathod VK. 2018. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108 : 309-330.

Nagar S, Pigott M, Whyms S, Berlemont A et Sheridan H. 2023. Effect of Extraction Methods on Essential Oil Composition: A Case Study of Irish Bog Myrtle-*Myrica gale* L. *Separations*, 10 : 128.

Najafian L, Ghodsvali A, Khodaparast MH et Diosady L. 2009. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42 : 171-175.

Nakata M, Myoda T, Wakita Y, Sato T, Tanahashi I, Toeda K, Fujimori T et Nishizawa M. 2013. Volatile components of essential oil from cultivated *Myrica gale* var. *tomentosa* and its antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Oleo Science*, 62 : 755-762.

Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 4619-4626.

Özkan G et Bilek SE. 2015. Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food chemistry*, 176 : 152-157.

Payette S. 2013. Flore nordique du Québec et du Labrador 01. Presses de l'Université Laval.

Pinelo M, Arnous A et Meyer AS. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17 : 579-590.

Popovici J, Bertrand C, Bagnarol E, Fernandez M et Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. *Natural product research*, 22 : 1024-1032.

Portillo-López R, Morales-Contreras BE, Lozano-Guzmán E, Basilio-Heredia J, Muy-Rangel MD, Ochoa-Martínez LA, Rosas-Flores W et Morales-Castro J. 2021. Vegetable oils as green solvents for carotenoid extraction from pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber) byproducts: Optimization of extraction parameters. *Journal of Food Science*, 86 : 3122-3136.

Puri M, Sharma D et Barrow CJ. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30 : 37-44.

Rahman AM, Yin W, Kadi AA et Jahng Y. 2020. Galeon: A Biologically Active Molecule with In Silico Metabolite Prediction, In Vitro Metabolic Profiling in Rat Liver Microsomes, and In Silico Binding Mechanisms with CYP450 Isoforms. *Molecules*, 25 : 5903.

Ranveer RC, Patil SN et Sahoo AK. 2013. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food and Bioprocess Processing*, 91 : 370-375.

Rosenthal A, Pyle DL et Niranjana K. 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and microbial technology*, 19 : 402-420.

Sekhon-Loodu S et Rupasinghe HV. 2019. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. *Frontiers in nutrition*, 6 : 53.

Shahidi F, Varatharajan V, Oh WY et Peng H. 2019. Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects. *Food Bioact*, 5 : 57-119.

Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG et Kvetnaya AS. 2008. Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22 : 252-253.

Sik B, Hanczné EL, Kapcsándi V et Ajtony Z. 2020. Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184 : 113173.

Silva BJ, Seca AM, Barreto MdC et Pinto DC. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. *International journal of molecular sciences*, 16 : 17160-17180.

Simion FA. 2001. Acnegenicity and comedogenicity testing for cosmetics. Dans : *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. CRC Press, p. 853-860.

Simpson MJ, MacIntosh DF, Cloughley JB et Stuart AE. 1996. Past, present and future utilisation of *Myrica gale* (*Myricaceae*). *Economic botany* : 122-129.

Singleton VL et Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16 : 144-158.

Skene KR, Sprent JI, Raven JA et Herdman L. 2000. *Myrica gale* L. *Journal of Ecology*, 88 : 1079-1094.

Small E. 2013. *North American cornucopia: top 100 indigenous food plants*. CRC Press.

Small E et Catling P. 2007. BLOSSOMING TREASURES OF BIODIVERSITY: 25. Sweet Gale—new products from an ancient beer plant. *Biodiversity*, 8 : 27-32.

Smith HH. 1933. Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians, *Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee* 7:1-230 : page 121.

Sowbhagya H et Chitra V. 2010. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50 : 146-161.

Statistique Canada. 2020. *Un aperçu des ressources forestières du Canada*. Gouvernement du Canada.

Stuart A. 1998. The anti-fungal effect of oil distilled from the leaves of *Myrica gale*. *Planta Medica*, 64 : 389-389.

Svoboda KP, Inglis A, Hampson J, Galambosi B et Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. *Flavour and Fragrance Journal*, 13 : 367-372.

Sylvestre M, Legault J, Dufour D et Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12 : 299-304.

Ting Y-C, Ko H-H, Wang H-C, Peng C-F, Chang H-S, Hsieh P-C et Chen I-S. 2014. Biological evaluation of secondary metabolites from the roots of *Myrica adenophora*. *Phytochemistry*, 103 : 89-98.

Turner NJ, John Thomas, Barry F. Carlson and Robert T. Ogilvie. 1983. Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island, Victoria. *British Columbia Provincial Museum* : page 102.

Vardakas AT, Shikov VT, Dinkova RH et Mihalev KM. 2021. Optimisation of the enzyme-assisted extraction of polyphenols from saffron (*crocus sativus* L.) tepals. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 20.

Verberg S. 2022. Reconstructing Medieval Gruit Beer: Separating Facts from Fiction. Dans : *Beer and Brewing in Medieval Culture and Contemporary Medievalism*. Springer, p. 57-92.

Wang S, Mathiesen L, Halvorsen B, Malterud K et Sund R. Inhibition of lipid peroxidation in human LDL by the flavonoid myricetin and ascorbic acid. Dans : *Norwegian Society for Pharmacology, Winter Meeting 1995, Abstract*, 1995.

Wawrzyńczyk K, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M et Kalemba D. 2021. Composition and Antimicrobial Activity of *Myrica gale* L. Leaf and Flower Essential Oils and Hydrolates. *Records of Natural Products*, 15.

Wetzel S, Duchesne LC et Laporte MF. 2006. Nutraceuticals from the forest. *Bioproducts from Canada's forests: New Partnerships in the Bioeconomy* : 113-130.

Wijesinghe W et Jeon Y-J. 2012. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia*, 83 : 6-12.

Womani HM, Ndjouenkeu R, Kapseu C, Mbiapo FT, Parmentier M et Fanni J. 2008. Aqueous enzymatic oil extraction from *Irvingia gabonensis* seed kernels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 : 232-238.

Wypych G. 2019. *Handbook of Solvents, Volume 2: Use, Health, and Environment*. Elsevier.

Yang Y-C, Li J, Zu Y-G, Fu Y-J, Luo M, Wu N et Liu X-L. 2010. Optimisation of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity. *Food chemistry*, 122 : 373-380.

Yara-Varón E, Li Y, Balcells M, Canela-Garayoa R, Fabiano-Tixier A-S et Chemat F. 2017. Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*, 22 : 1474.

Zhao S, Baik O-D, Choi YJ et Kim S-M. 2014. Pretreatments for the efficient extraction of bioactive compounds from plant-based biomaterials. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54 : 1283-1297.

Zhou Z, Shao H, Han X, Wang K, Gong C et Yang X. 2017. The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila* L. barks by trienzyme-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 97 : 401-408.