

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité : Chimie organique

Option : Phytochimie

Par

M^{elle} BOUTAOUI Nassima

THEME

**CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE, ACTIVITE BIOLOGIQUE ET
ANTICORROSION DE DEUX PLANTES MEDICINALES ALGERIENNES :
THYMUS ALGERIENSIS BOISS & REUT ET *ATRIPLEX MOLLIS* DESF**

Devant le jury :

M^{ame}. BENAYACHE Fadila	Prof, U. des frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
M^r. ZAITER Lahcene	Prof, U. des frères Mentouri, Constantine 1	Directeur et rapporteur
M^r. LOCATELLI Marcello	Prof, U. Gabriel d'Annunzio, Chieti-Pescara	Examineur
M^r. SEGHIRI Ramdane	Prof, U. des frères Mentouri, Constantine 1	Examineur
M^r. ALYANE Mohamed	MCA, ENS de Biotechnologie, Constantine	Examineur
M^r. FERKHI Mosbah	Prof, U. Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel	Examineur

Soutenu le 17/01/2019

Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, et avec un vaste cœur plein de joie, je tiens à dédier ce modeste travail :

À mes très chers parents qui m'ont soutenue et encouragée durant toute la période de mes études et à qui je souhaite une longue et heureuse vie.

À ma chère sœur: Sabah.

À mes chers frères : Nedjmeddine, Mustapha, Zakaria.

À ma famille.

À tous mes amis et collègues.

À tous ceux qui m'aiment.

À tous ceux que j'aime.

Nassima

Remerciements

*A*vant toute chose, je remercie Dieu, le tout-puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Ce travail de recherche a été effectué dans l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (**VARENBIOMOL**), Faculté des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri Constantine 1, sous la direction du professeur **Ramdane Seghiri**.

*M*es remerciements les plus sincères en direction de Monsieur **Lahcene ZAITER** professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordée sa confiance que pour m'avoir guidée dans mon travail tout au long de ces années. Ses conseils, ses commentaires aussi sa bienveillance et son humour qui m'ont été fort utiles.

*J*e remercie sincèrement Madame le Professeur **Fadila BENAYACHE**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour ses encouragements, pour ses précieux conseils, ses critiques constructives aussi pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

*U*n grand merci à monsieur le professeur **Samir BENAYACHE**, Professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine 1, pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

*J*e tiens vivement à remercier Monsieur le Professeur **Marcello LOCATELLI**, professeur à l'école de Pharmacie à l'université Chieti-Pescara, Italie, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de la confiance qu'il m'a accordé et aussi pour son encadrement exemplaire, sa sympathie, sa rigueur scientifique, ses conseils et ses encouragements et pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de prendre part au jury de soutenance de ma thèse de doctorat.

*M*es remerciements et ma reconnaissance vont particulièrement à **Simone CARRADORI** et **Ligui MENGUINI**, professeurs à l'université Chieti-Pescara Italie, pour l'intérêt qu'ils ont

porté à mon travail durant mon stage, pour leur gentillesse, et pour leur participation aux différentes extractions réalisées dans ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Pierre CHALARD** maître de conférences à l'école nationale supérieure de chimie de Clermont-Ferrand, à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour la réalisation de l'analyse de l'huile essentielle.

*J'*exprime mes sincères remerciements aux professeurs **Mesbah LAHOUEL** et **Farida BOUREMMAD** (Université de Jijel), pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires, pour leur aide et disponibilité en me permettant la réalisation des activités anti-inflammatoire, effet diurétique et activité anticorrosion.

Je remercie vivement madame **Souad AMEDDAH** professeure à l'université Frères Mentouri, Constantine 1 et leurs équipes de recherche, pour la réalisation des essais biologiques.

*J'*aimerais également remercier vivement le Professeur **Ramdane SEGHIRI** (Université des frères Mentouri-Constantine1), monsieur **Mohammed ALYANE** (Maître de conférence à l'école nationale supérieure de Constantine), Monsieur le professeur **Mosbah FERKHI** (Université de Jijel) pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je voudrais également remercier les ingénieurs de notre unité de recherche : monsieur **Hichem HAZMOUNE** et madame **Naouel TEBBOUB** pour leur aide et leur disponibilité.

Un merci tout particulier à toute l'équipe de chercheurs de notre unité de recherche VARENBIOMOL qui m'ont apporté tout au long de ma thèse, joie et sérénité. Je cite en particulier : **Widad, Randa, Houria, Djihen, Nihed, Chahrazed, Laila, Hanane, Wassila, Ferial, Naima, Halima, Imed, Thamere, Hamama, Tarek.....**, merci à vous tous.

Enfin je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Liste des abréviations

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

µg	microgramme.
µl	microlitre.
µm	micromètre.
AAR	Activité Antioxydante Relative.
ADN	Acide Désoxyribonucléique.
AINS	Anti Inflammatoire Non Stéroïdien.
AIS	Anti Inflammatoire Stéroïdien.
ARN	Acide Ribonucléique.
ATB	Antibiotique.
AUG	Augmentation.
BHA	Hydroxyanysol butylé.
BHT	Butyryl hydroxytoluène.
C	Concentration.
C	Celsius.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
C_{dl}	Capacité de la double couche.
CE	Contre Electrode.
cm	centimètre.
Corr	Corrosion.
COX	Cyclo-Oxygénase.
CPE	Elément constant de phase.
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse.
CR	Contre électrode.
DAD	Détecteur à Diode.
DPPH	2,2- Diphényle-1-picrylhydrazil.
E_{corr}	Potentiel de corrosion.
EI	Efficacité Inhibitrice.
ER	Electrode de Référence.
ET	Electrode de travail.
F	Faraday.
g	gramme.
Gal	Galactose.
GC	Gaz Chromatography.
GC/MS	Gaz Chromatography-Mass- Spectrometry.
GC-FID	Gaz Chromatography Mass Spectrometry- Flamme Ionisation Détector.
GHZ	Giga hertz.
Glc	Glucose.
h	heure.
HCTZ	Hydrochlorothiazide.
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance.
IC₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%.

I_{corr}	Densité de courant de corrosion.
INH	Inhibition.
kg	Kilogramme.
KI	Indice de Kovat.
KW	Kilo watt.
L	Litre
M	Molaire.
MAE	Microwaves Assisted Extraction.
mg	milligramme.
MHA	Mueller Hinton Agar.
MHZ	Méga hertz.
min	minute.
ml	millilitre.
mM	milli mole.
mm	millimètre
MPa	Méga Pascal.
mV	millivolt.
N	Normale.
nm	nanomètre.
PDA	Photo Diode Array Detector .
ppm	partie par million.
Rham	Rhamnose.
R_p	Résistance de polarisation.
R_{tc}	Résistance de transfert de charge.
SFE	Supercritic Fluid Extraction.
SIE	Spectroscopie d'Impédance Electrochimique.
SM	Spectroscopie de Masse.
TR	Temps de Rétention.
UV	Ultra-Violet.
UV-Vis	Ultraviolet visible.
Vit C	Vitamine C.
β_a	Pente anodique de Tafel.
β_c	Pente cathodique de Tafel.
λ	longueur d'onde.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : Etude bibliographique.

Figure I.1: Structure du noyau phénol.....	5
Figure I.2 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.....	9
Figure I.3 : Squelette de base des flavonoïdes.....	10
Figure I.4 : Des exemples des structures chimiques des flavonols.....	10
Figure I.5 : Des exemples des structures chimiques des flavones.....	11
Figure I.6 : Des exemples des structures chimiques des flavanones.....	11
Figure I.7 : exemples des structures chimiques des flavan-3-ols.....	12
Figure I.8 : Exemples des structures chimiques des isoflavones.....	13
Figure I.9 : Exemples des structures chimiques des anthocyanes.....	13
Figure I.10 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallo-tanin (1, 2, 3-tri-O-galloyl- β -D-glucose).....	14
Figure I.11 : Structure de base des terpénoïdes.....	15
Figure I.12 : Exemples de quelques monoterpènes.....	16
Figure I.13 : Exemples de quelques sesquiterpènes.....	17
Figure I.14 : Exemples de composés aromatiques.....	17
Figure I.15 : structure des chlorophylles a et b	19
Figure I.16 : structure chimique du α -carotène et du β -carotène.....	20
Figure I.17 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	24
Figure I.18 : Représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique	25
Figure I.19 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols.....	43
Figure I.20 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	44
Figure I.21 : Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée.....	44
Figure I.22 : Réaction du radical DPPH avec un phénol.....	45
Figure I.23 : Adsorption d'un inhibiteur organique sur la surface métallique en milieu aqueux.....	54
Figure I.24 : Courbe de polarisation et droites de Tafel d'un système redox à l'équilibre.....	55
Figure I.25 : Diagramme de Nyquist (spectre d'impédance électrochimique).....	57

CHAPITRE II : Description des travaux personnels.

Figure II.1 : Photo de la plante <i>Thymus Algeriensis</i> Boiss et Reut.....	68
Figure II.1 : Photo de la plante <i>Atriplex mollis</i> Desf.....	68
Figure II.3 : Localisation géographique des sites de récolte en Algérie des plantes étudiées.....	69
Figure II.4 : Schéma du montage utilisé par entraînement à la vapeur	73
Figure II.5 : Organigramme d'extraction.....	75
Figure II.6 : extraction et fractionnement de <i>T.algeriensis</i>	77
Figure II.7 : Extraction et fractionnement de l'espèce <i>Atriplex mollis</i>	78
Figure II.8 : Extracteur Biotage Initiator TM 2.0 automatique.....	79
Figure II.9 : Extracteur à fluide supercritique	80
Figure II.10 : Courbe d'étalonnages de l'acide gallique de l'espèce <i>T.algeriensis</i>	87
Figure II.11 : Courbe d'étalonnages de l'acide gallique de l'espèce <i>A.mollis</i>	87
Figure II.12 : Courbe d'étalonnages de la rutine.....	88
Figure II.13 : Courbe d'étalonnages de la quercétine.....	89
Figure II.14 : Boîtes de Pétri des quatres souches bactériennes utilisées après incubation d'extrait n-butanol (BETA et BEAM) des deux espèces.....	92
Figure II.15 : Mesure de l'œdème.....	94
Figure II.16 : La collection des urines.....	95

CHAPITRE III : Résultats et discussion.

Figure III.1 : Diagramme représentatif des différents groupes chimiques présents dans l'huile essentielle du <i>T.algeriensis</i>	106
Figure III.2 : Les constituants majoritaires de l'huile essentielle de l'espèce étudiée.....	107
Figure III.3 : chromatogramme du mélange des standards utilisés.....	109
Figure III.4 : Les structures chimiques des standards utilisés.....	110
Figure III.5 : Chromatogramme des extraits obtenus par macération.....	115
Figure III.6 : Effet de solvant sur la teneur des polyphénols.....	118
Figure III.7 : Chromatogrammes des extraits MEA de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	122
Figure III.8 : Teneur en polyphénols des extraits MAE.....	125
Figure III.9 : Influence du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols.....	126
Figure III.10 : Influence du solvant sur la teneur en polyphénols.....	127
Figure III.11 : Chromatogrammes des extraits SFE de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	129

Figure III.12 : Influence de la pression sur la teneur en polyphénols.....	130
Figure III.13 : Concentrations des pigments détectés dans <i>T.algeriensis</i>	132
Figure III.14 : Teneur de l'extrait n-BuOH en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	134
Figure III.15 : Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait n-BuOH de <i>T.algeriensis</i> de BHT et BHA.	135
Figure III.16 : Valeurs de l'IC50 de l'extrait n-BuOH de <i>T.algeriensis</i> et des standards....	136
Figure III.17 : Test de blanchissement de β -carotène.....	137
Figure III. 18 : Effets de l'extrait BETA sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez les rats.....	139
Figure III. 19 : Pourcentage d'inhibition de l'inflammation par l'extrait BETA et le Diclofénac.....	140
Figure III. 20 : Variation de la diurèse en fonction du temps après administration de l'extrait n-butanol par voie orale à la dose de 50ml/Kg.....	142
Figure III.21 : Variation du pH urinaire.....	142
Figure III.22 : Variations de $[Na^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	143
Figure III. 23 : Variations de $[K^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	144
Figure III. 24 : Variations de $[Ca^{2+}]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	145
Figure III.25 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentration de l'inhibiteur (Extrait n-butanol de <i>T.algeriensis</i>).....	146
Figure III. 26 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.....	147
Figure III. 27: Les courbes de Nyquist de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.....	149
Figure III.28 : Circuit équivalent utilisé déterminant les spectres d'impédance.....	150
Figure III.29: chromatogramme du mélange des standards utilisés.....	152
Figure III.30: les structures chimiques des standards utilisés.....	153
Figure III.31: Les chromatogrammes HPLC-PDA des extraits obtenus par macération à 280 nm pour des raisons de clarté.....	158
Figure III.32 : Influence du solvant sur la teneur des polyphénols.....	161
Figure III.33 Les chromatogrammes HPLC-PDA (280 nm) des différents extraits obtenus par	

extraction assistée par micro-ondes.....	164
Figure III.34 : Effet de la température sur la teneur des polyphénols.....	166
Figure III.35: Influence du temps d'extraction sur la teneur des polyphénols.....	167
Figure III.36: Chromatogrames HPLC/PDA des deux extraits obtenus par SFE à 280 nm.....	170
Figure III.37 : Influence de la pression sur la teneur des polyphénols.....	171
Figure III.38: Teneur en pigments des parties aériennes de l'espèce <i>A. Mollis</i>	173
Figure III.39 : Teneur de l'extrait n-BuOH en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	174
Figure III.40 : Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait <i>n</i> -BuOH de l'espèce <i>Atriplex mollis</i> (BEAM) et les standards.....	175
Figure III.41 : l'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait (BEAM).....	176
Figure III. 42 : Effets de l'extrait BEAM sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez les rats.....	178
Figure III. 43 : Pourcentage d'inhibition de l'inflammation par l'extrait n-butanol de l'espèce <i>A.mollis</i> et le Diclofénac.....	179
Figure III. 44 : Variation de la diurèse en fonction du temps après administration par voie orale des différents extraits à la dose de 50ml/kg.....	180
Figure III.45 : Variation du pH urinaire.....	181
Figure III. 46 : Variations de [Na ⁺] urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	181
Figure III. 47 : Variations de [K ⁺] urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	182
Figure III. 48 : Variations de [Ca ²⁺] urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg.....	183
Figure III.49 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentration de l'inhibiteur (Extrait n- butanol <i>d'Atriplex mollis</i>).....	184
Figure III.50: Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.....	185
Figure III. 51: Les courbes de Nyquist de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.....	187
Figure III. 52 : Circuit équivalent utilisé pour déterminer les spectres d'impédance.....	188

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : Etude bibliographique

Tableau I.1 : Les principales classes des composés phénoliques.....	5
Tableau I.2 : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	7
Tableau I.3 : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	7
Tableau I.4 : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.....	8
Tableau I.5 : Classification des triterpènes.....	15
Tableau I.6 : Caractéristiques physico-chimiques des chlorophylles a et b.....	19
Tableau I.7 : Les coefficients d'absorption spécifique (α) des chlorophylles dans trois différents solvants.....	21
Tableau I.8 : Equations de détermination des concentrations des pigments foliaires.....	22
Tableau I.9 : Localisation des principales espèces de genre <i>Thymus</i> en Algérie.....	28
Tableau I.10 : Exemples des flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre <i>Thymus</i> en Algérie.....	30
Tableau I.11 : Quelques monoterpènes glycosylés isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	34
Tableau I.12 : Localisation des principales espèces d' <i>Atriplex</i> en Algérie.....	37
Tableau I.13 : Exemples des saponines isolés de différentes espèces du genre <i>Atriplex</i>	38

CHAPITRE II : Description des travaux personnels

Tableau II.1 : Programme d'élution de la colonne.....	84
Tableau II.2 : regroupe les standards utilisés avec leurs temps de rétention et leurs longueurs d'ondes.....	85
Tableau II.3 : La composition chimique de l'acier 316L.....	97

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Tableau III.1 : Résultats des criblages phytochimique de <i>Thymus algeriensis</i>	102
Tableau III.2 : Rendement des extraits.....	103
Tableau III.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i>	103
Tableau III.4 : Les principaux composés de l'HE de <i>T.numidicus</i> provenant de différentes régions.....	108
Tableau III.5 : L'analyse HPLC-PDA des différents extraits du <i>T.algeriensis</i> obtenus par	

extraction hydroalcoolique et des sous-fractions.....	113
Tableau III.6 : L'analyse HPLC-PDA des différents extraits du <i>T.algeriensis</i> obtenus par extraction assistée pas micro-ondes.....	120
Tableau III.7 : La composition chimique des extraits obtenus par fluide supercritique.....	128
Tableau III.8 : Concentration des pigments dans l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	131
Tableau III.9 : Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait n-butanol de <i>T.algeriensis</i>	138
Tableau III.10 : L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	146
Tableau III.11 : Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	148
Tableau III.12 : Les paramètres d'impédance électrochimique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	149
Tableau III.13 : Rendement des extraits.....	151
Tableau III.14 : Le profil phénolique des différents extraits de l'espèce <i>A.mollis</i> obtenus par extraction hydroalcoolique analysé par HPLC-PDA.....	156
Tableau III.15 : Composition chimique des extraits polaires de l'espèce <i>Atriplex molli</i>	162
Tableau III.16 : Le profil phénolique des différents extraits de l'espèce <i>A.mollis</i> obtenus par SFE analysé par HPLC-PDA.....	168
Tableau III.17 : Détermination des pigments (Caroténoïdes Totaux, Chlorophylle a et Chlorophylle b.....	172
Tableau III.18 : Activité antimicrobienne de l'extrait butanolique à différentes concentrations.....	177
Tableau III.19 : L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	184
Tableau III.20 : Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	186
Tableau III.21 : Les paramètres d'impédance électrochimique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.....	187

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
Références bibliographiques.....	3

CHAPITRE I: Etude bibliographique

A. Plantes médicinales et métabolites secondaires.....	4
1. Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales.....	4
1.1. Utilisation des plantes médicinales ou phytothérapie.....	4
1.2. Principales méthodes de préparation des plantes médicinales.....	4
2. Métabolites secondaires	5
2.1. Les polyphénols.....	5
2.1.1. Classification des polyphénols.....	6
2.1.1.1. Les non flavonoïdes.....	6
2.1.1.2. Flavonoïdes.....	9
2.1.1.3. Les tannins.....	14
2.2. Les terpènes.....	14
2.3. Les huiles essentielles.....	15
2.3.1. Définition.....	15
2.3.2. Composition Chimique des Huiles Essentielles.....	16
2.3.3. Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles.....	17
3. Les pigments foliaires.....	18
3.1. La chlorophylle.....	18
3.2. Les caroténoïdes.....	19
3.3. Détermination des concentrations des pigments foliaires.....	20
4. Techniques d'extraction.....	22
4.1. Techniques d'extraction classiques.....	22
4.1.1. Extraction liquide-liquide et Macération.....	22
4.1.2. Hydrodistillation.....	23
4.2. Techniques d'extraction modernes.....	23
4.2.1. Extraction assistée par micro-onde.....	23
4.2.2. Extraction à fluide supercritique.....	24

5. Les méthodes d'identification et de quantification	25
5.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS).....	25
5.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	26
6. Monographie des plantes étudiées.....	26
6.1. La famille des Lamiacées.....	26
6.1.1. Généralités sur la famille des Lamiacées.....	26
6.1.2. Systématique de la famille des Lamiacées.....	27
6.1.3. Le genre <i>Thymus</i>	28
6.1.3.1. Description du genre <i>Thymus</i>	28
6.1.3.2. Origine et répartition géographique du genre <i>Thymus</i>	28
6.1.3.3. Travaux antérieurs et usages thérapeutique du genre <i>Thymus</i>	29
6.1.3.4. Usage et propriétés du <i>Thym</i>	35
6.2. La famille des Chénopodiacées.....	35
6.2.1. Généralité sur la famille des Chénopodiacées.....	35
6.2.2. Classification taxonomique de la famille chénopodiacées.....	36
6.2.3. Le genre <i>Atriplex</i>	36
6.2.3.1. Description du genre <i>Atriplex</i>	36
6.2.3.2. Origine et répartition géographique du genre <i>Atriplex</i>	37
6.2.3.3. Travaux antérieurs du genre <i>Atriplex</i>	37
6.2.3.4. Intérêt des <i>Atriplex</i>	41
B. Activité biologiques	42
1. Activité antioxydante.....	42
1.1. Qu'es ce qu'un radical libre ?.....	42
1.2. Polyphénols naturels comme antioxydants.....	43
1.2.1. Piégeage des radicaux libres.....	43
a. Test au DPPH.....	45
b. Test de blanchissement du β -carotène.....	45
2. Activité anti-inflammatoire.....	45
2.1. L'inflammation.....	45
2.2. Les polyphénols comme des anti-inflammatoire.....	46
2.3. Mécanisme de la réaction inflammatoire.....	46
2.4. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires.....	46
3. Activité diurétique.....	47

3.1. Les diurétiques.....	47
3.2. Mode d'action des diurétiques	47
3.2.1. Diurétiques thiazidiques.....	47
3.2.2. Diurétiques de l'anse de Henlé.....	47
3.2.3. Diurétiques épargnant le potassium.....	48
3.2.4. Diurétiques inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.....	48
3.2.5. Diurétiques osmotiques.....	48
4. Activité antibactérienne.....	48
4.1. Généralités.....	48
4.2. Culture des bactéries.....	49
4.3. Les antibiotiques.....	49
4.3.1. Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	49
4.3.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide.....	50
C. Activité anti-corrosion.....	50
1. Définition de la corrosion.....	50
2. Potentiel d'électrode et corrosion.....	51
3. Taux de corrosion et polarisation.....	51
4. Inhibiteurs de corrosion dans des milieux acides.....	52
4.1. Inhibiteurs organiques.....	52
4.2. Inhibiteurs inorganiques.....	52
4.3. Produits naturels comme inhibiteurs de corrosion des métaux en milieu corrosif.....	53
4.4. Comportement des inhibiteurs de corrosion dans des milieux acides.....	53
5. Méthodes d'étude des inhibiteurs de corrosion.....	54
5.1. Méthodes stationnaires : courbes de polarisation	54
5.2. Méthodes transitoires: la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	56
6. Modes d'expression de l'efficacité d'un inhibiteur de corrosion.....	57
Références bibliographique.....	58

CHAPITRE II : Description des travaux personnels.

1. Introduction.....	66
2. Critères de sélection des plantes.....	66
3. Place dans la systématique.....	66
3.1. L'espèce <i>Thymus algeriensis</i> Boiss & Reut.....	66

3.2. L'espèce <i>Atriplex mollis</i> Desf.....	67
4. Description et répartition géographique.....	67
4.1. L'espèce <i>Thymus algeriensis</i> Boiss & Reut.....	67
4.2. L'espèce <i>Atriplex mollis</i> Desf.....	68
5. Etude bibliographique.....	69
6. Récolte du matériel végétal.....	69
7. Préparation des échantillons.....	70
A. Etude qualitative et quantitative des parties aériennes des espèces étudiées...	70
1. Screening phytochimique.....	70
2. Procédure d'extraction.....	73
2.1. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur	73
2.2. Extraction hydroalcoolique (Macération).....	74
2.2.1. Fractionnement des extraits.....	76
2.3. Extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	79
2.4. Extraction par fluide supercritique (SFE).....	80
2.5. Extraction des pigments foliaires.....	81
3. Analyses qualitative et quantitative.....	81
3.1. Analyses chromatographiques par GC des huiles essentiels.....	81
3.1.1. Analyse (GC-FID).....	81
3.1.2. Analyse (GC/MS).....	82
3.2. Analyses chromatographique des extraits par HPLC/PDA.....	82
3.2.1. Les standards analytiques utilisés.....	82
3.2.2. Mode opératoire	83
B. Evaluation de l'activité biologique.....	86
1. Matériel Végétal.....	86
2. Etude pharmacologique in vitro.....	86
2.1. Activité antioxydante.....	86
2.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	86
2.1.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	86
2.1.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	88
2.1.2. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH.....	89
2.1.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	89
2.2. Activité antibactérienne.....	91

2.2.1. Méthode et matériels.....	91
2.2.2. Lecture.....	91
3. Etude pharmacologique in vivo	92
3.1. Les animaux.....	92
3.2. Préparation des solutions administrées.....	92
3.3. Activité anti-inflammatoire	92
3.3.1. Protocole expérimental	92
3.3.1.1. Prétraitement par les extraits	92
3.3.1.2. Induction de l'inflammation.....	93
3.3.1.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	93
3.4. L'effet diurétique.....	94
3.4.1. Protocole expérimentale.....	94
3.4.2. Etude de l'influence des extraits sur le pH, les taux de sodium, potassium, et calcium dans les urines.....	95
C. Activité anticorrosion.....	96
1. Introduction.....	96
2. Matériels et méthodes.....	96
1.1. Inhibiteur utilisé.....	96
1.2. Matériel utilisé.....	97
1.3. Milieu corrosif.....	97
3. La mesure de perte de masse.....	97
4. Les mesures électrochimiques.....	97
3.1. Les courbes de polarisation.....	97
3.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS).....	98
Référence bibliographiques.....	99

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Partie 1 : L'espèce *Thymus algeriensis* Boiss & Reut.

A. Caractérisation phytochimique des parties aériennes de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i> Boiss & Reut.....	102
1. Criblage phytochimique.....	102
2. Rendement d'extraction.....	102

3. Analyses qualitative et quantitative	103
3.1. Analyses chromatographiques par GC des huiles essentiels de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	103
3.2. Profil des polyphénols par la méthode HPLC/PDA	109
3.2.1. Le profil des polyphénols des sous fractions des extraits obtenus par macération.....	113
3.2.2. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction assistée par micro-ondes	119
3.2.3. Profils des polyphénols obtenus par extraction par fluide supercritique.....	127
3.3. Détermination des pigments foliaires (chl a, chl b et caroténoïdes).....	131
Conclusion de la partie A.....	132
B. Evaluation de l'activité biologique.....	134
1. Etude pharmacologique <i>in vitro</i>	134
1.1 Activité antioxydante.....	134
1.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	134
1.1.2. Effet scavenger du radical DPPH.....	135
1.1.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	136
1.2. L'activité bactérienne.....	138
2. Etude pharmacologique <i>in vivo</i>	139
2.1. L'activité anti-inflammatoire.....	139
2.2. L'effet diurétique.....	141
2.2.1. Variation de la diurèse en fonction du temps.....	141
2.2.2. Valeurs du pH urinaire.....	142
2.2.3. Variations de la concentration des ions Na^+ urinaires.....	143
2.2.4. Variations de la concentration des ions K^+ urinaires.....	144
2.2.5. Variations de la concentration des ions Ca^{2+} urinaires.....	145
Conclusion de la partie B.....	145
C. Activité anticorrosion.....	146
1. La perte de masse.....	146
2. Les mesures électrochimiques.....	147
2.1. La polarisation potentiodynamique.....	147
2.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)	148
Conclusion	150

Partie 2 : L'espèce *Atriplex mollis* Desf.

A. Caractérisation phytochimique de l'espèce <i>Atriplex mollis</i> Desf.	151
1. Rendement d'extraction	151
2. Analyse qualitative et quantitative	151
2.1. Profil des polyphénols par la méthode HPLC/PDA	151
2.1.1. Le profil des polyphénols des sous fractions des extraits obtenus par macération	155
2.1.2. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction assistée par micro-ondes	161
2.1.3. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction à fluide supercritique	168
2.2. Analyses des caroténoïdes et des Chlorophylles par spectrophotomètre	172
Conclusion	173
B. Evaluation de l'activité biologique	174
1. Etude biologique <i>in vitro</i>	174
1.1. Activité antioxydante	174
1.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux	174
1.1.2. Effet scavenger du radical DPPH	175
1.1.3. Test de blanchissement du β -carotène	176
1.2. Activité antibactérienne	176
2. Etude biologique <i>in vivo</i>	177
2.1. Activité anti-inflammatoire	177
2.2. Evaluation de l'effet diurétique	179
2.2.1. Variation de la diurèse en fonction du temps	179
2.2.2. Valeurs du pH urinaire	180
2.2.3. Variations de la concentration des ions Na^+ urinaires	181
2.2.4. Variations de la concentration des ions K^+ urinaires	182
2.2.5. Variations de la concentration des ions Ca^{2+} urinaires	183
Conclusion	183
III- Activité anticorrosion	184
1. Mesure de la perte de masse	184
2. Mesures électrochimique	185

2.1. La polarisation potentiodynamique.....	185
2.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)	186
Conclusion.....	188
Références bibliographique.....	189
CONCLUSION GENERALE.....	197
RESUME	

Les articles publiés

1. Boutaoui, N.; Zaiter, L.; Benayache, F.; Benayache, S.; Carradori, S.; Cesa, S.; Giusti, A.M.; Campestre, C.; Menghini, L.; Innosa, D.; Locatelli M. Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules* 2018, 23, 463 ; [doi:10.3390/molecules23020463](https://doi.org/10.3390/molecules23020463).

2. Boutaoui N., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Cacciagrano F., Cesa S., Secci D., Carradori S., Giusti A.M., Campestre C., Menghini L., Locatelli M. *Atriplex mollis* Desf. Aerial Parts: Extraction Procedures, Secondary Metabolites and Color Analysis. *Molecules* 2018, 23, 1962; [doi:10.3390/molecules23081962](https://doi.org/10.3390/molecules23081962).

INTRODUCTION



Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents [1].

Les techniques traditionnelles d'extraction de ces constituants naturelles à partir des plantes nécessitent d'importantes adaptations afin de réduire les risques pour la santé, la sécurité et l'environnement. En conséquence, la recherche de produits et de procédés alternatifs plus respectueux de l'homme et de son environnement occupent une place primordiale en recherche et développement, y compris en ce qui concerne des opérations unitaires du génie chimique avec les technologies séparatives associées telle que l'extraction solide-liquide.

Pour répondre aux besoins des différentes industries qui doivent satisfaire à la fois les demandes économiques changeantes et le respect de l'environnement tout en restant mondialement compétitives, des approches scientifiques modernes du génie chimique et des procédés ont vu le jour. Il s'agit par exemple de «l'approche verte du génie des procédés» et de «l'éco-extraction» et ses principes [2,3] qui sont fortement mobilisées sur l'intensification des procédés et sur le couple produits/procédés verts. Le but est de produire beaucoup plus et mieux en consommant beaucoup moins, avec des technologies innovantes conduisant à une meilleure utilisation des matières premières et de l'énergie.

Notre objectif principal consiste en l'application des nouvelles technologies d'extraction, telle que l'utilisation de dioxyde de carbone à l'état supercritique, qui a une densité graduable, une diffusivité relativement élevée et une faible viscosité [4] et l'application des micro-ondes qui augmente la cinétique d'extraction, réduit le temps d'extraction et les déchets de solvant, favorise un taux d'extraction plus élevé et permet de réaliser des économies de coûts par rapport aux méthodes classiques [5].

Après chaque extraction, les extraits obtenus ont été analysés par une méthode HPLC-PDA validée [6]. Certains paramètres ont été optimisés afin d'améliorer le profil du motif phénolique.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche du laboratoire et consiste à effectuer des différentes extractions, une caractérisation phytochimique des métabolites secondaires, des activités biologiques et activité anticorrosion de deux plantes médicinales algériennes appartenant aux familles des Lamiacées et Chénopodiacées: il s'agit de *Thymus algeriensis* Boiss & Reut et *Atriplex mollis* Desf. Toute deux endémiques en l'Algérie.

Ce manuscrit est réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une recherche bibliographique sur les genres étudiés, comportant les présentations botaniques et phytochimiques, les différentes classes de métabolites secondaires les plus connus, les différentes méthodes d'extraction, ainsi que les activités réalisées sur ces deux espèces.

Au niveau **du second chapitre** nous décrivons le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail notamment :

- ✓ Les tests de criblage phytochimique de l'espèce *Thymus algeriensis*.
- ✓ L'extraction des huiles essentielles, des polyphénols et des pigments par différentes extractions.
- ✓ L'analyse quantitative et qualitative par chromatographie GC-MS et HPLC et spectrophotomètre.
- ✓ L'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne (in vitro) des extraits n-butanol des deux espèces étudiées.
- ✓ L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et effet diurétique (in vivo) des extraits n-butanol des deux espèces.
- ✓ L'étude de l'activité anticorrosion des extraits n-butanol.

Dans **le troisième chapitre** nous analysons les résultats obtenus renfermant l'analyse qualitative et quantitative des différents extraits obtenus ainsi que l'évaluation des activités biologiques et l'activité anticorrosion.

Au terme de ce travail, nous présenterons une conclusion générale dans laquelle nous rappellerons les principaux résultats obtenus.

Enfin, nous exposant les références bibliographiques ainsi qu'une section consacrée articles publiés par ce travail.

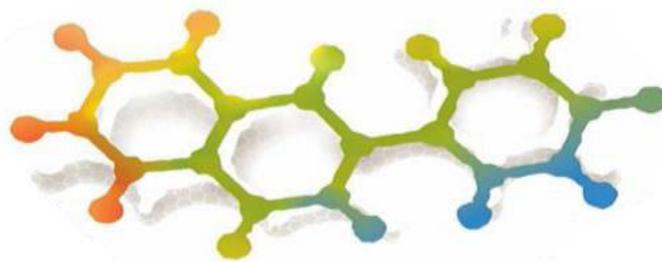
Les travaux réalisés à travers cette thèse ont été couronnés par deux publications parus et une autre qui est en cour de finalisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hostettmann K , Potterat O , Wolfender J L. The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia*. 1998; 52: 10-17.
- [2] Chemat F, Abert Vian M, Cravotto G, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012 ; 13 : 8615-8627.
- [3] Chemat F, Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris, 2011.
- [4] Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker S D. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol. Biol.* 2012; 864: 89–115.
- [5] Silva R P,Rocha-Santos T A, Duarte A C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends Analyt. Chem.* 2016; 76 : 40–51.
- [6] Diuzheva A, Carradori S,Andruch V, Locatelli M, De Luca E, Tiecco M, Germani R, Menghini L, Nocentini A, Gratteri P. Use of innovative (micro) extraction techniques to characterize *Harpagophytum procumbens* root and its commercial food supplements. *Phytochem. Anal.* 2018; doi:10.1002/pca.2737.

CHAPITRE I

Etude bibliographique



A- Plantes médicinales et métabolites secondaires

1. Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales

1.1. Utilisation des plantes médicinales ou phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement".

La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes [1], qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe.

Depuis 1987, la phytothérapie est reconnue à part entière par l'Académie de médecine.

Il est important de ne pas confondre cette discipline avec la phytopharmacie qui, quant à elle, désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes, à savoir les pesticides, fongicides, herbicides, ou encore insecticides [1].

1.2. Principales méthodes de préparation des plantes médicinales

Pendant longtemps, les plantes ont été utilisées uniquement en nature, sous forme de tisanes ou de poudres [2]. Maintenant beaucoup sont présentées en gélules, mais il existe de nombreuses formes d'utilisation des plantes médicinales. Quelle que soit leur présentation, elles jouissent d'un regain d'intérêt largement suscité et entretenu par la publicité ainsi que par d'innombrables ouvrages de vulgarisation.

De plus en plus de plantes sont utilisées en mélange. Pour ces préparations, des règles de bonnes pratiques officinales ont été instaurées. De nombreux paramètres sont à respecter comme le nombre de plantes, les associations possibles, la saveur, ou encore le goût qui devra être adapté au client. L'âge du patient et son état devront également être pris en compte. La menthe par exemple, sera évitée chez un patient ulcéreux.

Signalons également que de nombreuses plantes s'emploient uniquement en homéopathie.

C'est par exemple le cas de la souche *Arum triphyllum* provenant de l'*Arum* à trois feuilles, ou Navet indien, appartenant à la famille des Araceae. Elle est utilisée en dilution dans le traitement des affections respiratoires et du surmenage de la voix.

Pour finir il ne faut pas oublier que les plantes médicinales sont aussi utilisées dans la thérapeutique vétérinaire. Citons comme exemple le *Serpolet* (*Thymus serpyllum* L.) qui est utilisé comme antiseptique, ou contre les entérites et les parasitoses des volailles [1,2].

2. Métabolites secondaires

2.1. Les polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement [3], contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés [4,5].

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [6]. Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins [7].

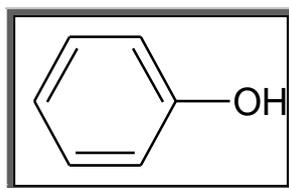


Figure I.1: Structure du noyau phénol [3].

Le tableau I.1 regroupe les principales classes des composés phénoliques.

Tableau I.1 : Les principales classes des composés phénoliques [8].

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	catéchol	Moules marines
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique, acide férulique.	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne

$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones • Isoflavonols 	Kamphérol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol	Pin
$(C_6-C_3)_n$	Lignines		Bois, noyau de fruits
$(C_{15})_n$	Tanins		Raisin rouge, kaki

2.1.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines [9] et **les flavonoïdes**, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols [10].

2.1.1.1. Les non flavonoïdes

a. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [11].

➤ Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C_6-C_1) (Tableau I.2). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau I.2 [12].

Tableau I.2 : Principaux acides hydroxybenzoïques [12].

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acides phénoliques
H	H	H	H	Acide benzoïque
H	H	OH	H	Acide p-hydroxybenzoïque
H	OH	OH	H	Acide protocatechique
H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
H	OH	OH	OH	Acide gallique
H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique

➤ Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés [17] et peuvent également être acidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Tableau I.3) [12].

Tableau I.3 : Principaux acides hydroxycinnamiques [12].

R ₁	R ₂	R ₃	Acides phénoliques
H	H	H	Acide cinnamique
H	OH	H	Acide p-coumarique
OH	OH	H	Acide caféique
OCH ₃	OH	H	Acide férulique
OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg [13,14].

La liste des acides phénoliques présents dans les plantes ne s'arrête pas là, nous tenons à mentionner, en particulier, l'acide méthylgallique, l'acide rosmarinique, l'acide carnosique et le carnosol [15].

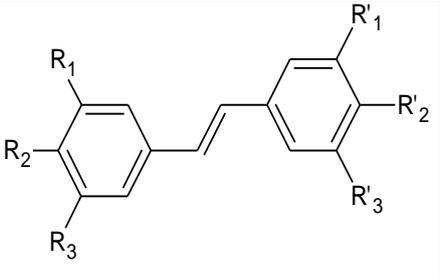
Les acides phénoliques sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae*, *Rosaceae*..), le plus souvent à l'état de glucoside du diphenol (arbutoside) ou de son monométhyléther. On connaît également des alcénylphénols (Urushiol) et des monoterpènes phénoliques (Thymol) [15].

b. Stilbènes

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (Tableau I.4).

Tableau I.4: Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes [16].

R ₁	R ₂	R ₃	R' ₁	R' ₂	R' ₃	Stilbènes
OH	H	OH	H	OH	H	Resvératrol
OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	ptérostilbène
Glc	OH	OH	OH	OH	OH	picéide



Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques.

Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (les graines, la peau, et les tiges) et le vin [16].

c. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃) (Tableau I.1). Leur distribution botanique est large, ils se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les

angiospermes .Les graines de lin sont la source la plus importante de lignanes, viennent ensuite, les lentilles, les haricots blancs, les graines de céréales et certains légumes [15].

d. Coumarines C₆-C₃

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* [17]. Ce sont des composés phénoliques cyclisés (Figure I.2) qui dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique, tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol.

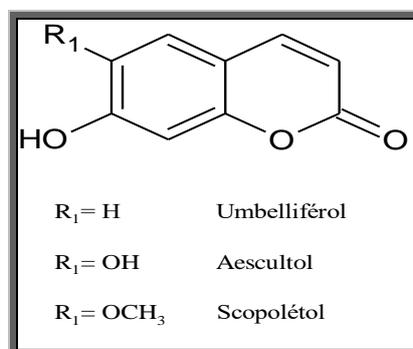


Figure I.2 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines [17].

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes [18].

2.1.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C₆-C₃-C₆ (Figure I.3). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les

processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [19]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

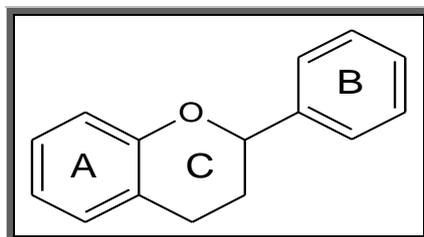


Figure I.3 : Squelette de base des flavonoïdes [19].

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines.

a. Flavonols

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C₃ (Figure I.4). Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés [20].

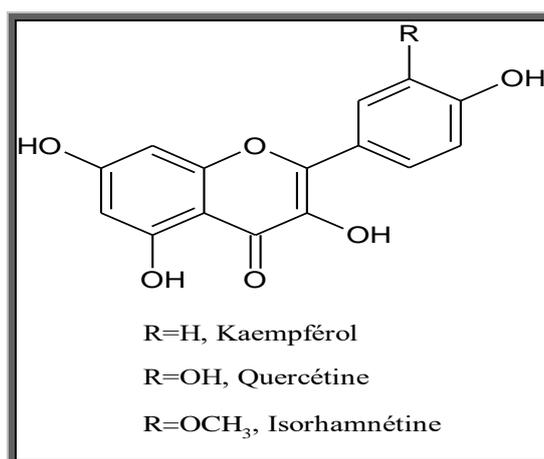


Figure I.4 : Des exemples des structures chimiques des flavonols [20].

b. Flavones

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (Figure I.5). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [20].

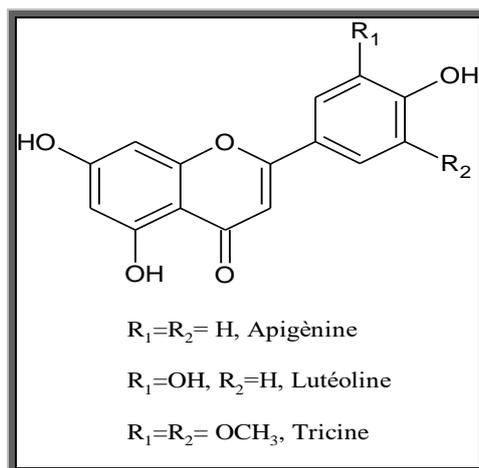


Figure I.5 : Des exemples des structures chimiques des flavones [20].

c. Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (Figure I.6). Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée [21]

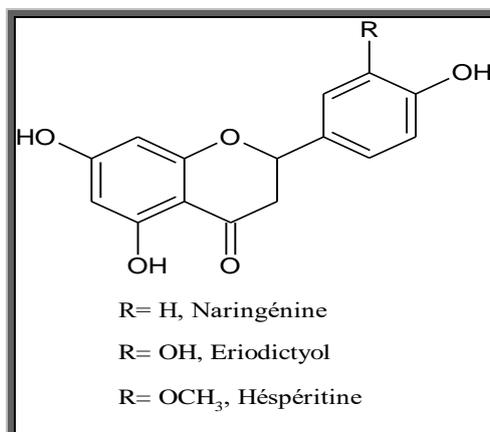


Figure I.6 : Des exemples des structures chimiques des flavanones [21].

La principale source des flavanones reste les agrumes qui sont caractérisés par l'accumulation des montants élevés en ces composés. Les agrumes incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines et les oranges douces.

Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine qui est retrouvée dans le pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme L'hésperidine, qui est retrouvée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange [22].

d. Flavan-3-ols ou flavanols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C₃ et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C₄ (Figure I.7). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondants dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins, ... etc [20].

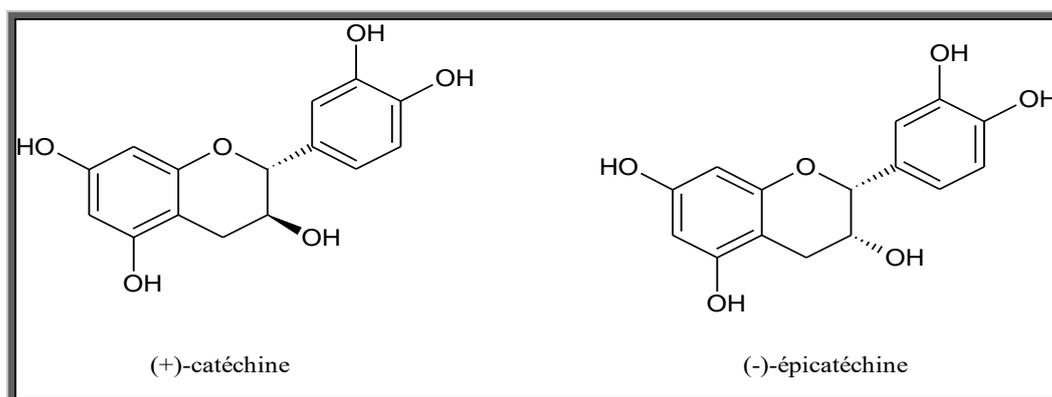


Figure I.7 : exemples des structures chimiques des flavan-3-ols [20].

Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé. Ce dernier contient principalement de la (-)-épicatechine, de la (-)-épigallocatechin-3-O-gallate et de la (-)-épigallocatechine [23].

e. Isoflavones

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C₃

plutôt que la position C₂ (Figure I.8). Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal [20].

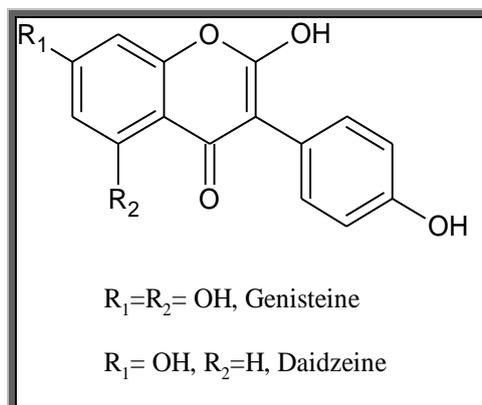


Figure I.8 : Exemples des structures chimiques des isoflavones [20].

f. Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec *Anthos* signifie fleur, et *kyanos* signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum (Figure I.9). Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires et ils sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines [24].

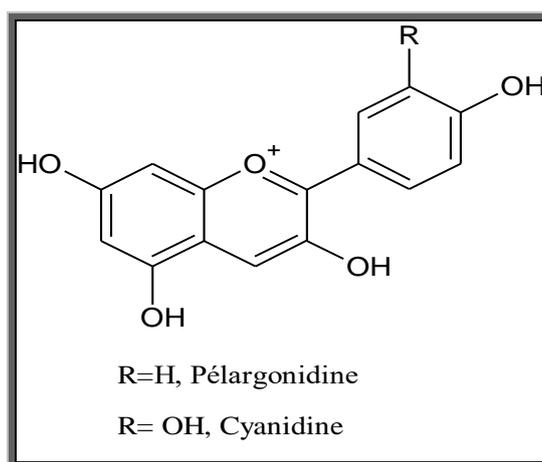


Figure I.9 : Exemples des structures chimiques des anthocyanes [24].

2.1.1.3. Les tannins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles [25]. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [26] :

- Tanins hydrolysables : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Figure I.10) [27, 28].
- Tannins condensés : les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C₄ et C₈ ou C₄ et C₆ (Figure. I.10) [28, 29].

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

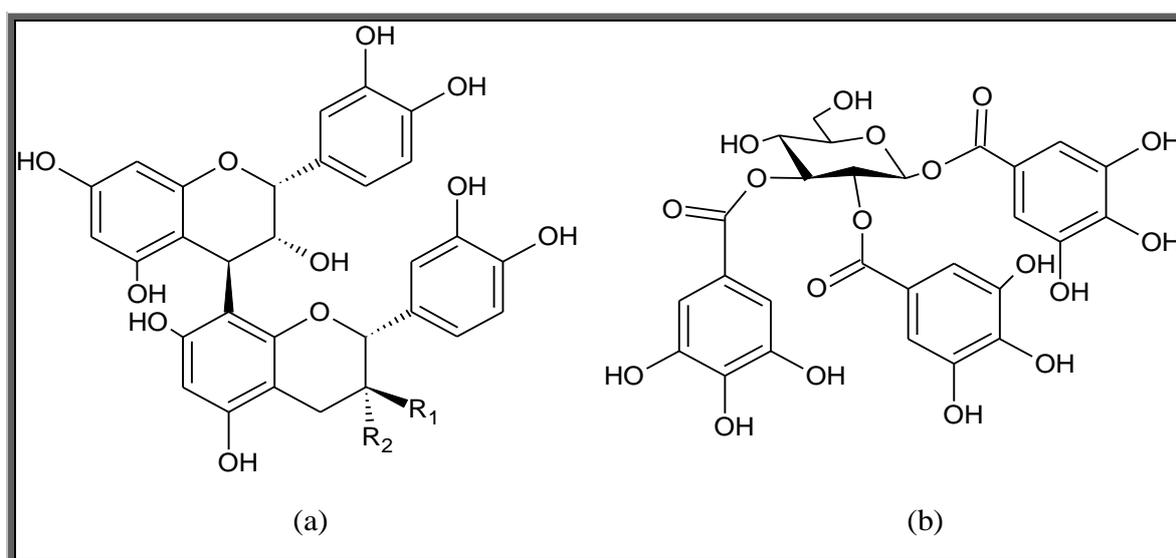


Figure I.10 : Structure chimique (a) d'un tannin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallo-tannin (1, 2, 3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) [30].

2.2. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte, largement répandus dans le règne végétal [31].

Leur particularité structurale est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈) dérivées du 2-méthylbutadiène (Figure I.11) [32].

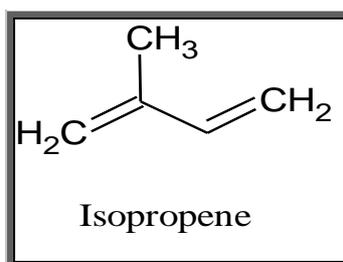


Figure I.11 : Structure de base des terpénoïdes [33].

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette terpénique avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) [33,34].

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprène (Tableau I.5) :

Tableau I.5 : Classification des triterpènes [33].

Monoterpènes	C ₁₀
Sesquiterpènes	C ₁₅
Diterpènes	C ₂₀
Sesterpènes	C ₂₅
Triterpènes et Stéroïdes	C ₃₀
Tetraterpènes	C ₄₀
Polyterpènes	(C ₁₀) _n avec n>8

2.3. Les huiles essentielles

2.3.1. Définition

Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues des végétaux par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes.

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie [35].

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

2.3.2. Composition Chimique des Huiles Essentielles

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines.

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane [36].

a. Les monoterpènes :

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales [37].

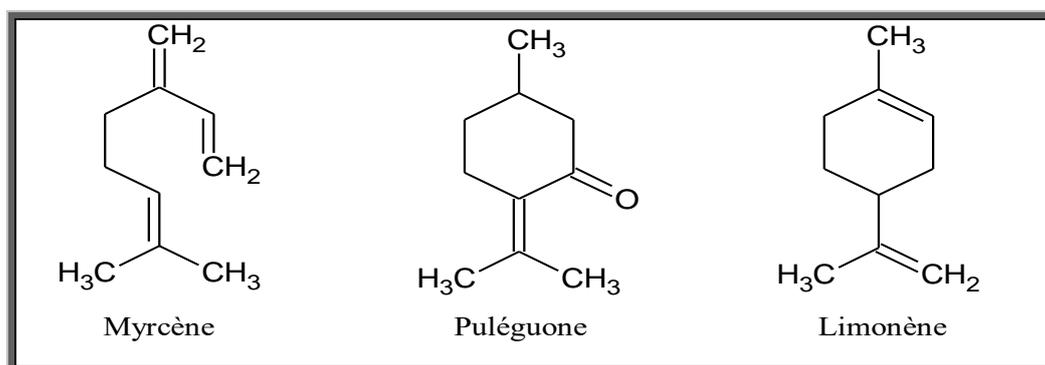


Figure I.12 : Exemples de quelques monoterpènes [37].

b. Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories

structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature [38].

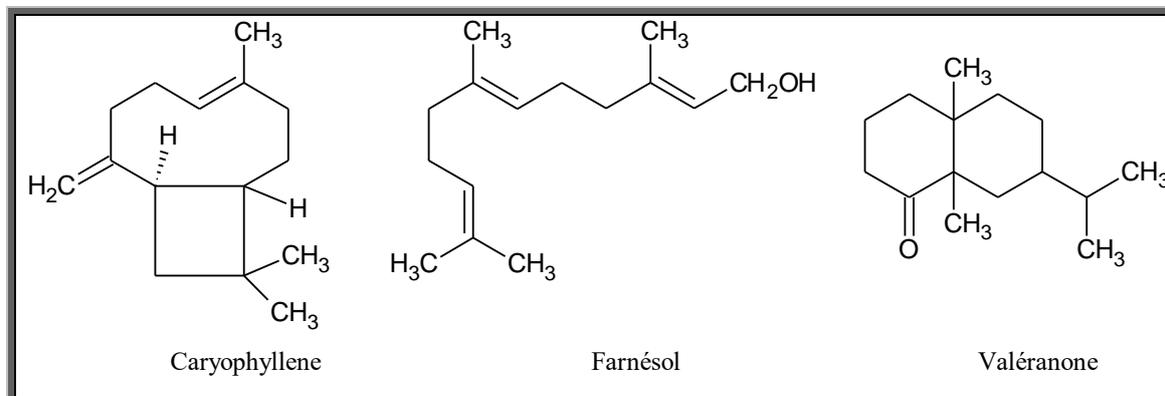


Figure I.13 : Exemples de quelques sesquiterpènes [38].

c. Les composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure I.14). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc [38,39].

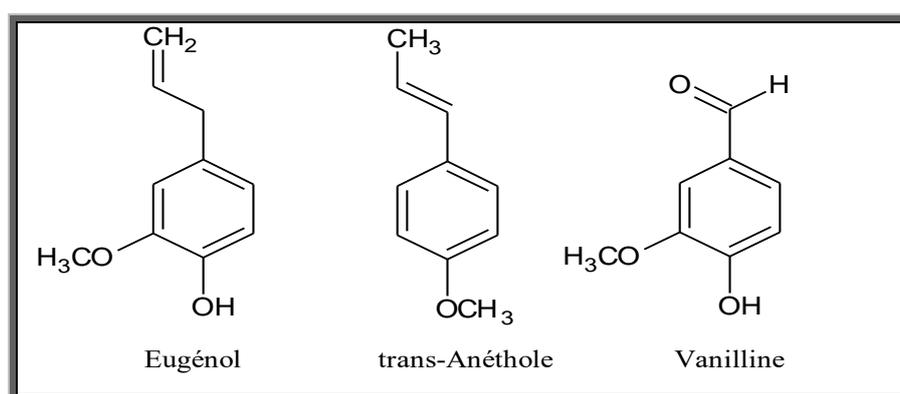


Figure I.14 : Exemples de composés aromatiques [38].

2.3.3. Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses

d'origine bactérienne [40], ou au niveau de la microflore vaginale et d'origine fongique contre les dermatophytes [41]. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques [42] qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs [43]. En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles [44].

Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing gum, chocolats, bonbons...) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch ...), et celle de la nourriture pour animaux, dans l'industrie automobile, dans la préparation des sprays insecticides. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années [45].

3. Les pigments foliaires

3.1. La chlorophylle

La chlorophylle est le principal pigment photosynthétique. Elle est présente chez presque tous les organismes photosynthétiques et est à l'origine de leur couleur verte car elle absorbe fortement la lumière visible dans les longueurs d'onde correspondant au bleu et au rouge mais laisse filtrer une grande partie de la lumière verte. On dénombre jusqu'à plusieurs centaines de millions de molécules de chlorophylle dans un seul chloroplaste. Deux structures remarquables caractérisent cette molécule :

- un noyau tétrapyrrolique ou chlorine, contenant un atome de magnésium en son centre ;
- une chaîne terpénique ou phytol, constituée de vingt atomes de carbone.

Il existe différentes formes de chlorophylles, dont les seules présentes chez les végétaux supérieurs sont la chlorophylle a et la chlorophylle b. Les autres formes (chlorophylles c et d)

présentes chez certaines algues ou bactéries et sortent du cadre de notre étude. Comme le montrent la figure I.15 et le tableau I.6, la structure des formes a et b de la chlorophylle est quasi identique, à l'exception d'une fonction aldéhyde située sur la chlorine [46].

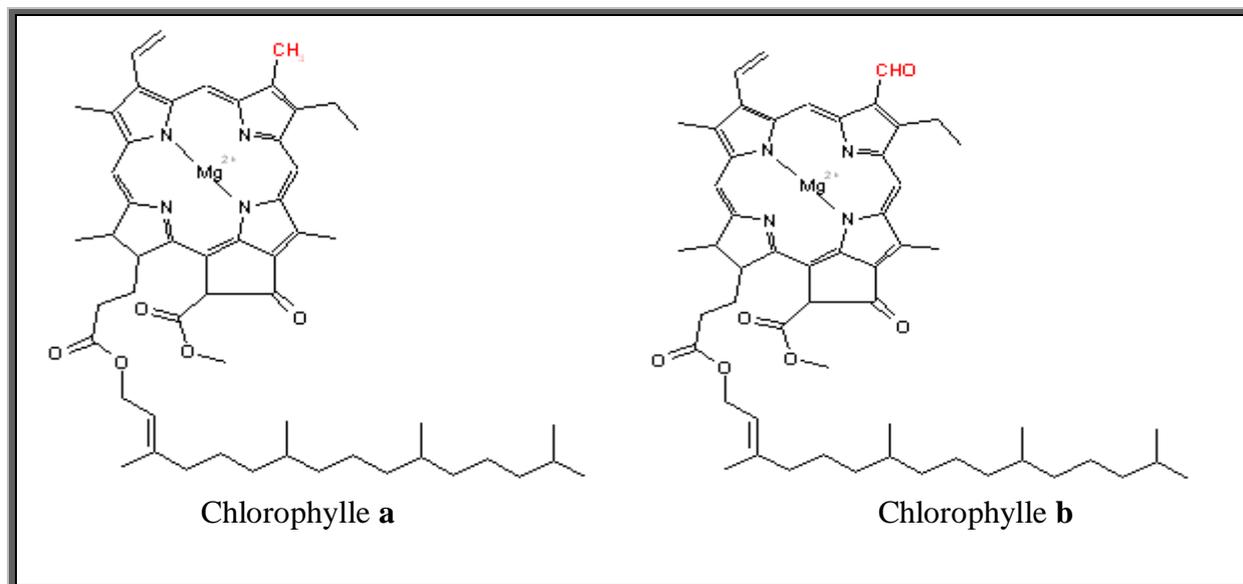


Figure I.15 : structure des chlorophylles **a** et **b** [46].

Le tableau suivant résume les structures brutes de la chlorophylle **a** et **b**.

Tableau I.6 : caractéristiques physico-chimiques des chlorophylles a et b [46].

	Chlorophylle a	Chlorophylle b
Formule brute	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ Mg
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	893.5	907.5

L'atome de magnésium participe aux propriétés optiques de la molécule alors que le groupement phytol n'interagit pas avec la lumière. En revanche, en raison de ses propriétés liposolubles, il joue un rôle essentiel dans l'intégration de la chlorophylle dans les protéines de la membrane des thylakoïdes.

3.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont présents chez de nombreux êtres vivants, végétaux, animaux et microorganismes.

Les animaux sont incapables de les synthétiser aussi se les procurent-ils par leur alimentation. Ce sont des pigments photosynthétiques d'apparence orangée ou jaune, liposolubles, appartenant à la famille des terpénoïdes en C₄₀. Plus de six cent formes de

caroténoïdes ont été répertoriées à ce jour. Ils sont divisés en deux grandes familles: les carotènes, uniquement composés de carbone et d'hydrogène, et les xanthophylles qui sont synthétisés à partir des carotènes et possèdent en plus des atomes d'oxygène. Dans le chloroplaste, on distingue deux formes principales de carotènes (α -carotène et β -carotène) (Figures I .16) et cinq de xanthophylles (lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine et néoxanthine) [46]. L'introduction d'une fonction hydroxyle dans le α -carotène permet la formation de lutéine, alors que le β -carotène est le précurseur de la zéaxanthine, la violaxanthine, et l'anthéroxanthine. Ce mécanisme est à l'origine de leurs propriétés anti-oxydantes. La néoxanthine est formée à partir de la violaxanthine.

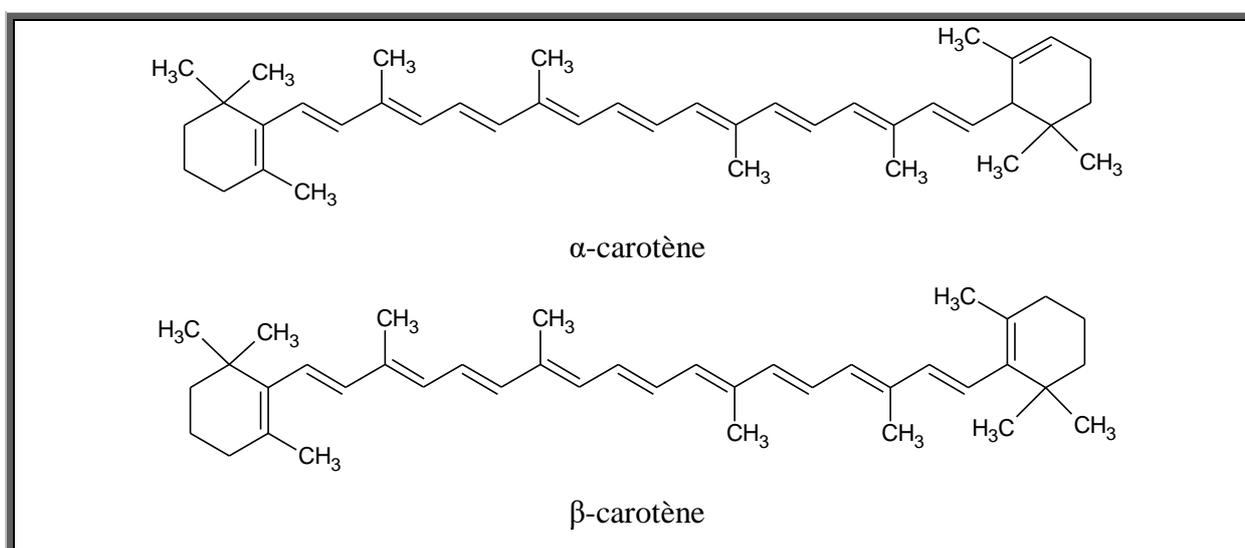


Figure I.16 : structure chimique du α -carotène et du β -carotène [46].

Les caroténoïdes présentent une très forte absorption de la lumière bleue entre 400 nm et 500 nm. Comme pour la chlorophylle, leur spectre d'absorption est sensible au solvant utilisé et à l'environnement de la molécule [47].

3.3. Détermination des concentrations des pigments foliaires

La méthode de détermination des pigments photosynthétiques (les chlorophylles **a** et **b** et des caroténoïdes) a été améliorée avec des chlorophylles pures et des caroténoïdes purs fraîchement isolés. Leurs spectres d'absorption ont été mesurés dans des solvants organiques les plus purs en utilisant des spectrophotomètres modernes à deux longueurs d'onde, ce qui a permis de déterminer leurs coefficients d'absorption spécifiques. C'est la méthode que la plupart des phytotechniciens appliquent pour la détermination quantitative des chlorophylles **a**

et **b** dans les extraits de feuilles de plantes obtenus avec des solvants organiques tels que l'acétone ou le méthanol.

Les teneurs en Chlorophylle et Caroténoïde ont été déterminées par spectrophotométrie en utilisant les valeurs des coefficients d'absorption dans les solvants utilisés. [46,48].

Une quantité donnée du pigment foliaire cristalline est pesée et mise en solution dans un volume connu de solvant (méthanol, chloroforme, éther.....).

L'absorbance est mesurée au maximum d'absorption dans le rouge et le coefficient d'absorption spécifique (α) est alors calculé d'après la relation de Beer-Lambert:

$$\alpha = \frac{A}{d \times C}$$

Où : A = absorbance au maximum dans le rouge

d : longueur du parcours optique (cm)

C : concentration en chlorophylle (mg ml^{-1})

Ce coefficient permet de calculer la concentration en pigments de toute solution dans le solvant choisi. Le tableau I.7 regroupe les coefficients d'absorption spécifiques (α) des chlorophylles a et b dans le chloroforme et le diméthylformamide déterminés à l'aide de spectrophotomètres à haute et basse résolution.

Tableau I.7 : Les coefficients d'absorption spécifique (α) des chlorophylles dans deux différents solvants [48].

Solvant	Chloroforme				Diméthyl-formamide			
	0.1-0.5 nm		1-4nm		0.1-0.5 nm		1-4nm	
λ, α	λ (nm)	α	λ (nm)	α	λ (nm)	α	λ (nm)	α
Chl a	665.5	90.42	666	94.57	663.8	89.78	664	90.41
	648.8	18.74	648	26.37	646.8	20.37	647	19.87
	480	1.33	480	1.42	480	1.12	480	0.89
	470	1.66	470	2.84	470	1.36	470	1.23
Chl b	665.5	8.26	666	6.95	663.8	10.89	664	11.68
	648.8	47.47	648	62.98	646.8	48.11	647	50.59
	480	23.93	480	46.09	480	34.07	480	52.02
	470	73.45	470	142.1	470	78.92	470	105.2

Les équations appropriées pour calculer les concentrations (en $\mu\text{g ml}^{-1}$) de la chlorophylle **a** (C_a), de chlorophylle **b** (C_b) et de caroténoïdes totaux ($C_x + c$) dans les 3 solvants par spectrophotomètres à haute et basse résolution sont indiqués dans le tableau I.8 [48].

Tableau I.8 : Equations de détermination des concentrations des pigments foliaires [48].

Concentration des pigments		
Résolution	0.1-0.5 nm	1-4 nm
Chloroforme	$C_a = 11.47 A_{665.6} - 2A_{647.6}$ $C_b = 21.85A_{647.6} - 4.53A_{665.6}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.33C_a - 23.93C_b) / 202$	$C_a = 10.91A_{666} - 1.2A_{648}$ $C_b = 16.38A_{648} - 4.57A_{666}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.42C_a - 46.09C_b) / 202$
Dimethyl-formamide	$C_a = 12A_{663.8} - 3.11A_{646.8}$ $C_b = 20.78A_{646.8} - 4.88A_{663.8}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 1.12C_a - 34.07C_b) / 245$	$C_a = 11.65A_{664} - 2.69A_{647}$ $C_b = 20.81A_{647} - 4.53A_{664}$ $C_{x+c} = (1000A_{480} - 0.89C_a - 52.02C_b) / 245$

4. Techniques d'extraction :

Les techniques traditionnelles d'extraction par solvant des matériaux végétaux sont basées sur le choix correct des solvants et l'utilisation de la chaleur ou / et agitation pour augmenter la solubilité des composés [49].

Le fait que les plantes peuvent contenir plusieurs centaines de métabolites secondaires, des techniques modernes d'extraction et d'isolement seront décrites comme des techniques alternatives pour réduire considérablement la consommation de solvants et accélérer le processus d'extraction [50].

4.1. Techniques d'extraction classiques

4.1.1. Extraction solide-liquide et Macération :

C'est une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction...etc [49].

La macération est relativement peu coûteuse et aussi la plus simple, elle est utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles et se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules bioactifs qui sont sensibles aux changements de température. En outre, une matrice peut subir plusieurs extractions successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt [51].

4.1.2. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult) [52]. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité.

La durée d'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique.

4.2. Techniques d'extraction modernes

4.2.1. Extraction assistée par micro-onde :

Dans cette technique d'extraction alternative, la matrice solide est immergée dans un solvant chauffé par micro-ondes. Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de fréquences entre 300 MHz et 300 GHz (Figure I.17). Leur assistance permet de chauffer le solvant très rapidement et en utilisant peu d'énergie. Cette technique a été brevetée par Paré et Bélanger en 1990 pour l'extraction de produits naturels. En général, les échantillons sont homogénéisés et mélangés avec un solvant et la suspension est irradiée à plus de 2000 MHz pour une courte période de temps. Le chauffage est généralement répété plusieurs fois avec des périodes de refroidissement pour éviter l'ébullition. L'efficacité de cette technique s'approche de celle de l'extraction classique Soxhlet, mais avec l'avantage de pouvoir être réalisée beaucoup plus rapidement [53]. Les inconvénients de cette technique sont la nécessité de maîtriser parfaitement le temps de chauffage par micro-ondes, l'inhomogénéité du

chauffage par les micro-ondes et le fait qu'elle ne peut pas être utilisée pour l'extraction de composés thermosensibles (vitamines, protéines, anthocyanines ..etc)

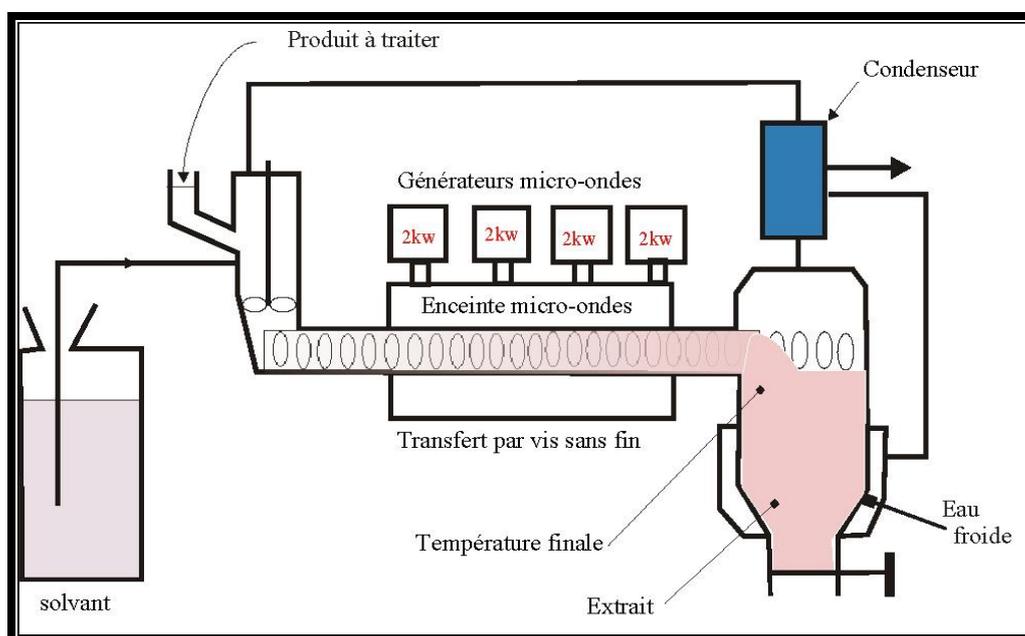


Figure I.17 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes [53].

4.2.2. Extraction à fluide supercritique :

L'extraction par fluides supercritiques utilise comme solvants des fluides en état supercritique (l'état du fluide lorsque sa température et sa pression sont supérieures à la température et à la pression critiques de ce fluide). Cet état n'existe pas à pression atmosphérique. Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des gaz et des liquides. Les taux de transfert de matière sont plus grands que dans des solvants liquides classiques à cause des coefficients de diffusion plus élevés et de faibles valeurs de viscosités.

Malgré ces propriétés favorables pour l'extraction de molécules bioactives, un frein majeur au développement de cette technologie est le fait que les fluides envisageables ont une pression critique relativement élevée qui entraîne des investissements importants pour construire les appareillages sous pression correspondants. Le fluide supercritique le plus utilisé comme solvant est le CO_2 à cause de ses nombreux avantages : abondant, bon marché, inerte, inodore, pas toxique et température et pression critiques relativement basses (31,1 °C et 7,3 MPa). Le grand inconvénient de l'utilisation du CO_2 comme solvant est qu'il est apolaire et donc non adapté pour l'extraction de composés polaires. Souvent, pour l'extraction de telles substances, l'éthanol est ajouté au CO_2 comme co-solvant [54].

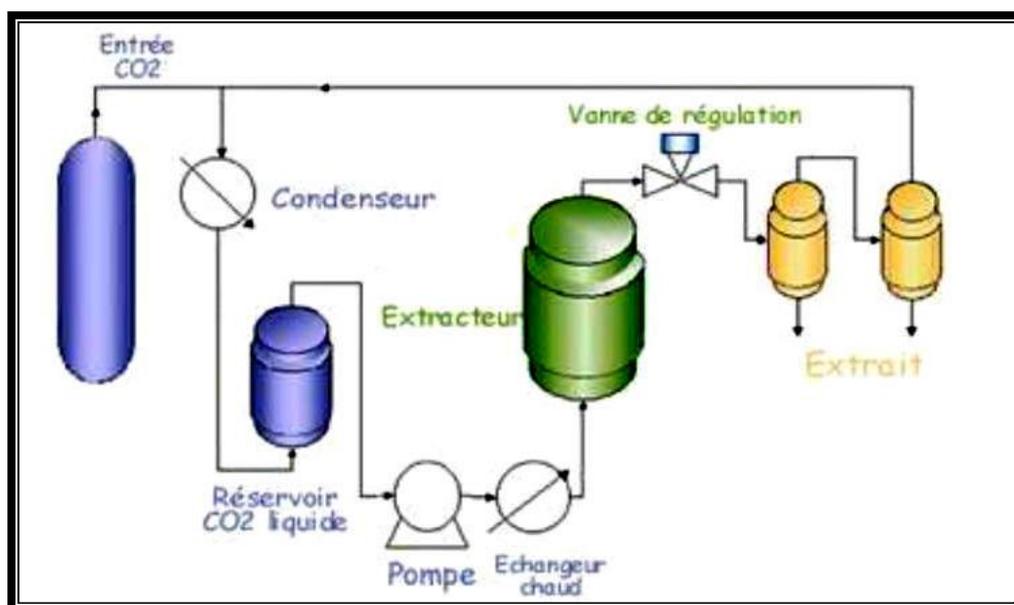


Figure I.18 : Représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique [54].

5. Les méthodes d'identification et de quantification :

L'analyse d'un mélange complexe s'effectue classiquement par le couplage d'une technique chromatographique, la chromatographie en phase gazeuse GC pour la fraction légère et la chromatographie liquide à haute performance HPLC pour la fraction lourde, avec une technique d'identification spectrale [55].

En routine, l'analyse se fait sur l'huile essentielle globale ou l'extract brut. Dès lors que se présentent des difficultés d'identification pour certains constituants, la procédure nécessite un fractionnement de l'échantillon, qui peut se poursuivre jusqu'à la purification du composé par des techniques chromatographiques préparatives.

5.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques les plus utilisées en chimie analytique.

Le principe de cette technique consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (Gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression.

En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé.

L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention et des spectres de masse des constituants individualisés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres [55,56].

5.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute-performance (HPLC) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification (chromatographie semi-préparative ou préparative) des composés dans un mélange. Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvants) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire). Les molécules sont identifiées en sortie de colonne grâce à un détecteur spectrophotométrique ou spectrométrique ; il enregistre un signal qui est ensuite transformé par l'ordinateur en un chromatogramme [57,58].

L'association de la station de HPLC avec un détecteur à barrettes diode (Diode Array Detector, DAD) permet une analyse qualitative d'un mélange par l'enregistrement des spectres UV des constituants individualisés, d'une part et permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique rapportée sur une courbe d'étalonnage externe, d'autre part.

6. Monographie des plantes étudiées

6.1. La famille des Lamiacées

6.1.1. Généralités sur la famille des Lamiacées

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces qui se répartissent sur tout le globe. C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces.

Les feuilles sont en général opposées sans stipules, les fleurs sont bisexuées et zygomorphe, les inflorescences sont en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées aux sommets des tiges, et simulant des épis [59,60].

Le calice est synsépale ou gamosépale (calice à sépales soudés formant un tube), typiquement pentamères, parfois bilabiée et porte 5 à 15 nervures protubérantes.

La corolle est sympétale ou gamopétale (corolle à pétales soudés) et typiquement bilabiée avec deux lobes formant une lèvre supérieure, et trois lobes formant la lèvre inférieure.

L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes.

Le gynécée consiste en un ovaire avec une fausse cloison et style terminal à gynobasique (Style inséré à la base du carpelle); à l'extrémité des styles, les stigmates sont petits et peu apparents [61].

Les fleurs à deux lèvres, en glomérules verticillés ou en épi sur des tiges feuillées quadrangulaires, parfois fleurs solitaires, fleurs hermaphrodites, généralement zygomorphes, 5 Sépales généralement soudés, calice actinomorphe à zygomorphes plus ou moins tubuleux, campanulées ou rotacé, persistant, parfois accrescent dans le fruit. 5 Pétales généralement soudés, corolle bilabié, à lobes imbriqués, sauf chez *Ajuga* et *Teucrium* où la lèvre inférieure est trilobée et la supérieure bilobée.

La famille des Lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes qui sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des Lamiacées [60].

6.1.2. Systématique de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées est classée comme suit [60] :

Règne	Plantae
Sous-règne	Angiospermes
Division	Superovariées Tétracycliques
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

6.1.3. Le genre *Thymus*

6.1.3.1. Description du genre *Thymus*

Plantes sous-ligneuses érigées ou prostrées, odorantes. Inflorescences en faux verticilles. Feuilles plus au moins contractées. Calice tubuleux à 2 lèvres, la supérieure à 3 dents, l'inférieure à 2, ciliées dentées. Corolle ± exserte à 2 lèvres, à 2 et 3 lobes. Etamines 4 saillantes plus au moins divergentes avec des carpelles lisses.

Genre de détermination toujours délicate, en raison de l'extrême variabilité des espèces et des hybridations interspécifiques. Les espèces algériennes à feuilles linéaires constituent en particulier un complexe qu'il est souvent illusoire de chercher, en l'état actuel de nos connaissances, à déterminer d'une façon précise. Seule une révision générale des espèces nord-africaines permettra peut-être de résoudre ces questions. Les caractères du calice permettent en principe de distinguer les espèces du groupe *hirtus* de celles du groupe *ciliatus*, ce dernier restant particulièrement inextricable [61].

6.1.3.2. Origine et répartition géographique du genre *Thymus*

L'origine du nom est sujette à diverses interprétations : *Thym* proviendrait du mot latin "*Thymus*" qui signifie "Parfumé", *Thym* à partir du mot grec "*Thumos*" qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage.

Le *thym* fait partie du genre *Thymus* défini comme un ancien groupe tertiaire, ayant son origine dans le sud-est de l'Espagne.

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales à cause de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le *thymus* comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides.

Le tableau I.9 montre la localisation des principales espèces de *thym* en Algérie.

Tableau I.9 : Localisation des principales espèces du genre *Thymus* en Algérie [62].

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus Commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran

Tableau I.9, la suite.		
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'Atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus lancéoatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l'Atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous-secteur des Hauts Plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois et oranais
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

6.1.3.3. Travaux antérieurs et usages thérapeutique du genre *Thymus* :

Les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Thymus* ont permis l'isolement, de plusieurs métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les terpènes.

➤ Flavonoïdes :

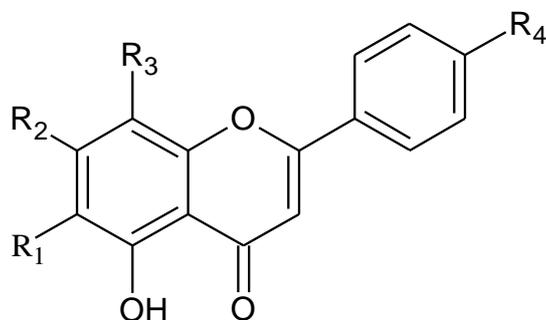
Le tableau suivant ressemble quelques flavonoïdes isolés des différentes espèces du genre *Thymus* en Algérie.

Tableau I.10 : Exemples des flavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *thymus* en Algérie.

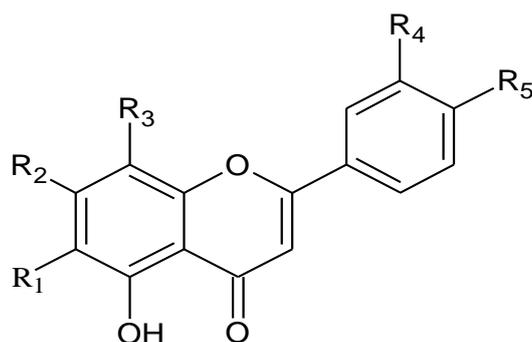
espèces	Composés isolés	N°	Références
<i>Thymus numidicus</i>	Cirsilinéol	<u>13</u>	[62]
	Cirsimaritine	<u>5</u>	
	Apigénine	<u>1</u>	
	Lutéoline	<u>11</u>	
	7-O-glucuronyl apigénine	<u>25</u>	
	7-O-glucuronyl Lutéoline	<u>26</u>	
<i>Thymus hirtus</i>	Apigénine	<u>1</u>	[63]
	Lutéoline	<u>11</u>	
	Diosmétine	<u>12</u>	
<i>Thymus vulgaris</i>	Acacétine	<u>2</u>	[64]
	Hispiduline	<u>4</u>	
	Cirsimaritine	<u>5</u>	
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Scutellarine	<u>9</u>	
	Cirsilinéol	<u>13</u>	
	Thymonine	<u>15</u>	
	8-methoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Kampférol	<u>17</u>	
	Quercétine	<u>18</u>	
	Rutine	<u>24</u>	
<i>Thymus algeriensis</i>	Kampférol	<u>17</u>	[65]
	Quercétine	<u>18</u>	
	Isorhamnétine	<u>19</u>	
	5,3'-di-hydroxy-3, 7,4',5'-tetraméthoxyflavone	<u>21</u>	
	Galangin	<u>20</u>	
	Chrysine	<u>10</u>	

Tableau I.10, la suite.			
<i>Thymus serpyllum</i>	Acacétine	<u>2</u>	[64]
	Genkwanine	<u>3</u>	
	Hispiduline	<u>4</u>	
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Scutellareine	<u>9</u>	
	Lutéoline	<u>11</u>	
	Thymonine	<u>15</u>	
	8-méthoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Quercétine	<u>18</u>	
<i>Thymus capitatus</i>	Lutéoline-7 rutinoside	<u>27</u>	[66]
	Vicenin-2	<u>28</u>	
<i>Thymus herba barona</i>	Genkwanine	<u>3</u>	[67]
	Xanthomicrol	<u>6</u>	
	Sorbifoline	<u>7</u>	
	Thymusine	<u>8</u>	
	Cirsilinéol	<u>13</u>	
	Cirsiliol	<u>14</u>	
	8-méthoxycirsilinéol	<u>16</u>	
	Naringénine	<u>22</u>	
	Eriodictyol	<u>23</u>	

❖ **Flavones** : Les structures de **1** à **16** sont les suivantes :

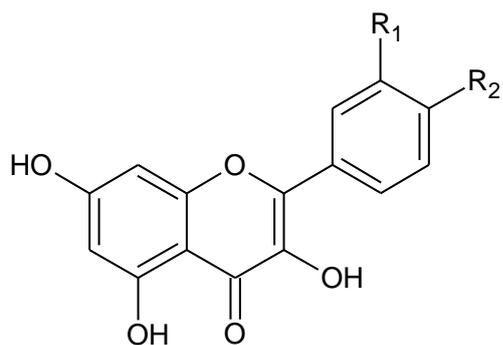


N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>1</u>	H	OH	H	OH
<u>2</u>	H	OH	H	OCH ₃
<u>3</u>	H	OCH ₃	H	OH
<u>4</u>	OCH ₃	OH	H	OH
<u>5</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
<u>6</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>7</u>	OH	OCH ₃	H	OH
<u>8</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>9</u>	OH	OH	H	OH
<u>10</u>	H	OH	H	H

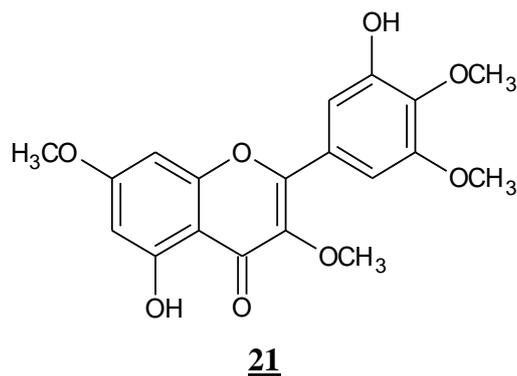


Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>11</u>	H	OH	H	OH	OH
<u>12</u>	H	OH	H	OH	OCH ₃
<u>13</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
<u>14</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OH
<u>15</u>	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>16</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH

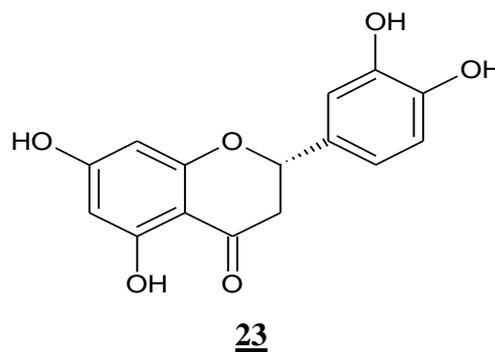
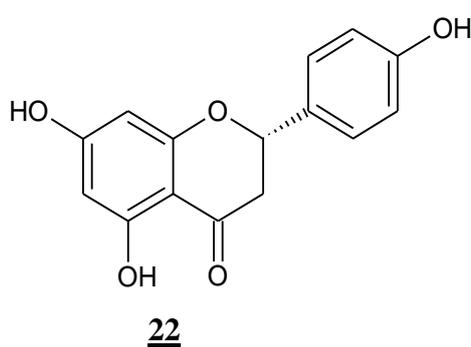
❖ Flavonol : Les structures des flavonols de 17 à 21 sont les suivantes :



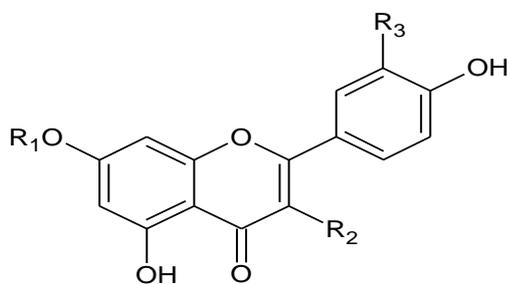
Structure	R ₁	R ₂
<u>17</u>	H	OH
<u>18</u>	OH	OH
<u>19</u>	OCH ₃	OH
<u>20</u>	H	H



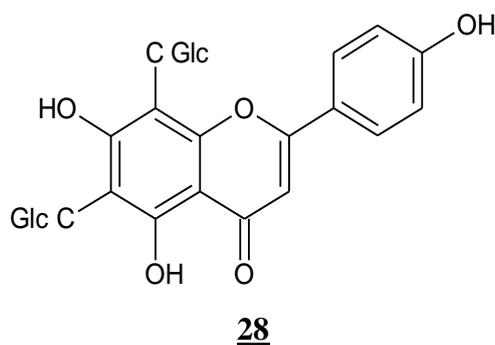
❖ Flavanone



❖ Flavonoïdes glycosylés : Les structures de 24 à 26 sont les suivantes :



Structure	R ₁	R ₂	R ₃
<u>24</u>	Glc	H	H
<u>25</u>	Glc	H	OH
<u>26</u>	H	ORhamGlc	H
<u>27</u>	RhamGlc	OH	OH

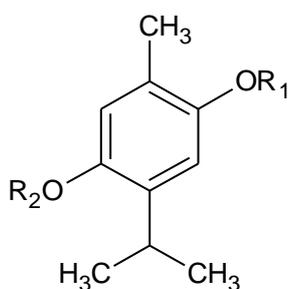


❖ Les terpènes :

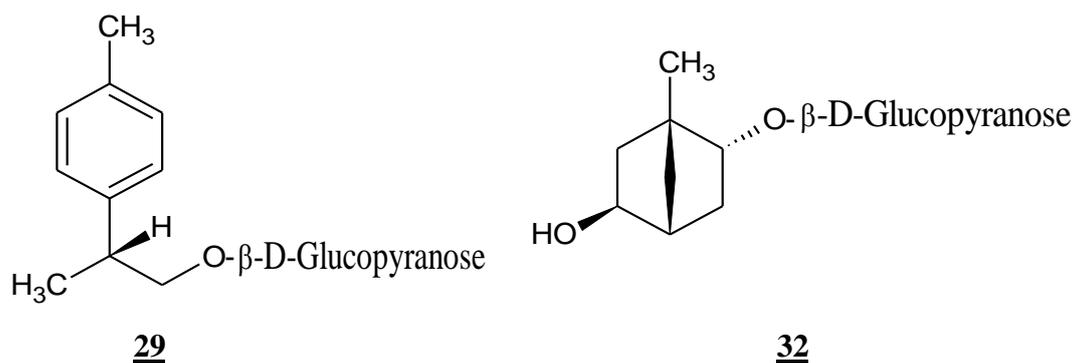
L'étude effectuée sur l'espèce *Thymus vulgaris* L a permis l'isolement de monoterpènes glycosylés dont (R)-p-cymen-9-yl beta-D-glucopyranoside est nouveau. Le tableau I.11 contient quelques exemples de monoterpènes glycosylés isolés.

Tableau I.11 : quelques monterpènes glycosylés isolés de *Thymus vulgaris*.

Espèce	Composés isolés	N°	Référence
<i>Thymus vulgaris</i> L	(R)-p-cymen-9-yl beta-D-glucopyranoside	<u>29</u>	[68]
	2-β-D-glucopyranosylthymoquinols	<u>30</u>	
	5-β-D- glucopyranosylthymoquinols	<u>31</u>	
	(-)-angelicoidenol-beta-D-glucopyranoside	<u>32</u>	



Structure	R1	R2
<u>30</u>	β-D-Glc	H
<u>31</u>	H	β-D-Glc



➤ **Huiles essentielles du *Thymus* :**

L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives.

Elles sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

Plusieurs espèce de *Thymus* possèdent de nombreuses activités biologiques tels que, antimicrobienne, antibactérienne, antiviral, antioxydant et activité fongicides, anti-inflammatoire, antiseptique [69-72].

6.1.3.4. Usage et propriétés du *Thymus*

- ✓ Assaisonnement des aliments et des boissons.
- ✓ Les principaux constituants du *thymus* montrent des propriétés vermifuges et vermicides [73].
- ✓ Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) [74].
- ✓ Propriétés anthelminthiques [75].
- ✓ Propriétés antioxydantes en raison de ces propriétés, le *thym* est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage [76].

6.2. La famille des Chénopodiacées :

6.2.1. Généralités sur la famille des Chénopodiacées

C'est une famille de plantes, à fleurs sans pétales, qui comprend en particulier des espèces cultivées, des espèces poussant dans les décombres ou sur des sols salés.

Environ 1 500 espèces, réparties en une centaine de genres, sont présentes dans le monde. Les fleurs, petites, sont formées de 2 à 5 sépales, le plus souvent verdâtres, parfois tirant sur le blanc ou le rouge. Les feuilles sont quelquefois très réduites ; sinon, elles sont entières ou légèrement découpées, et certaines ont la forme d'une patte d'oie (d'où le nom de la famille, du grec *khênopous*, " patte d'oie ").

De nombreuses chénopodiacées poussent en bordure de mer, dans les marais salants, les déserts salés. Les chénopodiacées font partie des plantes qui colonisent les zones frontières entre terre et eaux, là où la marée laisse algues, plantes aquatiques ou animaux en décomposition, qui sont autant de sources d'azote [77].

Les analyses phytochimiques précédentes de certains *Atriplex* ont signalé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires tels que les saponines, les glycosides, les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les protéines, ainsi que des acides aminés et des alcools à longue chaîne. De plus, aucune huile essentielle n'a été trouvée chez ces espèces, mais elles étaient caractérisées par de grandes quantités de composés et de minéraux (dérivés du soufre) [78,79].

6.2.2. Classification taxonomique de la famille chénopodiacées

La famille chénopodiacées des est classée comme suite [77]:

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Chenopodiaceae

6.2.3. Le genre *Atriplex*

6.2.3.1. Description du genre *Atriplex*

Fleurs unisexuées, monoïques ou dioïques avec parfois quelques-unes hermaphrodites. Fleurs mâles sans bractées, à périanthe à 4-5 tépales et 3-5 étamines. Fleurs femelles avec deux bractées, à périanthe nul ou à 2-4 segments hyalins. Ovaire uniloculaire et uniovulé, à 2 styles filiformes. Fruit membraneux, comprimé dans les deux bractées de la fleur femelle ou

hermaphrodite (Périanthe fructifère ou valves frutifères). Graine lenticulaire, noire et disposée verticalement (sauf dans les fleurs hermaphrodites où elle est horizontale) [61].

6.2.3.2. Origine et répartition géographique :

Le tableau I.12 montre la localisation des principales espèces d'*Atriplex* en Algérie.

Tableau I.12 : Localisation des principales espèces d'*Atriplex* en Algérie [61].

Espèce	Auteur	localisation
<i>Atriplex chenopodioides</i>	Battandier	Terrains argileux Très rare à Bou Hanifia près de Mascara Endémique Nord-Africain
<i>Atriplex hastata</i>	Litardière	Assez commun dans le Tell Très rare ailleurs
<i>Atriplex portulacoides</i>	Litardière	Marécages salés du littoral Assez commun dans le Tell
<i>Atriplex Halimus</i>	Litardière	Rocailles, talus, argileux, zones d'épandage plus ou moins salés. Commun dans toute l'Algérie Secteur du Sahara Septentrional, Secteur du Sahara Central, Secteur du Sahara Occidental. Commun en montagne.
<i>Atriplex mollis</i>	Desfontaines	Sables salés Très rare à Biskra, Oued Rhir. Endémique de l'Oued Rhir.

6.2.3.3. Travaux antérieurs du genre *Atriplex*

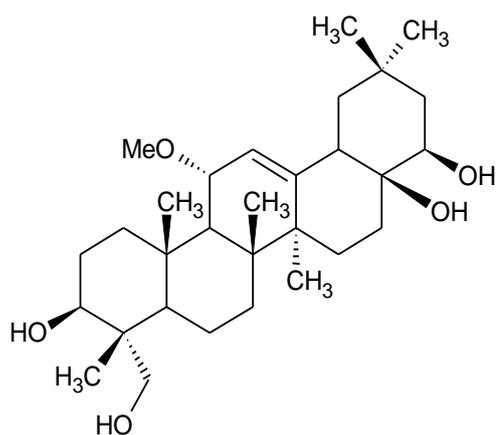
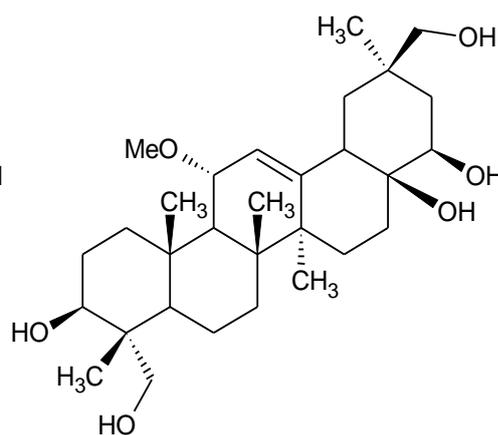
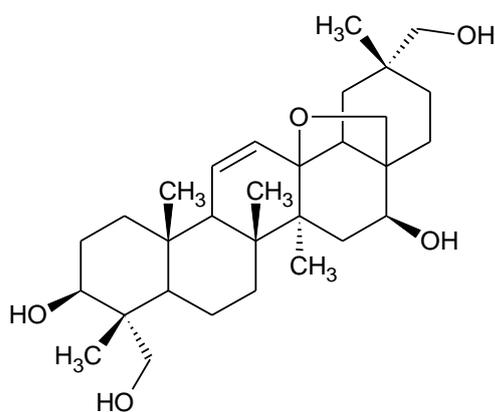
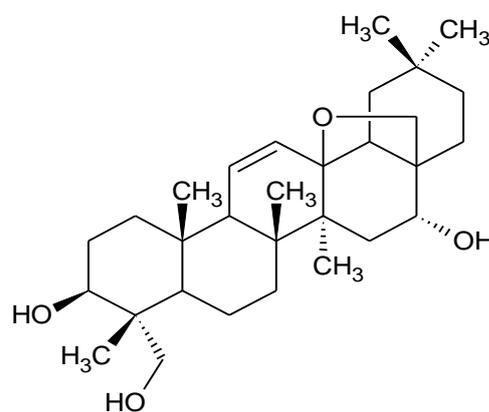
La composition chimique des espèces *Atriplex* est très compliquée car elle contient du flavonol comme composants principaux, des saponines triterpéniques, des alcaloïdes et acides aminés, coumarines et ecdystérols [80].

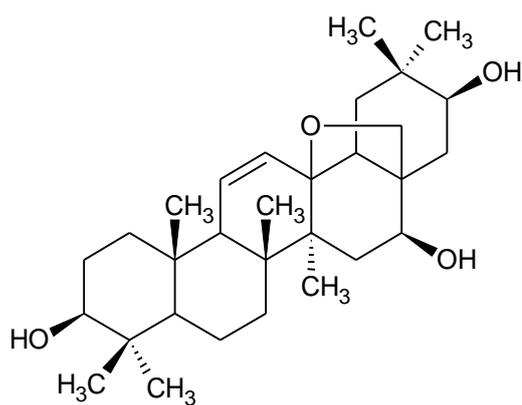
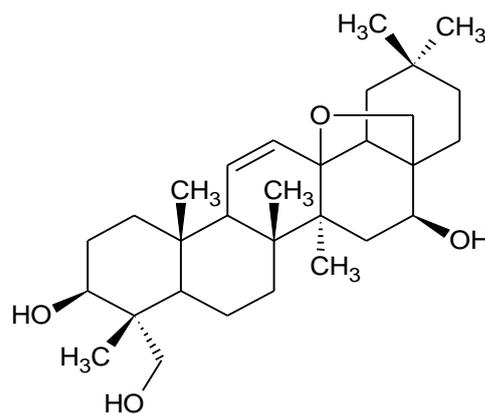
❖ Saponine :

Voici quelques saponines isolés des différentes espèces du genre *Atriplex*.

Tableau I.13 : Exemples des saponines isolés de différentes espèces du genre *Atriplex*.

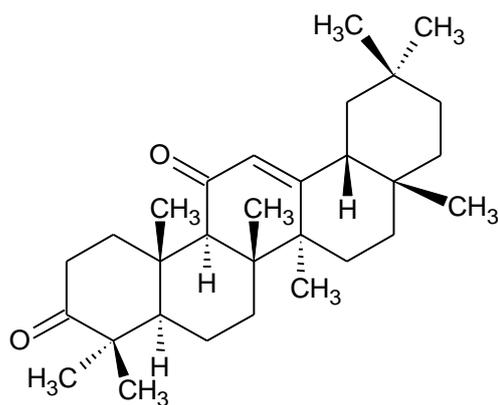
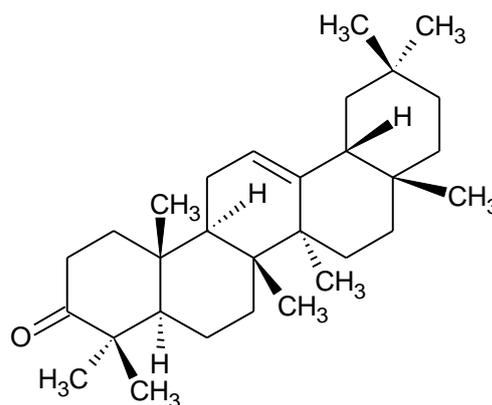
Espèce	aglycone	substituent	référence
<i>Atriplex semibaccata</i>	<u>33</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	[81]
	<u>34</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	
	<u>35</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	
	<u>36</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	
<i>Atriplex glauca</i>	<u>37</u>	3-[2-O-sulfate]-Glc-(1 → 2)-Ara	[81]
	<u>37</u>	3-[2-O-sulfate]-Glc-(1 → 2)-Ara, 21-O-4-4S	
	<u>38</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	
	<u>36</u>	3-Glc-(1 → 2)-Gal	

33343536

**37****38**

❖ **Triterpènes :**

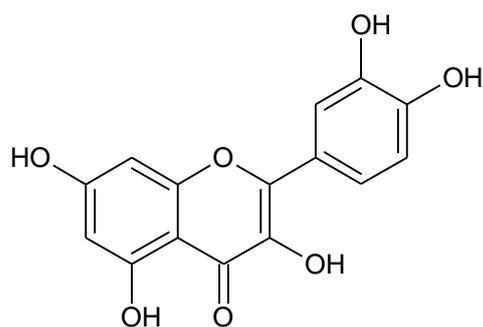
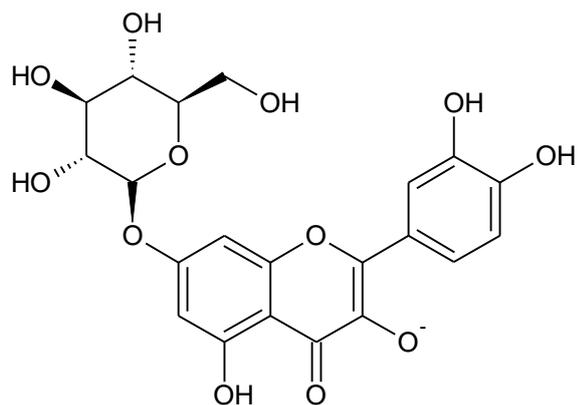
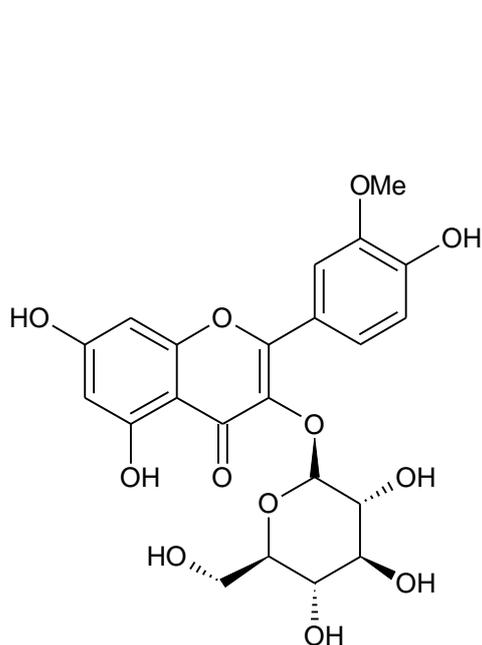
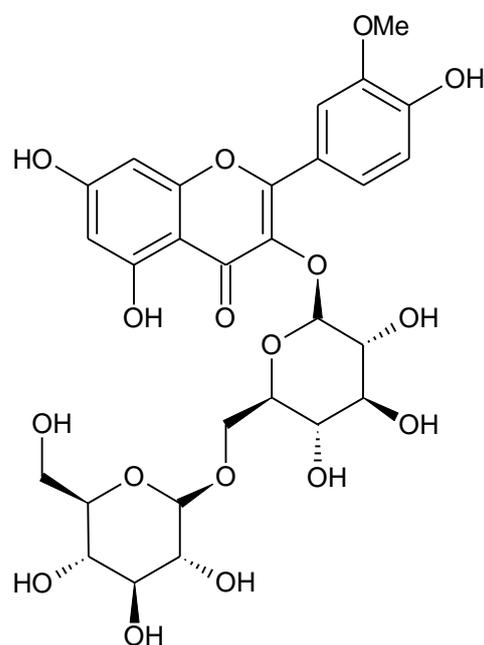
L'étude effectuée sur l'espèce *Atriplex lindleyi* Moq a permis l'isolement des triterpènes tel que : olean-12-ene-3,11-dione **39** et β -amyrenone **40** qui ont connu par leur effet anti-inflammatoire et anti-analgésique [82].

**39****40**

❖ **Flavonoïdes:**

L'étude effectuée sur l'espèce *Atriplex lindleyi* Moq. a permis l'isolement des flavonoïdes de types flavonols.

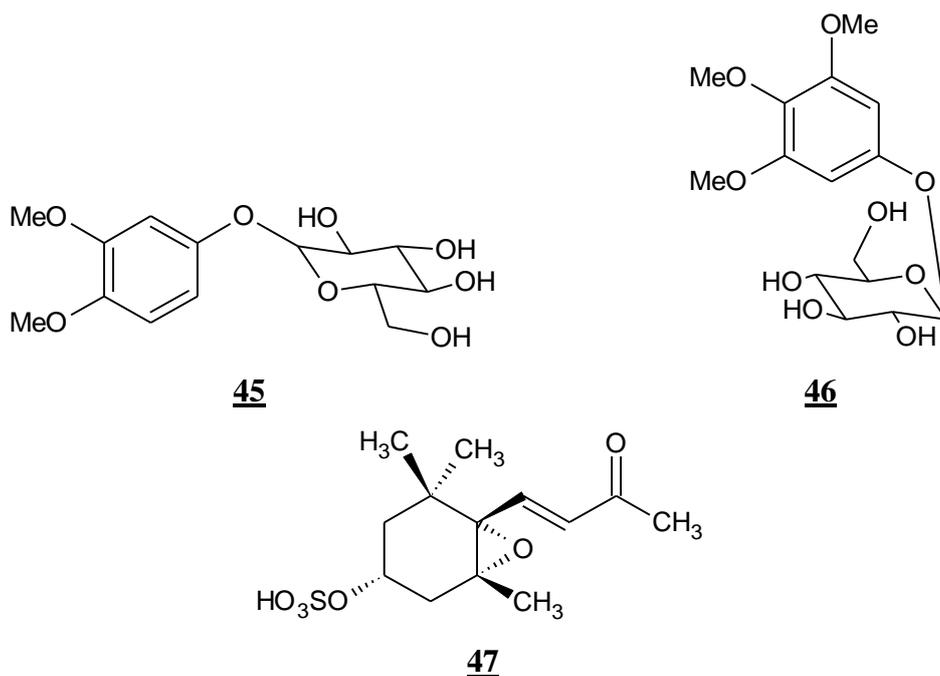
Voici quelques flavonols isolés de cette espèce : Quercétine **41**, quercémétrine **42**, isorhamnetine-3-O-glucoside **43** et quecétine-3-O-glucopyranoside-7-O-rhamnopyranosside **44** [81].

**41****42****43****44**

❖ **Autres métabolites :**

L'étude de l'espèce *Atriplex Halimus* a permis l'isolement de deux phénols glycosidiques :

- ✓ 3,4-diméthoxyphényl-β-D-glucopyranoside **45** ;
- ✓ 3, 4,5-triméthoxyphényl-1-O-β-D-glucopyranoside **46** ;
- ✓ un ecdysteroïde **47** [82].



6.2.3.4. Intérêt des Atriplex :

a. Intérêt fourrager :

Actuellement, les *Atriplex* semblent être les plantes les mieux adaptées pour la stabilisation des sols et l'augmentation de la production fourragère en climat semi-aride et aride. L'*Atriplex* constitue en période de sécheresse un aliment de réserve précieux et un fourrage apprécié des camélidés et bien plus des ovins et des caprins.

Grâce à sa grande résistance à la sécheresse et à la salinité, *Atriplex halimus*, compte avec *Atriplex nummularia* et *Atriplex canescens*, parmi les espèces les plus intéressantes, produisant de 2000 à 4000 kg de matière sèche par an, par hectare de fourrage, sous des précipitations annuelles de 200 à 400 mm [83].

b. Intérêt écologique :

En Algérie, les essais effectués dans le cadre du « barrage vert » montrent que les *Atriplex*, peuvent aussi avoir un rôle dans la fixation des dunes. L'installation d'un couvert végétal sur des sites salins dénudés contribue à réduire l'érosion éolienne et hydrique.

Le feuillage dense de ces formations végétales assure une bonne couverture du sol et empêche son érosion causée par les agressions climatiques (pluies, vent, grêle). Ils ont une croissance rapide et leur exploitation peut donc commencer rapidement [84].

De nombreuses études ont mis en évidence le fait qu'en associant la culture de l'orge aux arbustes fourragers appartenant au genre *Atriplex*, la production de céréales a augmenté de 25% ; de plus, le bétail peut éventuellement brouter les chaumes d'orges et les arbustes d'*Atriplex* en été et en automne [85].

De même, les espèces d'*Atriplex* annuelles sont connues pour contenir de fortes teneurs en fer, en manganèse, en aluminium et en molybdène [86].

c. Autres intérêts :

L'*Atriplex halimus* L. est utilisé comme plante médicinale dans la pharmacopée traditionnelle. En effet elle agit sur la maladie du sommeil (trypanosomiase), et elle possède également un effet antidiabétique notamment sur le diabète type 2, 3g/Jour de feuille d'*Atriplex halimus* L. diminue le taux du glucose dans le sang [85].

D'après plusieurs études, les espèces du genre *Atriplex* ont été rapportées comme cytotoxiques [86,87], antimicrobiennes [88], antioxydant [89], antidiabétique [90], et de réduire la fertilité masculine rats [91].

B- Activités biologiques

1. Activité antioxydante

1.1. Qu'es ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [92].

L'activité antioxydante d'un composé correspond de sa capacité à neutralise l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH[•]) et superoxydes (O₂[•]) [93-96].

1.2. Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène (figure I.19).

Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu [97,98].



Figure I.19 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène.

Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons π du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des pro-oxydants [99].

1.2.1. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire. Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon le mécanisme: l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire (figure I.20). Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées [100].

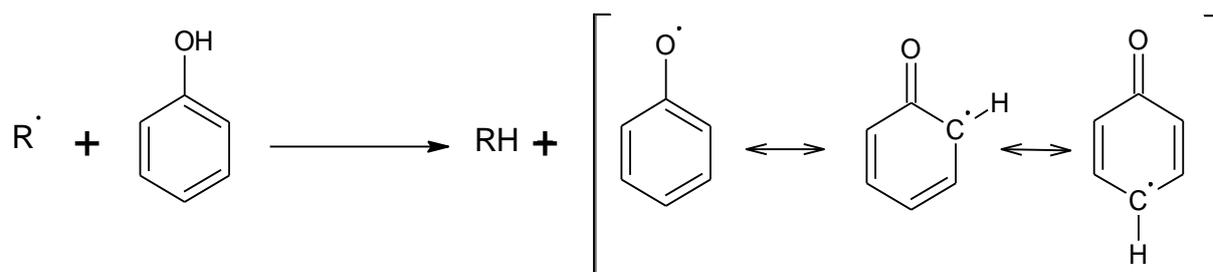


Figure I.20 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Les radicaux intermédiaires phénoxy ($PO\cdot$) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initier [101]. Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:



Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonance [101].

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier sont de bons piègeurs des radicaux libres. A cause la présence de 3',4'-dihydroxy et la présence du groupe o-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B; ils possèdent la propriété de donneur d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C_2-C_3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire (figure I.21) [100].

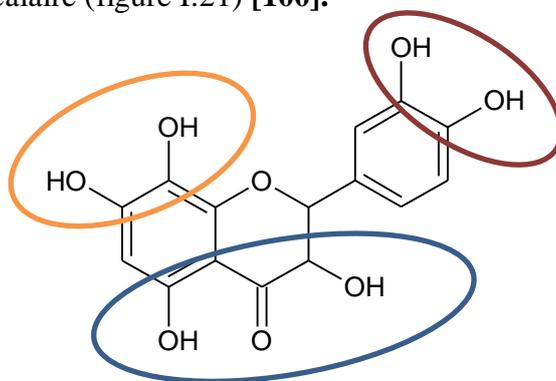


Figure I.21 : Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée.

a. Test au DPPH

Le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant visualisé également par un changement de coloration de la solution qui vire du violet au jaune [102,103].

La première étape est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH pour donner du diphénylhydrazine et un radical phénoxy (Figure I.22). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions, ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé [104].

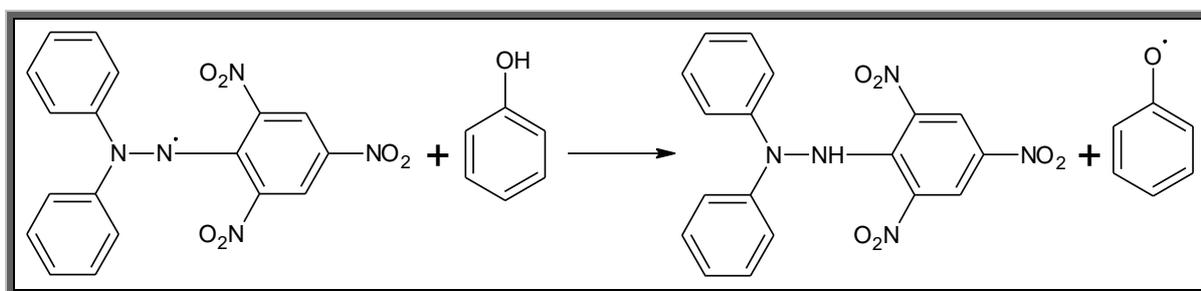


Figure I.22 : Réaction du radical DPPH avec un phénol [103].

b. Test de blanchissement du β -carotène

Les acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ce qui génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux vont oxyder le β -carotène entraînant la disparition de sa couleur rouge, mais en présence d'un antioxydant ces radicaux sont neutralisés. Le pouvoir des différents extraits à inhiber la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique est déterminé par la méthode décrite par Kelen et Bektas (2007) [105].

2. Activité anti-inflammatoire

2.1. L'inflammation

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique. La

plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer [106].

2.2. Les polyphénols comme des anti-inflammatoire

Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation. De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, et que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes [107].

2.3. Mécanisme de la réaction inflammatoire

En réponse à une perturbation physique ou chimique, il se produit une activation de la phospholipase A2 qui hydrolyse les liaisons esters des phospholipides membranaires et libère des dérivés de l'acide arachidonique, ce dernier à son tour est métabolisé selon deux voies possibles :

- La voie de la lipo-oxygénase qui le transforme en leucotriène.
- La voie de la cyclo-oxygénase qui le transforme principalement en prostaglandine.

Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimioattractivité sur les polynucléaires.

Les prostaglandines produisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire, en outre, ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine.

Les thromboxanes stimulent les mécanismes de l'agrégation plaquettaire [108].

2.4. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

➤ Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

C'est une classe pharmaceutique qui possède des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires.

Les AINS ont une similitude dans leurs effets thérapeutiques liés à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines en bloquant la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui

catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène) [108].

➤ **Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes (AIS)**

Les glucocorticoïdes constituent une classe thérapeutique qui a des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives.

Ils sont représentés par la cortisone et l'hydrocortisone qui sont des produits naturels sécrétés par la corticosurrénale et les produits synthétiques .

Les glucocorticoïdes empêchent la formation de glycéro-phospholipides membranaires en acides arachidoniques par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, histamine les cytokines [108].

3. Activité diurétique

3.1. Les diurétiques

Les diurétiques représentent une des classes de médicaments les plus prescrites. Ils augmentent l'élimination urinaire de sodium en agissant à différents niveaux de la surface luminale (pôle urinaire) des cellules de tubule rénal. Cet effet a pour conséquence la diminution de la volémie et de la surcharge sodique de l'organisme, donc d'une baisse de la pression artérielle, ce qui explique que certains diurétiques sont utilisés comme antihypertenseurs [109].

3.2. Mode d'action des diurétiques

3.2.1. Diurétiques thiazidiques

Les diurétiques thiazidiques réduisent la réabsorption de Cl^- et de Na^+ , essentiellement en inhibant leur Co-transport électroneutre, surtout au niveau de la partie initiale du tube contourné distal où il reste moins de 10% du Cl^- et du Na^+ filtrés par le glomérule. Par ce mécanisme, les diurétiques thiazidiques augmentent l'élimination urinaire de sodium, de chlorure et dans un moindre mesure de potassium [110].

3.2.2. Diurétiques de l'anse de Henlé

Ce sont des diurétiques à haut efficacité, ils agissent au niveau de la partie large de la branche ascendante de l'anse de Henlé où ils inhibent le Co-transport de type symport

$\text{Na}^+/\text{k}^+-2\text{Cl}^-$ en se fixant probablement sur le site chlorure du Co-transporteur. Ils diminuent la réabsorption du sodium, du potassium et du chlorure dont l'élimination urinaire augmente.

L'inhibition de transport actif de NaCl provoque une augmentation associée de l'excrétion des Mg^{2+} et Ca^{2+} , cette propriété est de grande utilité dans le traitement aigue des hypercalcémies [110].

3.2.3. Diurétiques épargnant le potassium

Les diurétiques épargneurs de potassium sont aussi appelés diurétiques distaux en raison de leurs sites d'action au niveau rénal : le tube contourné distal et le tube collecteur qui sont les deux derniers segments du néphron. Leur rôle essentiel est l'inhibition de la sécrétion tubulaire du potassium et ne sont que faiblement natriurétiques [111].

3.2.4. Diurétiques inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

L'anhydrase carbonique est une métalloprotéine à zinc activant l'hydratation du CO_2 en acide carbonique.

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique augmentent la diurèse par l'inhibition de l'anhydrase carbonique au niveau du tube contourné proximale. Ils réduisent la production intracellulaires des ions H^+ du transporteur Na^+/H^+ situé dans la membrane apicale [112].

3.2.5. Diurétiques osmotiques

Le terme de diurétiques osmotiques s'applique à des substances qui sont librement filtrées par le glomérule, ne sont pas réabsorbées par le tube rénale, sont généralement inertes sur le plan pharmacologique et peuvent être administrées en quantité importante [113].

4. Activité antibactérienne

4.1. Généralités

Une définition précise des bactéries permet actuellement d'établir les limites du mode bactérien, elle fait intervenir tous les caractères structuraux et métaboliques qui leur donnent une individualité parmi les microorganismes et permettent de les distinguer d'une part des champignons inférieures et des protozoaires, d'autre part.

Les bactéries sont connues depuis 1676, il s'agit des microorganismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire [114].

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut

entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes [114].

4.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [115].

4.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [116].

4.3.1. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens [117].

4.3.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide [118].

➤ L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. [118].

➤ L'effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées in vivo ou in vitro; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture [118].

C- Activité anticorrosion

1. Définition de la corrosion

La corrosion est une destruction non voulue des métaux (détérioration de leurs propriétés) sous l'action d'agents atmosphériques ou réactifs chimiques.

Après attaque, les métaux ont tendance à retourner à leur état primitif qui est plus stable par rapport au milieu considéré.

La détérioration par des moyens physiques n'est pas appelée corrosion, mais suivant le cas: érosion, usure, grippage...

La corrosion des métaux est due à une réaction d'oxydoréduction interfaciale irréversible entre le métal et un agent oxydant de l'environnement [119].



Selon la thermodynamique, les métaux ne sont pas stables au contact de l'air et de l'eau.

La corrosion est donc un processus spontané qui s'effectue dans la plupart des cas sans apport d'énergie d'une source extérieure.

2. Potentiel d'électrode et corrosion

Lorsqu'un métal plonge dans une solution aqueuse, ses atomes perdent des électrons et entrent en solution.



Au voisinage du métal se forme un nuage d'ions positifs alors que la surface du métal contient un excès d'électrons. L'équilibre est donc rompu et les forces électrostatiques d'attraction maintiennent les ions positifs et les électrons au voisinage immédiat de la surface métallique. Il s'établit une couche double et un champ électrique constant.

Une différence de potentiel s'établit entre le métal et la solution au voisinage immédiat du métal qui acquiert un potentiel électrique appelé "potentiel d'électrode".

Le potentiel d'électrode n'est pas accessible à la mesure expérimentale. Seule, peut être mesurée, la différence de potentiel par rapport à une électrode de référence dont le potentiel est connu.

D'après les lois de la thermodynamique on sait que :

$$G = - n. F.E$$

n : le nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction.

F : la constante de Faraday (1 F = 96500 Coulombs).

E : le potentiel d'électrode exprimé en volts et mesuré par rapport à l'électrode standard à Hydrogène (le potentiel est pris égal à 0 par convention)

Pour le cas particulier d'un métal plongé dans un électrolyte, NERNST a trouvé la relation suivante :

$$E = E_0 + \frac{0.059}{n} \log[Mn^{+}]$$

[Mn⁺] : concentration en ion-grammes par litre de solution

E₀ : potentiel standard du métal

La corrosion n'est possible que si :

$$G < 0 \text{ c'est-à-dire } E > 0$$

3. Taux de corrosion et polarisation

Si la thermodynamique et l'électrochimie permettent de prévoir la corrosion d'un métal, elles ne donnent aucune information sur la vitesse de corrosion.

C'est le phénomène de polarisation des piles qui nous indiquera le taux de corrosion.

Quand le courant électrique circule à l'intérieur d'une cellule électrochimique entre l'anode et la cathode, les deux potentiels d'électrode changent (le plus faible augmente quand l'autre diminue). La tension entre les deux électrodes diminue : c'est la polarisation.

On appelle habituellement courbe de polarisation le graphe intensité fonction du potentiel qui met en évidence le phénomène de polarisation [119].

4. Inhibiteurs de corrosion dans des milieux acides

Un inhibiteur de corrosion est un composé chimique qui, ajouté à faible concentration au milieu corrosif, ralentit ou stoppe le processus de corrosion d'un métal placé au contact de ce milieu [120].

4.1. Inhibiteurs organiques

Il existe de très nombreux composés organiques susceptibles d'être utilisés comme inhibiteurs. Ceux-ci contiennent, en principe, un centre actif susceptible d'échanger des électrons avec le métal : l'azote (N), l'oxygène (O), le soufre (S) et le phosphore (P).

Dans le but d'améliorer l'efficacité inhibitrice ou encore certaines propriétés physiques comme la solubilité en milieu aqueux.

4.2. Inhibiteurs inorganiques

D'une manière générale, les inhibiteurs inorganiques sont utilisés dans des milieux voisins de la neutralité ou alcalins. Ils agissent soit par formation d'un composé protecteur, précipité en surface, soit en aidant à la formation d'une couche d'oxyde homogène et isolante.

La quasi-totalité des molécules inorganiques inhibitrices contiennent de l'oxygène dans leur formule.

D'une manière générale un inhibiteur doit :

- diminuer la vitesse de corrosion d'un métal, en conservant ses caractéristiques physicochimiques
- présenter une stabilité (vis-à-vis des autres constituants du milieu, en particulier des oxydants et à la température d'utilisation)
- être efficace à faible concentration
- être compatible avec les normes de non-toxicité d'où la tendance vers des inhibiteurs verts biodégradables
- être peu coûteux [121].

4.3. Produits naturels comme inhibiteurs de corrosion des métaux en milieu corrosif

L'utilisation des inhibiteurs est l'une des méthodes les plus pratiques pour le contrôle de la corrosion des métaux et alliages qui sont en contact avec un environnement agressif.

Les produits naturels tels que les composés extraits de plantes semblent être une alternative écologique idéale pour remplacer les traditionnels inhibiteurs de corrosion. Les différents inhibiteurs de corrosion ainsi obtenus et appelés inhibiteurs verts, ont été largement développés. Ces composés organiques naturels sont extraits de plantes aromatiques, épices et plantes médicinales. Des extraits de plantes sont considérés comme une source incroyablement riche de composés chimiques naturellement synthétisés qui peuvent être obtenus par des procédures simples et à faible coût.

Au cours des dernières années, l'attention s'est de plus en plus focalisée sur les propriétés anti-corrosives des produits naturels d'origine végétale et l'utilisation d'inhibiteurs verts a nettement augmenté. Les nombreux travaux réalisés sur le sujet avec la diversité des conditions expérimentales sont largement rapportés par plusieurs auteurs et rendent leur synthèse difficile.

Une lecture attentive de la littérature révèle clairement que l'ère des inhibiteurs verts a déjà commencé. Cependant, les références bibliographiques suivantes ne présentent que quelques contributions des plus récentes où les propriétés inhibitrices de corrosion en milieux acides des différents extraits de plantes (extraits aqueux, alcooliques, huiles essentielles...) ont été étudiées [122-124].

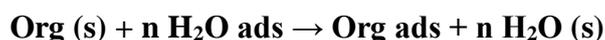
Le pouvoir d'inhibition de la corrosion dans beaucoup de ces extraits de plantes pourrait être dû à la présence de constituants hétérocycliques comme les alcaloïdes, flavonoïdes, les taninsetc.

4.4. Comportement des inhibiteurs de corrosion dans des milieux acides

Dans les milieux acides, les inhibiteurs organiques sont les plus fréquemment utilisés. Ces inhibiteurs s'adsorbent d'abord à la surface des métaux, puis interviennent dans les processus réactionnels de corrosion pour en diminuer la vitesse.

Dans les solutions aqueuses, en raison de leur caractère polaire, les molécules d'eau s'adsorbent à la surface du métal. Les inhibiteurs organiques doivent donc déplacer les molécules d'eau adsorbées (figure I.23).

L'adsorption d'une substance organique à la surface du métal peut être décrite par la réaction suivante:



Où n est le nombre de molécules d'eau déplacées à partir de la surface pour chaque molécule organique adsorbée.

Le nombre n 'est indépendant du recouvrement et de la charge du métal, mais dépend de l'aire géométrique de la molécule organique par rapport à celle de l'eau.

L'adsorption de la molécule organique se produit parce que les forces d'interaction entre la surface du métal et celle-ci sont plus fortes que les forces d'interaction entre le métal et les molécules d'eau [125].

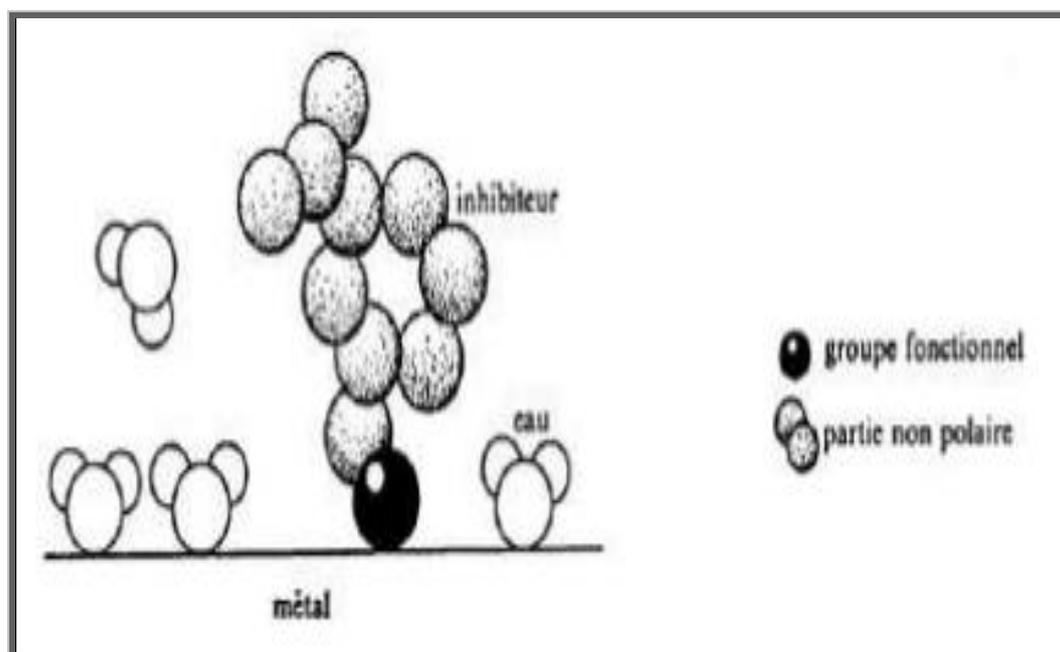


Figure I.23 : Adsorption d'un inhibiteur organique sur la surface métallique en milieu aqueux [125].

5. Méthodes d'étude des inhibiteurs de corrosion

5.1. Méthodes stationnaires : courbes de polarisation

Les méthodes stationnaires permettent d'étudier un système se trouvant dans son état quasiment d'équilibre thermodynamique.

La courbe de polarisation de l'interface métal-solution est une caractéristique fondamentale de la cinétique électrochimique, mais ne rend compte que de l'étape la plus lente du processus global à l'interface électrochimique.

Pour déterminer une courbe de polarisation, on applique, à l'aide d'un potentiostat, différents potentiels entre l'électrode de travail (ET) et une électrode de référence (ER). On mesure le

courant stationnaire qui s'établit après un certain temps dans le circuit électrique entre cette électrode de travail et une contre-électrode (CE).

Cette dernière permet de maintenir l'électrode de travail à un potentiel constant.

Le potentiostat est programmé pour balayer automatiquement le potentiel à une vitesse choisie.

Cette méthode permet de déterminer d'une façon précise les paramètres électrochimiques d'un métal au contact d'un électrolyte à savoir: la vitesse instantanée de corrosion (I_{corr}), le potentiel de corrosion (E_{corr}), les pentes de **Tafel**, la résistance de polarisation (R_p). Elle donne des mesures rapides et sa mise en œuvre est relativement simple.

La détermination de la vitesse de corrosion à partir des courbes de polarisation est étroitement liée à la cinétique régissant le processus électrochimique.

Pour déterminer expérimentalement ces paramètres électrochimiques, une présentation logarithmique de la densité de courant est en général préférable, car elle met en évidence la relation linéaire entre le logarithme de la densité de courant et le potentiel (Figure I.24).

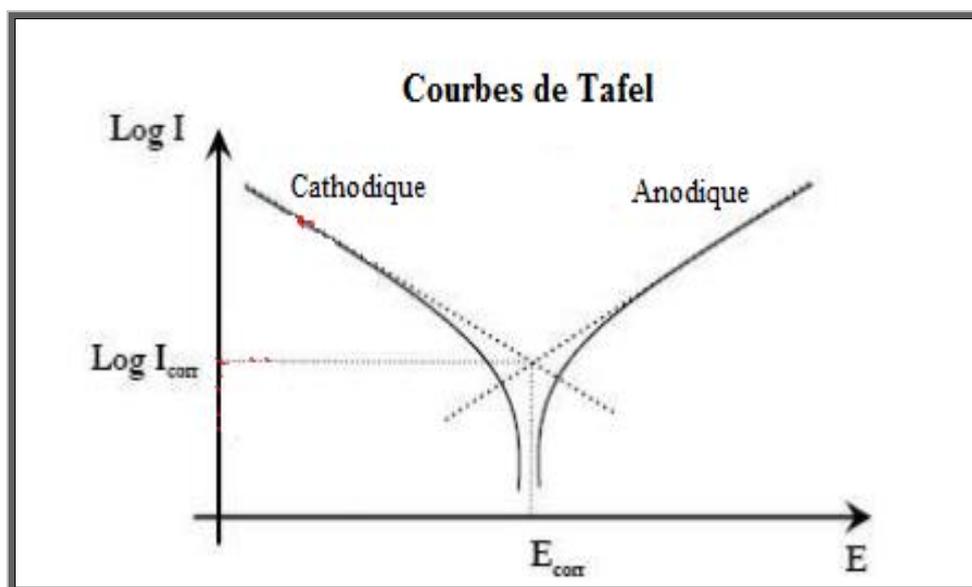


Figure I.24 : Courbe de polarisation et droites de Tafel d'un système redox à l'équilibre [125].

Le tracé permet de confirmer les indications données par l'évolution du potentiel de corrosion et de les préciser en distinguant l'influence de l'inhibiteur sur chacune des réactions élémentaires, anodique et cathodique [125].

5.2. Méthodes transitoires: la spectroscopie d'impédance électrochimique

Différentes méthodes transitoires sont décrites et se différencient les unes des autres par la forme du signal respectif appliqué : une impulsion, un balayage ou une modulation.

Les méthodes transitoires peuvent être classées en deux catégories à savoir: la méthode de perturbation de grande amplitude (voltamétrie cyclique) et la méthode de faible amplitude (impédancemétrie électrochimique). Seule cette dernière méthode est utilisée dans le présent travail et est décrite brièvement dans ce qui suit.

Cette technique présente plusieurs avantages et permet de recueillir des informations liées à la thermodynamique du système étudié et quelquefois à sa cinétique. Néanmoins, elle présente des limitations, surtout pour l'étude des mécanismes réactionnels ou dans le cas de systèmes très résistants [126].

Dans le domaine de la corrosion, elle permet la détermination précise de la vitesse de corrosion même dans le cas où le métal est recouvert d'une couche protectrice.

La S.I.E permet aussi l'évaluation du taux d'inhibition, la caractérisation des différents phénomènes de corrosion comme la dissolution ou la passivation...

La S.I.E repose sur la mesure d'une fonction de transfert résultant d'une perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Classiquement, la perturbation imposée est sinusoïdale.

L'impédance électrochimique se définit comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$ résultant du rapport :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)}$$

$E(\omega)$ est la perturbation imposée à un potentiel choisi E_0 ,

$I(\omega)$ la réponse en courant du système étudié avec une composante continue I_0 .

L'impédance $Z(\omega)$ est un nombre complexe qui peut être écrit sous la forme suivante :

$$Z(\omega) = Z_r(\omega) + j Z_j(\omega) \quad \text{Avec } j = 1-$$

Z étant le module de l'impédance,

Φ le déphasage, Z_r la partie réelle et Z_j la partie imaginaire.

$Z(\omega)$ peut ainsi être représenté en coordonnées cartésiennes par sa partie réelle et sa partie imaginaire : c'est le diagramme de Nyquist (Figure I.25) [126].

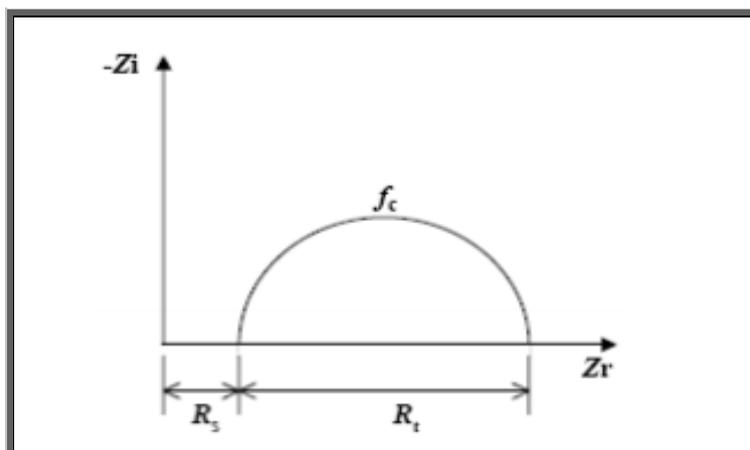


Figure I.25 : Diagramme de Nyquist (spectre d'impédance électrochimique).

6. Modes d'expression de l'efficacité d'un inhibiteur de corrosion

Il existe plusieurs façons d'exprimer l'efficacité d'un inhibiteur de corrosion. L'expression la plus courante et la plus souvent utilisée est le taux d'inhibition (%) :

$$\text{EI \%} = \frac{(u_0 - u)}{u_0} \times 100$$

Où u_0 est la mesure de la corrosion (perte de masse, intensité de corrosion, etc.) en l'absence d'inhibiteur u est la mesure en présence d'inhibiteur.

D'autres expressions sont employées mais à un degré moindre ; il s'agit du coefficient d'inhibition qui permet de différencier mieux des inhibiteurs entre eux lorsque le taux d'inhibition devient très élevé ou encore de la concentration minimale efficace [124].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Wichtl M, Anton R. Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2^{ème} édition, Ed. TEC & DOC.2003.
- [2] Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M. Les plantes dans la thérapeutique moderne. 2^{ème} édition révisée, Ed. Maloine éditeur.1986.
- [3] Richter G. Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande.1993; 317-339.
- [4] Martin S, Andriantsitohaina R. Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angiologie*. 2002 ; 51: 304-315.
- [5] Druzyńska B, Stepnińska A, Wolosiak R. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2007 ; 6: 27-36.
- [6] Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Edition Technique et documentation.1999 ; 233.
- [7] Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought1–3. *Am. J. Clin. Nutr.*81 (suppl). 2005; 223-229.
- [8] Macheix J, Fleuriet F, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*.2005; 134.
- [9] Hoffmann D. Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. Edition Inner Traditions / Bear & Co.2003; 90.
- [10] Pincemail J, Degruene F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N, Defraigne, J-O. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2007 ; 21 : 66–75.
- [11] Bruneton J. Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris.2008 ; 198-260.
- [12] Sarni-Manchado P, Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris. 2006; 2-10.
- [13] Podsedek A, Wilska-Jeszka J, Anders B, Markowski J. Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*.2000; 210: 268-272.
- [14] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79: 727-747.

- [15] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 2003 ; 317.
- [16] Sun B, Ribes A M, Leandro M C, Belchior A P, Spranger M I. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*.2006; 563: 382–390.
- [17] Lacy A, O’Kenned R. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*.2004;10, 3797-3811.
- [18] Brown S A. Coumarins In The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise. Edited by E. E. Conn: Academic Press.1981; 269-300.
- [19] Ghedira K. Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 2005 ; 04: 162-169.
- [20] Fraga C G. Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. John Wiley & Sons Edition. 2009; 5-13.
- [21] Wollenweber E, Wehde R, Dorr M, Lang G, Stevens J F. C-methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*.2000; 55: 965-970.
- [22] Tomas-Barberan F A, Ferreres F, Gil M L. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry*.2000; 23, 747.
- [23] Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozie A. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*. 2010; 2: 820-833.
- [24] Shipp J, Abdel-Aal El-S M. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*.2010; 4: 7-22.
- [25] Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L A, Favela-Torres E, Aguilar C N. Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 78 : 189-199.
- [26] Linden D, Lorient D. Pigments et arômes In Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed : Masson.1994; 338-340.
- [27] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.1999; 12: 564-582.
- [28] O’Connell J E, Fox P F. Signification and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 2001; 11(3):103-120.

- [29] Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietink A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. 1999; 27 : 445-459.
- [30] Derbel S, Ghedira K. Phytothérapie et nutrition : Les phyto-nutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 2005; 1 : 28-34.
- [31] Bhat S.V, Nagasampagi B A, Sivakumar M. Chemistry of natural products. *Ed. Narosa, New Delhi, India*. 2005; 237.
- [32] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446-475.
- [33] Qureshi N, Porter J W. Biosynthesis of isoprenoid Compounds. Porter. J. W, Spurgeon. S. L. Eds; Wiley : New York. 1981; 1: 47-94
- [34] Cram D G, Mahmoud G S. Chimie organique. 2ème édition. Quattheir-villars. 1968; 918-930.
- [35] Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris.2005 ; 522.
- [36] Brunetton J. Elément de phytochimie et pharmacognosie. Paris : Lavoisier - Tech. & doc. 1987; 584.
- [37] Kurkin V A. *Chem. Nat. Compd*. 2003; 39:123.
- [38] Padua L.S, Bunyapraphatsara N, Lemmens R. *Plant Resources of South-East Asia*. 1999; 12.
- [39] Bruneton J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 1993 ; 915.
- [40] Pellecuer J, Jacob M, Simeon B, Dusart G, Attisso M, Barthez M, Gourgas L, Pascal B, Tomei B. *Plant Med. Phytothér*. 1980 ;14:83.
- [41] Chaumont J P , Leger D. *Plant Med. Phyto*. 1989 ; 23: 124.
- [42] Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. *Food Chem*.1996; 44:1202.
- [44] Kurt Torrsell BG. Natural Products Chemistry. *John Willy & Sons Limited*. 1983; 401.
- [45] Bakkali F. Biological effects of essential oils. *Food. Chem., Toxicol*. 2007.
- [46] Lichtenthaler HK. Chlorophyll and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol*.1987; 148: 331–382.
- [47] Deming-Adams B, Gilmore A M, Adams W. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*. 1996; 10:403-412.

- [48] Wellburn A R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* 1994; 144: 307–313.
- [49] Budic-Letoc I, Lovric T, Pezo I, Klujzuric J G. Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology.* 2005; 43(1): 47-53.
- [50] Afoakwa A N, Owusu J, Adomako C, Teye E. Microwave assisted extraction (MAE) of antioxydant constituents in plant materiels. *Global Journal Of Bio-Science & Biotechnology.* 2012; (2): 132-140.
- [51] Bailon E, Buelga S. Polyphenols extraction from foods in methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science. 2003.
- [52] Meyer-Warnod B. Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist.* 1984; 9 : 93-103.
- [53] Poux M, Cognet P, Gourdon C. Génie des procédés durables, du concept à la concrétisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris. 2010 ; ISBN 978-2-10-051605-6.
- [54] Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules.* 2010; 15 : 8813-8826.
- [55] Desjobert J M, Bianchini A, Tommy P, Costa J, Bernardini A F. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis.* 1997 ; 25 (6) : 13- 16.
- [56] Longevialle P. Spectrométrie de masse des substances organiques. Masson, Paris. 1981.
- [57] Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W. Introduction to modern liquid chromatography. 3ème édition. New-York : éd. John Wiley & Sons. 2009; 960.
- [58] Rosset R, Caude M, Jardy A. Chromatographie en phase liquide et supercritique. Paris : éd. Masson. 1991; 919.
- [59] Heywood V H, Brumitt R k, Culham A, Seberg O. Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardens, Kew. 2007.
- [60] Guignard J L, Dupont F. Botanique Systématique moléculaire. 13^{ème} édition. Masson, Paris. 2004.
- [61] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Editions du centre national de la recherche scientifique : Paris. 1963.
- [62] Benayache F. Thèse de magistère de chimie, Université Constantine1. 2013.

- [63] Merghem R, Jay M, Viricel M-R, Bayet C, Voirin B. Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*.1995; 38: 637–640.
- [64] Regnault-Roger C, Ribodeau M, Hamraoui A, Bareau I, Blanchard P, Gil-Munoz M, Thomas-Barberan I. *Journal of Stored Products Research*. 2004; 40: 395–408.
- [65] Martos I, Cossentini M, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45: 2824-9.
- [66] Barberán F A T, Hernández L, Tomás F. *Phytochemistry*.1986; 25: 561–562.
- [67] Corticchiato M, Bernardini A, Costa J, Bayet C, Saunois A, Voirin B. *Phytochemistry*.1995; 40: 115–120.
- [68] Takeuchi H, Lu Z G, Fujita T. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 2004; 68 (5): 1113- 1134.
- [69] Edris A E. *A review. Phytother. Res*. 2007; 21: 308-323.
- [70] Braga, P C, Dal Sasso M, Culici M, GaSastri L, Marceca MX, Guffanti E. *Pharmacology*. 2006; 76: 61-68.
- [71] Burt S. *review. Int. J. Food Microbiol*. 2004; 94, 223-253.
- [72] May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL . *J. Antimicrob. Chemother*. 2000;45: 639-643.
- [73] Bazylo A, Strzelecka H. *Fitoterapia*. 2007; 78 : 391-395.
- [74] Jiménez-Arellanes A, Martínez R, García R, León-Díaz R, Aluna–Herrera J, Molina – Salinas G, Said-Fernández S. *Pharmacologyonline*. 2006 ; 3: 569-574.
- [75] Al-Bayati F A. *Journal of ethnopharmacology*. 2008; 166 (3): 403-406.
- [76] Selmi S, Sadok S. *Pan–American Journal of aquatic sciences*. 2008; 3 (1) : 36-45.
- [77] Boumaza O, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae). Thèse de doctorat. Université Constantine1.
- [78] Ksouri R. Ksouri W M, Jallali I, Debez A, Magné C, Hiroko I, Abdelly C. Medicinal halophytes: Potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2012; 32: 289–326.
- [79] Krishchenko V P, Rotar A I, Zadnipyryanyi, Yu F, Kosorukov M L, Pratorov U, Anofrina N D. Chemical composition and nutritive value of plants of the family Chenopodiaceae of a Libyan rangeland massif. *Izv. Timiryazevskoi Sel'skokhozyaistvennoi Akad*. 1984; 4: 38–45.
- [80] El Souda S, Matloub A, Nepveu F, Valentin A, Roques C. Phenolic composition and prospective anti-infectious properties of *Atriplex lindleyi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015; 5(10): 786-791.

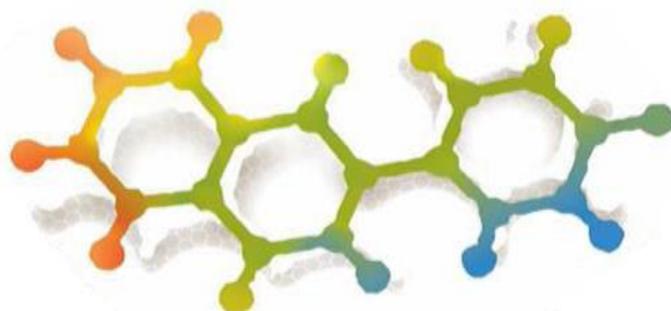
- [81] Mroczek A. Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family. *Phytochem Rev.* 2015;14: 577-605.
- [82] Kabbasha A, Shoeib N. Chemical and Biological Investigation of Some Secondary Metabolites in *Atriplex halimus* Growing in Egypt. *Natural product communications.* 2012; (7) :1-4.
- [83] Kinet J M, Benrebaha F, Bouzid, Laihacar S, Dutiut P. Le réseau *Atriplex* : Allier biotechnologies et écologies pour une sécurité alimentaire accrue en régions arides et semi arides. Actes de la 6^{ème} journée du réseau biotechnologies végétales AUPELF.UREF, Orsay Juillet. 1997.
- [84] Dutuit P, Pourrat Y, Dodeman V L. Stratégie d'implantation d'un système d'espèces adaptées aux conditions d'aridité du pourtour méditerranéen. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. *Ed AUPELFUREF.*1991 ; 65-73.
- [85] Ortiz-dorda J, Martinez-mora C, Correal E, Simon B, CENIS J L. Genetic structure of *Atriplex halimus* L. populations in Mediterranean Basin. *Annals of Botany.*2005; 95(5): 827-834.
- [86] Voorhees M E, Uresk D W, Trlica M J. Substrate relations for rillscale (*Atriplex suckleyi*) on bentonite mine spoil. *Jourof Range Manag.*1991; 44: 34-38.
- [87] Capua CJ, Hopson NP, Stewart CMM, Johnston GR, O'Neill KL, Schaalje GB, et al. Cytotoxicity of *Atriplex confertifolia*. *J Toxicol.* 2010; doi: 10.1155/2010/976548.
- [88] Salazar SFM, Verdugo AE, López CC, Martínez EB, Candelas TM, Robles-Zepeda RE. Activity of medicinal plants, used by native populations from Sonora, Mexico, against enteropathogenic bacteria. *Pharm Biol.* 2008; 46(10-11): 732-7.
- [89] Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C R Chim.* 2009; 12(12): 1259-66.
- [90] Chikhi I, Allali H, Dib MEA, Medjdoub H, Tabti B. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014; 4(3) : 181-4.
- [91] Donia Ael R, Alqasoumi SI, Soliman GA, Radwan AM. Secondary metabolites and antifertility potential of *Atriplex farinosa* Forssk. *Phytopharmacology.* 2012; 2(1): 16-25.
- [92] Feher J, Csomos G, Vereckei A. Free Radical Reactions in Medicine. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.1987.
- [93] Rice E C A, Miller N J, Bolwell, P G, Bramley P M, Pridham J B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research.* 1995; 22: 375-383.

- [94] Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 2774-2779.
- [95] Antolovich M, Prenzler P D, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002; 127: 183-198.
- [96] Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. 2003; 9: 5-21.
- [97] Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 476: 107–112.
- [98] Perron N R, García C R, Pinzón J R, Chaur M N, Brumaghim J L. Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011; 105: 745–753.
- [99] Pereira D M, Valentão P, Pereira J A, Andrade B P. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*. 2009;14: 2202-2211.
- [100] Sökmenl B B, Aydın S, Kınalıoğlu K. Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb) Norman. *IUFS Journal of Biology*. 2012; 71(1): 43-51.
- [101] Dai J, Mumper R J. Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*. 2010; 15(10): 7313-52.
- [102] Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md*. 1996; 21(6): 895-902.
- [103] Koleva V, Beek T A, Linssen J P H. Screening of Plant Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 2002; 13(1): 8- 17.
- [104] Magalhães L M, Santos M, Segundo M A, Reis S, Lima J L F C. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhyrazyl assay. *Anal.Chim.Acta*. 2006; 558, 310-318.
- [105] Kelen M, Bektas T. Screening of antioxidative properties and total phenolic compounds of various extracts of three different seed of grape varities (*Vitis vinifera L.*) from Turkish flora. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007; 10 (3) : 403-408.
- [106] Schorderet M, Dayer J M. Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation ; Analgésiques, Antipyrétiques anti-inflammatoires et immuno supresseurs (dans pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques). Slatkine, Paris-Genève. 1992; 932.

- [107] Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla M V, Sanchez-Campos S, et al. "Fruit polyphenols, immunity and inflammation." *Br J Nutr.* 2010; 104: 15-27.
- [108] Bourin M, Lèvre M, Hervé A. Cours de pharmacologie. Ellipses, 3ème édition, Paris.1993 ; 351.
- [109] Lechat P. Pharmacognosie-service de pharmacologie clinique (Ph. Lechat) chapitre 09-pharmacologie cardio-vasculaire. 2005-2006; 115-123.
- [110] Lamb J F, Ingram C G, Pitman I A. Manuel de physiologie : 8°chapitre, le rein et la miction. ©Masson, Paris.1990.
- [111] Brater D C. Diuretic therapy. *N Engl, J Med.* 1990 ; 339 (6): 387-95.
- [112] Traité de chimie thérapeutique: Médicaments du système cardiovasculaire, volume 3, AFECT. 1992; chapitre 1 :21-46.
- [113] Schorderet M. Privat Docent, pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Office des publications universitaires Alger.1992 ;153-163.
- [114] Billing J, Sherman PW. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 1998; 73 : 3-49.
- [115] Nauciel C, Vildé J L. Bactériologie médicale. 2èmeEd. Masson, Paris. 2005; 5 :10.
- [116] Bergogne-Berezin E, Dellamonica P. Antibiothérapie en pratique clinique. Ed Masson, Paris.1995 ; 486.
- [117] Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71:1006-1015.
- [118] Haddouchi F, Lazouni H, Ahammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl. Microbiol.* 1999; 86 : 985-990.
- [119] Pourbaix M, Van Rysselberghe P. *Electrochimica Acta.* 2000 ; 45:15-16.
- [120] NACE International 2007 Glossary of Corrosion Related Terms (www.nace.org).
- [121] Fiaud C. Inhibiteurs de corrosion, Techniques de l'ingénieur, COR1005.
- [122] Selles C, Benali O, Tabti B, Larabi L, Harek Y. Green corrosion inhibitor: inhibitive action of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum L.* for the corrosion of mild steel in 0.5 M H₂SO₄. *J. Mater. Environ. Sci.* 2012; 3 (1) : 206-219.
- [123] Bouyanzer A, Hammouti B, Majidi L, Haloui B. *Portug. Electrochim. Acta.* 2010; 28:165-172.
- [124] Rocha J C, Gomes J A P, D'Elia E. *Corros. Sci.* 2010; 52 : 2341–2348.
- [125] Thomas J G N. 5th European Symposium on Corrosion Inhibitors. Ann. Univ. Ferrara, Italy.1980; 453.
- [126] Gabrielli C, Keddou M. *Electrochimica Acta.*1974 ;19: 355 .

CHAPITRE II

Description des travaux personnels



1. Introduction

Ce chapitre est divisé en trois parties :

- ❖ La première comporte la description de nos travaux d'extraction par différentes méthodes, l'analyse du profil des polyphénols par chromatographie liquide à haute performance couplée avec un détecteur à photodiode des différents extraits obtenus ainsi que l'extraction des huiles essentielles de l'espèce *T.algeriensis*. Cette étude est complétée par une caractérisation des pigments spécifiques (caroténoïdes et chlorophylles).
- ❖ La deuxième partie renferme l'étude pharmacologique de l'extrait n-butanol des deux espèces.
- ❖ La troisième comporte l'étude d'activité anticorrosion de l'extrait n-butanol des deux espèces.

2. Critères de sélection des plantes

Pour la sélection des plantes, nous avons considéré un certain nombre de critères comme l'apport de la littérature.

- ❖ Nous avons sélectionné cette plantes médicinales saharienne (*T.algeriensis*) ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus, aussi le manque des études sur les fractions polaire, ainsi l'aspect chimiotaxonomique qui a une grande variabilité des huiles essentielles. Le genre *Thymus*, a montré sa richesse en flavonoïde et terpénoïdes [1].
- ❖ Les espèces du genre *Atriplex* sont réputées pour l'accumulation des métabolites secondaires de types flavonol comme composants principaux [2,3], des saponines triterpéniques [4,5], des alcaloïdes et acides aminés [6], coumarines et ecdystérols [7].
- ❖ La recherche bibliographique que nous avons menée sur l'espèce *A.mollis* a montré que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant.

3. Place dans la systématique

3.1. L'espèce *Thymus algeriensis*

L'espèce *T.algeriensis* est une espèce qui appartient à : [8]

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus algeriensis</i> Boiss & Reut

3.2. L'espèce *Atriplex mollis* Desf.

D'après Quezel et Santa (1963), *Atriplex mollis* est une espèce qui appartient à :

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta (Plantes à graines)
Classe	Magnoliophyta (Plantes à fleurs)
Ordre	Caryophyllales
Famille	Chenopodiaceae
Genre	<i>Atriplex</i>
Espèce	<i>Atriplex mollis</i> Desf

4. Description et répartition géographique

4.1. L'espèce *Thymus algeriensis* Boiss & Reut

C'est une plante avec des feuilles florales peu différentes des feuilles caulinaires, peu dilatées. Epis florifères courts et étroits ne dépassant guère 15 x 12 mm. Fleurs de 5-6 mm, à corolle moins de 2 fois plus longue que le calice Pelouses, rocailles (Figure II.1).

Très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois et oranais et dans toutes les régions montagneuses et rares ailleurs. On peut la trouver sous le nom *Th. Zattarellus* Pome (Djertil). C'est une plante endémique dans l'Afrique du nord [8].



Figure II.1 : Photo de la plante *Thymus algeriensis* Boiss et Reut.

4.2. L'espèce *Atriplex mollis* Desf.

Atriplex mollis Desf. est un arbuste ne dépassant guère 50 cm; à feuilles bien plus petites (1-2 cm), tiges dressées. Péricarpe fructifère grand de 1 cm environ, orbiculaire, papyracé et lisse (Figure II.2). Buisson très rameux à tiges blanchâtres [8].

A.mollis pousse dans des dépressions sableuses salines qui ont une nappe phréatique au nord du Sahara, en Algérie, Tunisie et Libye [9].



Figure II.2 : Photo de la plante *Atriplex mollis* Desf.

5. Etude bibliographique

- ❖ A notre connaissance, l'étude qualitative et quantitative des composés phénoliques de *Thymus algeriensis* et *Atriplex mollis* n'ont jamais été rapportées jusqu'à présent.
- ❖ La majeure partie de la littérature concerne la détermination structurale des différents polyphénols dans *Thymus algeriensis*.

6. Récolte du matériel végétal

Les plantes étudiées ont été récoltées au niveau de plusieurs sites en Algérie (Figure II.3).

- ❖ La récolte de l'espèce *T.algeriensis* a été réalisée au mois de Mai 2013 des environs de la ville de M'Sila.
- ❖ Les parties aériennes de l'espèce *A.mollis* a été récoltés au mois de Mai 2016 des environs de la ville de Beskra.

La plantes a été identifiée par le professeur **Mohamed Kaabeche** (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif).

Elle a été déposée à l'Unité de recherche VARENBIOMOL, Université des Frères Mentouri, Constantine.

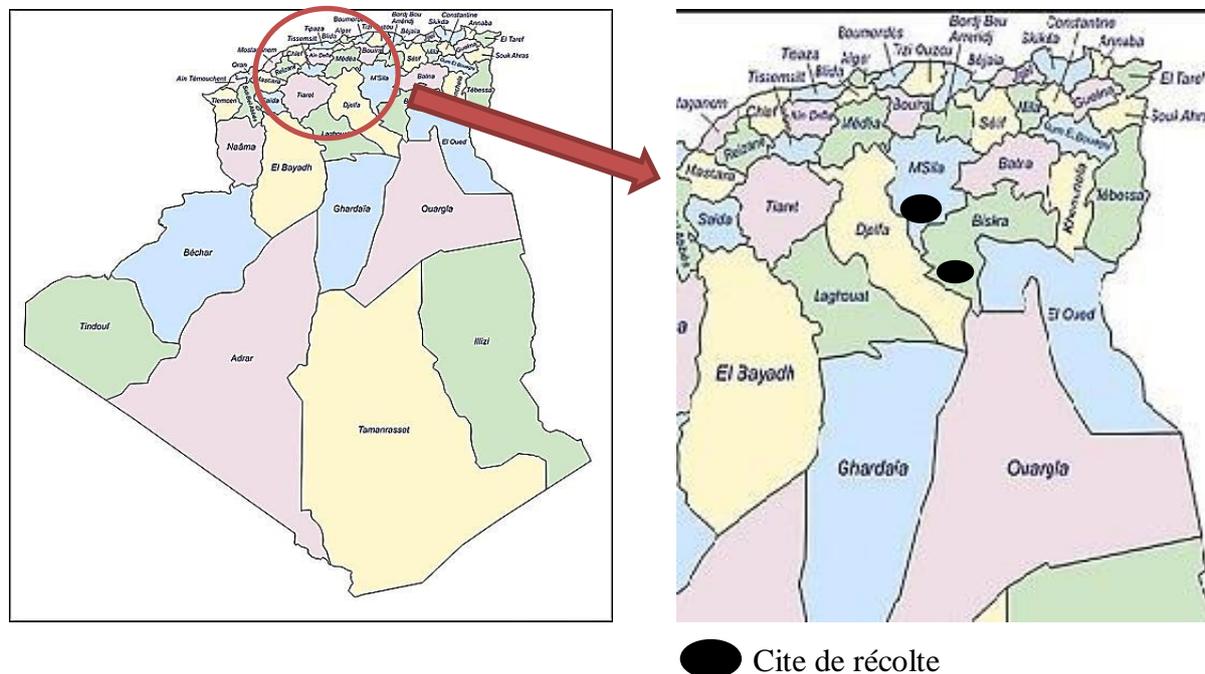


Figure II.3: Localisation géographique des sites de récolte en Algérie des plantes étudiées.

7. Préparation des échantillons

Après récolté le matériel végétal, nous avons procédé au séchage à une température ambiante (20-25°C) pendant environ un mois à l'air libre, jusqu'à la stabilisation de leur masse afin d'éviter d'éventuelles risques d'oxydation des polyphénols et de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Ensuite, les échantillons ont été récupérés et stockés à l'abri de la lumière et d'humidité.

A. Caractérisation phytochimique des parties aériennes des espèces étudiées

1. Screening phytochimique

La première étape était la recherche des grandes classes de composés chimiques appartenant aux métabolismes secondaires de la plante étudiée.

Le principe est basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration entre les réactifs et les substances désirés.

➤ Test des alcaloïdes

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du réactif de Dragendorff (solution aqueuse d'iodo-bismuthnite de potassium)

Une quantité de 5g du matériel végétal est mise à macérer dans 25 ml d'acide sulfurique dilué (H_2SO_4) (10%) pendant 24h à température ambiante.

Ensuite, le mélange est filtré et lavé avec l'eau distillée pour obtenir 25 ml de filtrat. On prélève 1ml de filtrat et on ajoute 5 gouttes de réactif de Dragendorff et on laisse reposer pendant 10 mn.

La formation d'un précipité orangé ou un changement de couleur indique la présence d'alcaloïdes [10].

➤ Recherche des terpènes et des stérols insaturés :

La présence des stérols insaturés et des triterpènes est mis en évidence à l'aide de H_2SO_4 [11].

Une quantité de la poudre végétale est ajoutée dans un mélange MeOH/ H_2O (80 /20), après agitation, filtration et évaporation à sec, on ajoute 50 ml d'éther à la solution précédente et on laisse décanter. Après séparation des deux phases et évaporation de la phase étherée, on ajoute 15ml de chloroforme à l'extrait obtenu.

Ensuite, le mélange est réparti dans trois tubes en quantité égale, comme suit:

Tube (1) : témoin.

Tube (2) : Ajouter 3 ml d'anhydride acétique.

Tube (3) : Ajouter 3 gouttes d'acide sulfurique.

Le changement rapide de couleur confirme la présence de terpène.

L'apparition de la couleur rouge cerise confirme la présence des stérols insaturés.

➤ **Recherche des triterpènes :**

La présence des stérols insaturés et des triterpènes est mise en évidence à l'aide de H_2SO_4 , comme suit [12]:

Une quantité de la poudre végétale est ajoutée à un mélange MeOH/H₂O (80 /20), après agitation, filtration et évaporation à sec, on dissout le résidu obtenu dans 1ml d'anhydride acétique, puis dans 1ml de chloroforme.

La mise en évidence des terpénoïdes est effectuée par l'ajout de 1ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter.

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone du contact des deux liquides révèle la présence des triterpènes.

➤ **Recherche des saponines:**

Les saponines sont caractérisées par leurs pouvoirs moussants en solution aqueuse [13].

On fait dissoudre 5g de la poudre végétale dans 50 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml, après décoction du mélange pendant 30 minutes, refroidissement et filtration, on prélève 5 ml du décocté et on l'introduit dans un tube à essai et on agite.

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

➤ **Recherche des quinones :**

Pour mettre en évidence la présence des quinones [14], une masse de 5g de la poudre végétale est mise à macérer dans 10ml d'éther de pétrole pendant 24 h. Après filtration, on prend 2 ml de filtrat et on ajoute 2 ml de NaOH à 10 % sous agitation.

L'apparition de la coloration rouge virant au violet indique la présence des quinones.

➤ **Recherche des coumarines**

La recherche des coumarines est réalisée selon le protocole suivant [15]:

Une masse de 1g de la poudre végétale est mise à macérer dans 20ml d'éther diéthylique pendant 24 h. Après filtration, on complète à 20ml avec de l'eau distillée, on évapore l'extrait

éthérique à l'air libre jusqu'à obtention de 5ml en reprenant avec de l'eau distillée chaude (2ml). On ajoute à ce contenu de l'ammoniaque 25%, on mélange et observe la fluorescence sous UV à 365 nm.

Une fluorescence intense dans le tube contenant de l'ammoniaque indique la présence des coumarines.

➤ **Recherche des tanins catéchiques et galliques :**

La présence de tanins galliques et catéchiques a été mise en évidence à l'aide de chlorure ferrique [12,16]. Les étapes réalisées sont comme suit :

Une masse de 2,5g de matière végétale est infusée dans 25 ml d'eau bouillante pendant 30 mn. Après filtration, on prélève 4ml du filtrat et on le partage dans deux tubes en quantité égale :

Tube (1) : on ajoute trois gouttes de chlorure ferrique FeCl_3 (1%).

L'apparition de coloration, ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques.

Tube(2) : on fait saturer la solution en acétate de sodium puis on ajoute quelques gouttes de FeCl_3 1%.

La formation d'un précipité ou changement de couleur indique la présence des tanins galliques.

➤ **Recherche des flavonoïdes :**

Plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence différents types de flavonoïdes [17]. En présence de différents réactifs les flavonoïdes donnent des réactions de coloration caractéristique.

Une masse de 5g de la poudre végétale est mise à macérer dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 min. Après filtration, on prélève 8 ml du filtrat et on les introduit dans 4 tubes à essai à raison de 2 ml par tube.

Tube (1) : témoin

Tube (2) : on ajoute 1 ml de NaOH (1N).

Tube (3) : on ajoute 1ml d'eau distillée.

Tube (4) : on ajoute 0.5ml de HCl concentré avec des copeaux de magnésium.

En présence des flavonoïdes, un changement de coloration sera observé.

➤ Recherche des anthocyanes :

Les étapes de recherche des anthocyanes sont réalisées comme suit [18]:

Une masse de 2,5g de la poudre végétale est mise à macérer dans 25 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min. Après Filtration, on complète avec un peu d'eau chaude à 25 ml. Ensuite, on prend 5 ml du filtrat auquel on additionne 5 ml de H₂SO₄ à (10%).

Si la coloration se voit par acidification jaune claire et vire vers le bleu-violacé par addition de 5 ml d'ammoniaque (10%) ceci indique la présence d'anthocyanes.

2. Procédure d'extraction

2.1. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur

L'analyse de la composition de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* a été effectuée au laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174. France.

Après distillation à la vapeur d'eau de l'espèce *Thymus algeriensis*, à l'aide d'un appareil de type Clevenger (passage de la vapeur d'eau au travers de la substance végétale) pendant une durée de 4h. Elle consiste à immerger directement la matière végétale (190 g) à traiter (coupé) dans un ballon rempli d'eau distillée (3L) surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. La masse d'huile isolée à la fin de toutes les opérations est de 1.11g, donc le rendement d'extraction a été estimé **0,58%**. L'huile essentielle de cette plante présente une couleur jaune claire avec une forte odeur.

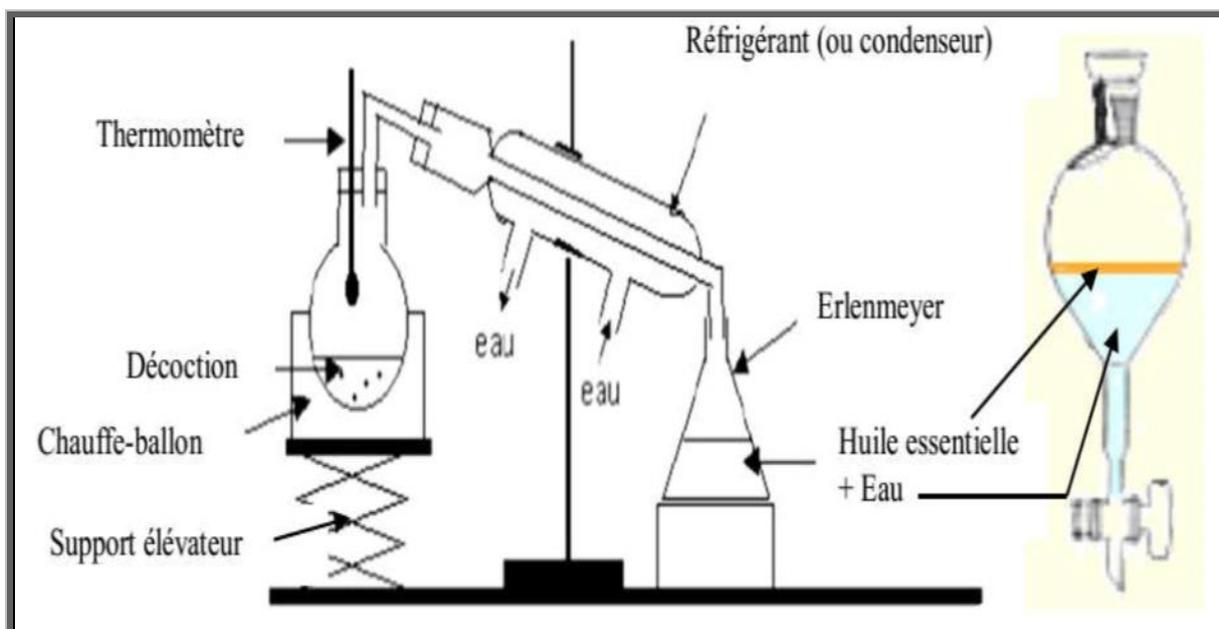


Figure II.4 : Schéma du montage utilisé pour entraînement à la vapeur.

2.2. Extraction hydroalcoolique (Macération)

Une masse de 2Kg des parties aériennes de la matière végétale est coupée en petits morceaux et mises à macérer dans un mélange éthanol/ eau (70/30) pendant 24 à 48 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 35 °C, l'extrait éthanolique est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche.

Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole afin d'éliminer la chlorophylle puis le chloroforme, l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. Les phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) sont filtrées et concentrées à sec sous pression réduite et pesées.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant (Figure II.5)

❖ Calcul du rendement

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal sec utilisé pour l'extraction en gramme. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{M_0}{M} \times 100$$

M_0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé

M : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche

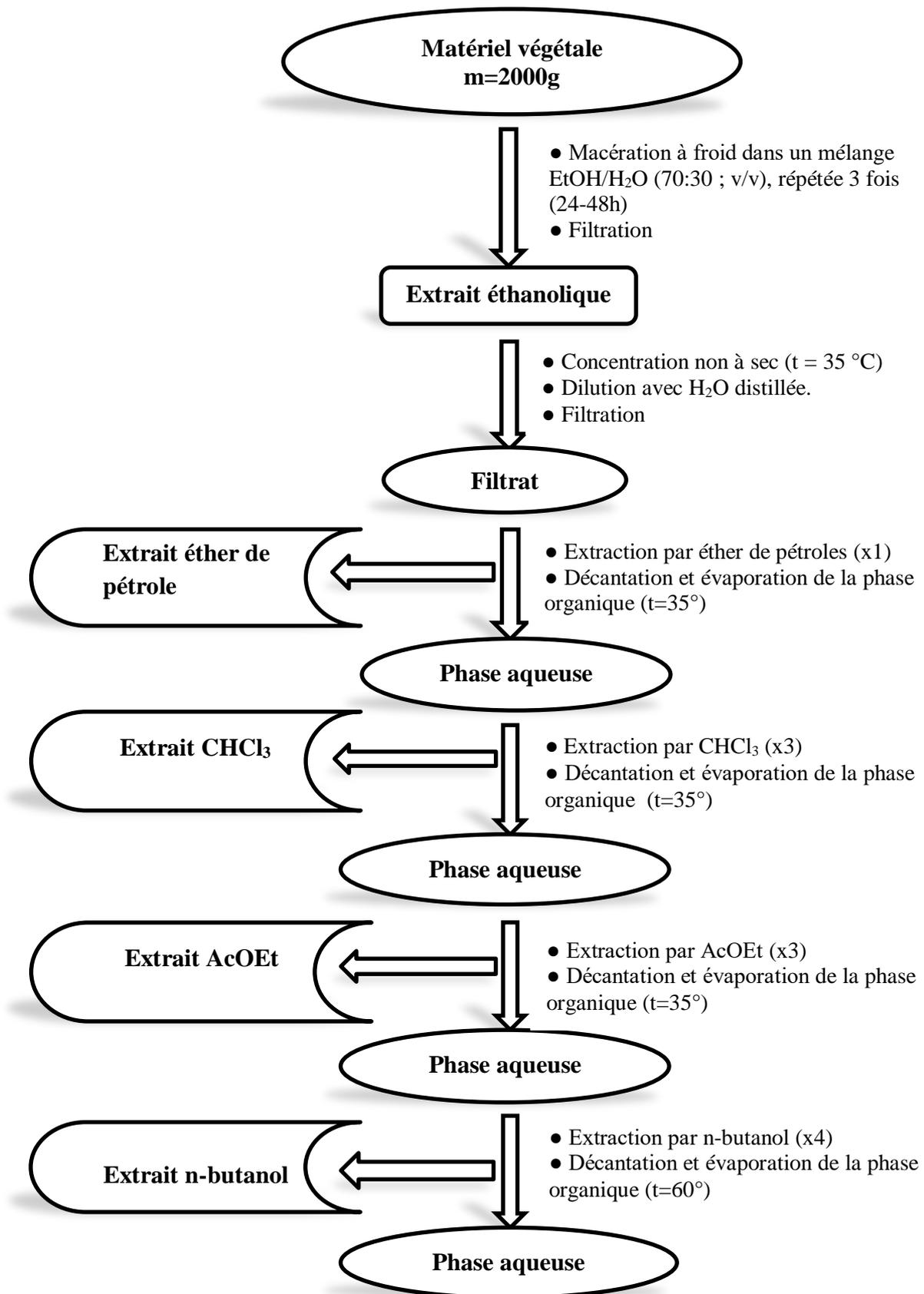


Figure II.5: Organigramme d'extraction.

2.2.1. Fractionnement des extraits

Pour l'ensemble des extraits, nous avons commencé le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour bien choisir le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats.

Le but de ce fractionnement est d'obtenir des fractions avec une composition chimique différente en utilisant des différentes méthodes avec d'autres solvants.

a. Protocole de fractionnement des extraits de l'espèce *Thymus algeriensis*

❖ Fractionnement de l'extrait chloroformique

Le fractionnement de l'extrait chloroformique de *Thymus algeriensis* a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice. L'extrait chloroformique (m= 7g) est dissout dans du méthanol et mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 222 g de gel de silice (type 60, 230-400 Mesh) préparée dans le cyclohexane, l'élution est réalisée avec un gradient cyclohexane – éther diéthylique, commençant par le cyclohexane pur, en augmentant la polarité par l'addition progressive d'éther diéthylique puis de méthanol.

Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anysaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C.

❖ Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle

L'extrait acétate d'éthyle a été testé avec plusieurs systèmes de solvant avec des polarités différentes. L'éluant utilisé est composé de deux solvants le chloroforme/méthanol.

Environ 4 g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissous dans un minimum de chloroforme. La solution est introduite à l'aide d'une pipette sur une colonne confectionnée avec 120 g de gel de silice, (type60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution débute avec le même solvant dont la polarité sera augmentée par addition progressive de méthanol. Des pots de 50 ml sont recueillis et analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous UV, puis révélées par l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C, pendant quelques minutes. Les fractions présentant le même profil chromatographique sont réunies donnant ainsi 34 fractions.

Les extraits et les fractions ont été recueillis dans un flacon à température ambiante, le solvant d'extraction a été séché sous un flux de N₂ doux à température ambiante et le résidu a été stocké à -20 ° C jusqu'à l'analyse chromatographique.

La figure II.6 résume les différentes méthodes d'extractions jusqu'à l'obtention des fractions.

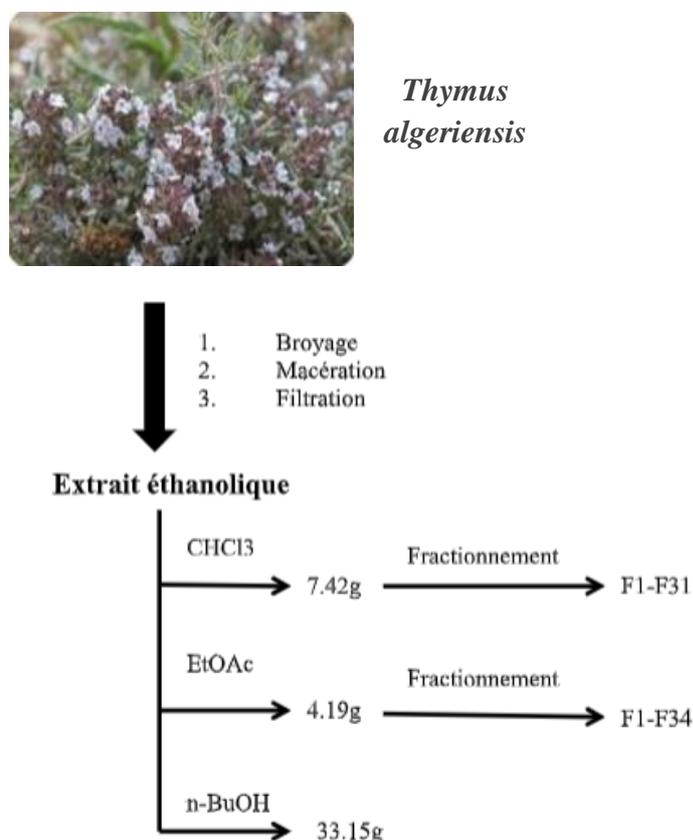


Figure II.6 : extraction et fractionnement de *T.algeriensis*.

b. Protocole de fractionnement des extraits de l'espèce *Atriplex mollis*

❖ Fractionnement de l'extrait chloroformique

L'extrait chloroforme est dissous dans le méthanol puis additionné à quelques grammes de gel de silice puis évaporé à sec afin d'obtenir un solide sous forme de poudre.

Le mélange est déposé sur une colonne de gel de silice (type60, 230-400 mesh, Merck).

L'élution est réalisée initialement par le chloroforme dont on augmente la polarité par un gradient de méthanol.

La séparation par chromatographie sur colonne a été suivie par un contrôle des lots sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant divers systèmes d'élution. L'examen des plaques est réalisé sous lumière UV à 254nm et 365nm et après révélation par l'anyaldéhyde. Les fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées.

A l'issue de ce fractionnement, 17 fractions ont été recueillies.

❖ Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduits à utiliser comme système d'élution le chloroforme-méthanol en gradient de polarité. Une masse d'environ 2.67 g d'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de le chloroforme. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système chloroforme-méthanol en commençant par le chloroforme pur avec un fractionnement tous les 25 ml.

Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées.

18 fractions ont été obtenues lors de ce fractionnement.

La figure II.7 résume les différentes extractions jusqu'à l'obtention des fractions.

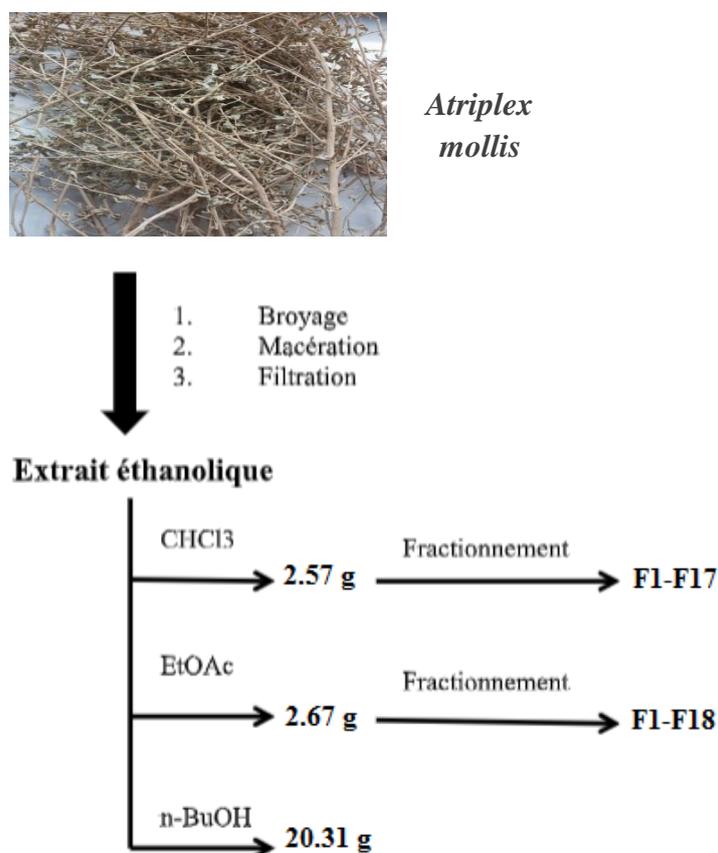


Figure II.7 : Extraction et fractionnement de l'espèce *Atriplex mollis*.

2.3. Extraction assistée par micro-ondes (Microwaves Extraction MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée en utilisant un Biotage InitiatorTM 2.0 automatique (Uppsala, Suède) caractérisé par micro-ondes de haute fréquence 2,45 GHz et une gamme de puissance de 0 à 300 W (figure II.8). La température interne des flacons a été strictement contrôlée par une sonde infrarouge (IR).

Des échantillons broyés ont été ajoutés au solvant choisi (20: 1, rapport liquide / solide). Ensuite, la suspension a été transférée dans un récipient scellé approprié pour un réacteur micro-ondes monomode automatique. L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée en chauffant à 40, 60, 80, 100 ou 120 ° C pendant 5, 10 ou 15 min puis refroidir avec de l'air sous pression. Après filtration sur papier Chromafil® PET 20/25 (taille des pores 0,2 µm, Machery-Nagel AG, Oensingen, Suisse) dans des flacons en verre brun.

Les mélanges séchés ont été stockés à -20 ° C jusqu'à une analyse chromatographique ultérieure [19].



Figure II.8 : Extracteur Biotage Initiator TM 2.0 automatique.

2.4. Extraction à fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction SFE)

L'extracteur SFE se compose de :

- Une pompe de distribution de CO₂ (PU-2080-CO₂, Jasco, Tokyo, Japon).
- Une chambre thermostatique avec une colonne d'extraction de 50 ml.
- Un détecteur UV-Vis avec cellule haute pression (875-UV, Jasco).
- Un régulateur de contre-pression automatique (BP-2080 plus, Jasco).

L'extraction a été effectuée en utilisant 20 g de la poudre végétale, qui a été chargés dans une colonne d'extraction en acier inoxydable entre deux couches de laine de coton dans les deux extrémités pour éviter les particules de colmatage de système.

La colonne d'extraction est placée dans la chambre thermostatique.

Le matériel végétal a été exposé à une extraction dynamique à 40 ° C pendant 60 min avec un débit de CO₂ de 3 ml / min. Deux différentes valeurs de pression (10 et 30 MPa) ont été appliquées afin de moduler la densité de fluide supercritique, comme indiqué dans la littérature concernant les espèces du genre *thymus* [20]. Après filtration sur Chromafil® PET 20/25 (taille des pores 0,2 µm, Machery-Nagel AG, Oensingen, Suisse) dans des flacons en verre brun, les extraits ont été recueillis à température ambiante et stocké à -20 ° C jusqu'à l'analyse chromatographique.



Figure II.9 : Extracteur à fluide supercritique.

2.5. Extraction des pigments foliaires

L'analyse des caroténoïdes totaux et de la chlorophylle a et b dans l'échantillon des espèces étudiées a été réalisé selon Solovchenko avec quelques modifications [21]. Un échantillon de masse 150 mg a été homogénéisé à l'aide d'un mortier dans 5 ml du système chloroforme-méthanol (2: 1, v / v) contenant 0,01% d'hydroxytoluène butylé (BHT) pour inhiber le processus de peroxydation.

De plus, une homogénéisation a été effectuée avec 50 mg d'oxyde de magnésium (MgO) pour prévenir la phéophytinisation de la chlorophylle. L'homogénat a été filtré avec le papier filtre. Ensuite, l'eau distillée a été ajoutée à ce filtrat à raison de 0,2% du volume d'extrait. Finalement, le mélange a été centrifugé dans un tube à essai en verre pendant 18 min à 3000 g à 10 ° C pour compléter la séparation des phases (chloroforme et méthanol / aqueux). La phase chloroforme (phase inférieure) contient les molécules hydrophobes (chlorophylles, caroténoïdes, lipides, etc.), tandis que la phase méthanol-eau (phase supérieure) contient les molécules hydrophiles.

Le spectre d'absorption de la phase chloroforme a été enregistré avec un instrument Beckman Coulter DU 800 dans la gamme de 350 à 800 nm avec une résolution spectrale de 0,5 nm à une température de 20 ° C.

Selon Wellburn (1994) [22], les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes totaux ont été déterminées à l'aide du coefficient d'absorption.

Les équations permettant de déterminer les concentrations de chlorophylle **a** (C_a) et **b** (C_b), ainsi que les teneurs totales en caroténoïdes (C_{tot}) sont indiquées ci-dessous:

- $C_a = 11,47 A_{665,6} - 2A_{647,6}$;
- $C_b = 21,85 A_{647,6} - 4,53 A_{665,6}$;
- $C_{tot} = (1000 A_{480} - 1.33C_a - 23.93 C_b)/202$.

3. Analyses qualitative et quantitative

3.1. Analyses chromatographiques par GC des huiles essentielles de l'espèce *Thymus algeriensis*

3.1.1. Analyse par Chromatographie gazeuse/Détecteur à Ionisation de Flamme (GC-FID)

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Agilent 6890 (GC-FID), équipé d'une colonne capillaire db-5 (5% -Phenyl-95%-diméthylpolysiloxane) (20m x 0,18 mm, épaisseur du film 0,18 μ m), la programmation de la température consiste en une élévation de 50 ° C (2,3

min) puis augmentation de la température de 10°C/min jusqu'à 300°C. Palier à 300 °C pendant 20 min. La température de l'injecteur était de 280 et celle du détecteur de 365 °C et alimenté par un mélange de gaz H₂/Air (H₂ : 40ml/min - Air : 450 ml /min). L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle a été diluée dans l'hexane et 1 µl a été injecté. Le gaz utilisé est l'hydrogène (H₂) avec un débit de 1ml/minute.

3.1.2. Analyse par Chromatographie gazeuse / Spectrométrie de Masse (GC/MS)

La spectrométrie de masse a été effectuée sur une chromatographie en phase gazeuse couplée d'un spectromètre de masse Agilent 7890/5975 (GC-MS), équipée d'une colonne capillaire db-5 (20m x 0,18 mm, épaisseur de film de 0,18 µm) programmé avec les mêmes conditions que pour GC-FID.

L'ionisation du spectromètre de masse (MS) a été réglée en mode impact électronique positif à 70 eV, et le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V. Les températures de la source d'ions et le quadripolaire MS étaient de 230 °C et 180 °C respectivement.

Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme m/z 33-450.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec ceux des bases de données [23].

3.2. Analyses chromatographique des extraits par HPLC/PDA

L'analyse des polyphénols des extraits est réalisée sur un HPLC avec un détecteur à ultraviolets (Photo-Diode-Array Detector : PDA).

3.2.1. Les standards analytiques utilisés

Acide gallique, catéchine, acide chlorogénique, acide 4-hydroxy-benzoïque, acide vanillique, épicatechine, acide syringique, acide 3-hydroxybenzoïque, isovanilline, acide p-coumarique, rutine, acide sinapinique, acide t-férulique, naringine, acide 2,3-diméthoxybenzoïque, acide benzoïque, acide o-coumarique, quercétine, acide t-cinnamique, naringénine, carvacrole, harpagoside (98% de pureté) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Milan, Italie).

Le méthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et n-butanol (qualité HPLC), acide acétique (99%), acétonitrile (qualité HPLC) ont été fournis par Carlo Erba Reagenti (Milan, Italie).

L'eau distillée a été obtenue en utilisant le système de traitement de l'eau Millipore Milli-Q Plus (Millipore Bedford Corp., Bedford, MA, USA).

Toutes les extractions ont été contrôlées par chromatographie sur couche mince (CCM) réalisée sur des plaques de gel de silice de 0.2 mm d'épaisseur (60 F254 Merck) et les taches ont été détectées sous une lampe à ultraviolets (UV) à 254 et 365 nm.

Les extraits ont été préparés par dissolution 1 mg de chaque extrait avec 1ml de méthanol puis centrifugé avec une centrifugeuse, modèle 5804 (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) et enfin filtré à travers un filtre millipore 0,45 µm (Phenex, Phenomenex, Torrance, CA, USA), avant l'injection dans HPLC-PDA.

3.2.2. Mode opératoire

L'étude du profil des polyphénols par HPLC-PDA a été effectuée suite à une méthode développée [20] pour les polyphénols dans le laboratoire du département de Pharmacie, Université de G. d'Annunzio" of Chieti-Pescara, Italie, en utilisant une chromatographie liquide HPLC Waters (pompe à solvant modèle 600, 2996 PDA).

La phase mobile a été directement dégazée en ligne en utilisant un dégazeur Biotech 4CH DEGASI Compact (Onsala, Suède). Le logiciel Empower v.2 (Waters Spa, Milford, Massachusetts, États-Unis) a été utilisé pour collecter et analyser des données.

La séparation chromatographique a été réalisée en mode gradient d'élution sur une colonne en phase inverse C₁₈ (Prodigy ODS(3), 4.6 x 150 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA). La colonne a été réglée à 30 °C (± 1 °C).

La phase mobile était un mélange de solvants (93% A+ 03% B) ou :

- ✓ A (Eau avec 3% (v / v) de l'acide acétique)
- ✓ B (l'acétonitrile avec 3%(v / v), de l'acide acétique).

Le tableau II.1 résume le mode graduant d'élution de la colonne.

Tableau II.1: Programme d'élution de la colonne

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)	%A	%B
0	1	93	7
0.1		93	7
30		72	28
38		75	25
45		2	98
47		2	98
48		93	7
58		93	7

Tous les extraits ont été pesés, dissous dans la phase mobile, centrifugé et filtré, puis 20 µl ont été directement injectés dans le système HPLC-PDA. Pour les échantillons hors gamme, un facteur de dilution de 1:10 a été appliqué. Les données sont rapportées en moyenne ± écart-type de trois mesures indépendantes.

L'identification de composés a été soigneusement effectuée sur la base de leur temps de rétention (vérifié également par les spectres UV-Vis) par comparaison avec ceux de composés standard purs.

Les chromatogrammes des standards utilisés ont été enregistrés à 278 nm dans laquelle tous les composés présentent une absorbance.

Les temps de rétention ainsi que la longueur d'onde d'adsorption maximale d'absorbance des standards utilisés sont mentionnés dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : Les standards utilisés avec leurs temps de rétention et leurs longueurs d'ondes.

Standards	Le temps de Rétention (min)	λ_{\max}
Acide gallique	5.82	271 nm
Catéchine	14.42	278 nm
Acide chlorogénique	16.37	324 nm
Acide 4-hydroxybenzoïque	16.73	256 nm
Acide vanillique	19.18	260 nm
Acide caféïque	19.81	315 nm
Epicatéchine	20.04	278 nm
Acide syringique	20.54	274 nm
Acide 3-hydroxybenzoïque	22.20	275 nm
Isovanilline	24	278 nm
Acide <i>p</i> -coumarique	25.66	310 nm
Rutine	26.49	256 nm
Acide sinapinique	27.64	324 nm
Acide <i>t</i> -ferulique	29.28	315 nm
Naringine	30.86	285 nm
Acide 2,3-dimethoxybenzoïque	31.71	299 nm
Acide benzoïque	32.65	275 nm
Acide <i>o</i> -coumarique	36.48	276 nm
Quercétine	45.43	367 nm
Harpagoside	46.32	280 nm
Acide <i>t</i> -cinnamique	46.57	276 nm
Naringénine	47.19	290 nm
Carvacrole	49.33	275 nm

B- Evaluation de l'activité biologique

1. Matériel Végétal

Durant cette étude, nous avons travaillé sur les extraits butanolique des deux espèces étudiées.

L'étude qualitative et quantitative par la méthode HPLC/PDA montre la richesse de ces extraits en polyphénols qui ont connu par leurs effets pharmacologique.

2. Etude pharmacologique *in vitro*

2.1. Activité antioxydante

2.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

2.1.1.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extraits n-butanol des espèces étudiées a été évaluée spectrophotométriquement selon la méthode de Folin-Ciocalteu [24], avec quelques modifications.

Le folin-Ciocalteu, réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène.

La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 755-770 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (Acide gallique comme référence), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans notre extrait.

La lecture de l'absorbance était à 765 nm.

❖ Protocole :

Une solution mère d'acide gallique a été préparée avec une concentration de 1mg/ml (1000 μ g /ml) à partir de laquelle on a préparé une série de solutions filles de 10 ml de concentrations (10, 50, 100, 150 et 200 μ g/ml). Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir de ces solutions filles d'acide gallique.

- ✓ 1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 7,5 ml d'eau distillée.
- ✓ Après agitation puis repos pendant 10 minutes, un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 10% a été ajouté.

- ✓ Les mélanges réactionnels sont agités et incubés 90 min à l'obscurité à la température de la chambre.

L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les valeurs obtenues avec les solutions filles d'acide gallique ont permis d'établir les courbes d'étalonnage correspondantes.

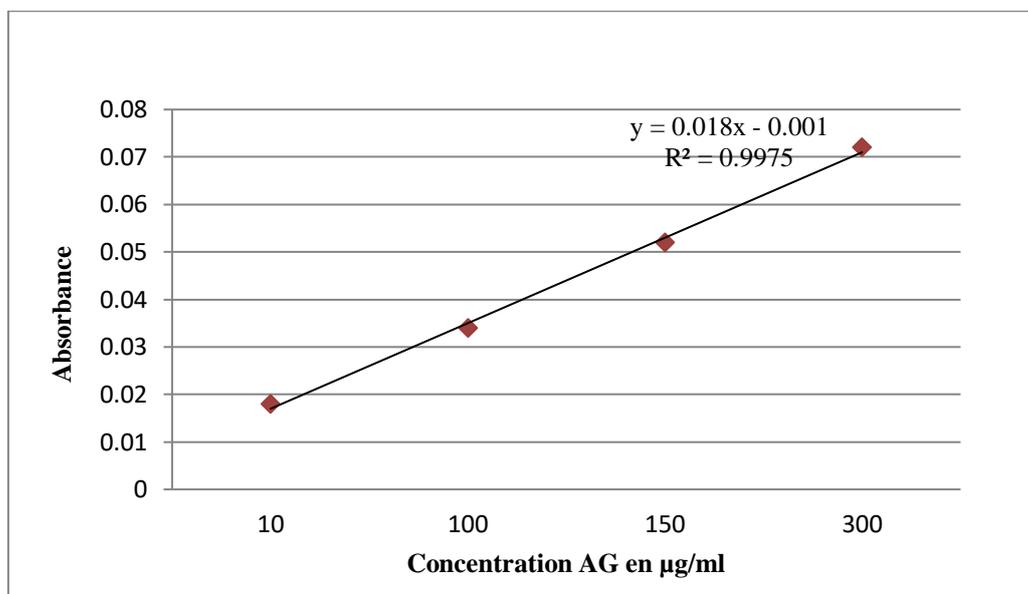


Figure II.10 : Courbe d'étalonnages de l'acide gallique de l'espèce *T.algeriensis*.

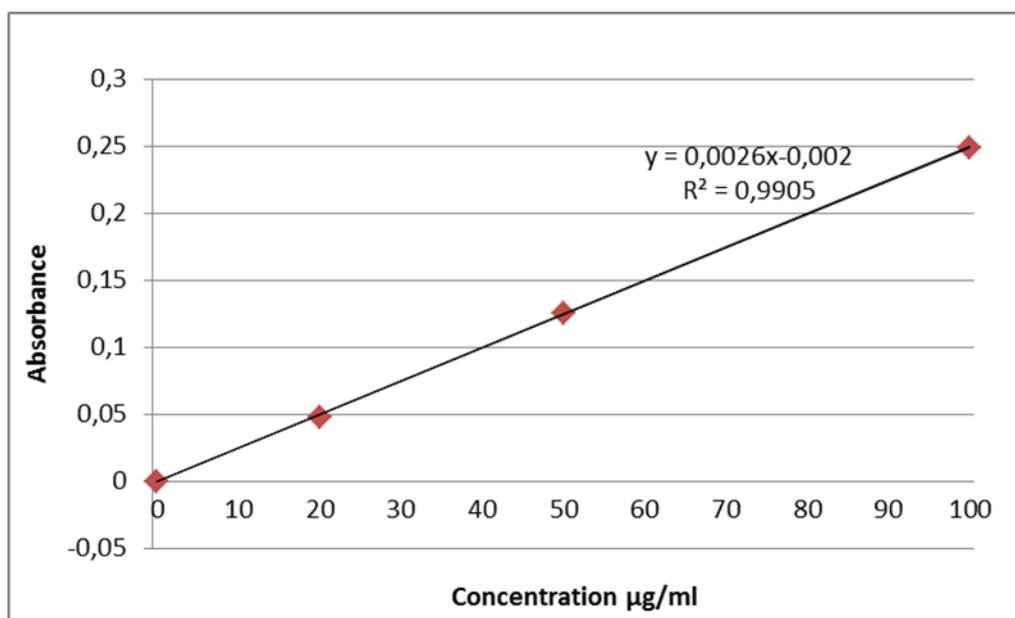


Figure II.11 : Courbe d'étalonnages de l'acide gallique de l'espèce *A.mollis*.

2.1.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée, on utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), ce réactif forme avec les groupements hydroxyles du flavonoïde un complexe très stable, de couleur jaune et absorbe à une longueur d'onde de 430 nm [24]. La quantification des flavonoïdes se fait par spectrophotométrie UV avec la rutine et la quercétine comme des flavonoïdes standards.

✓ Protocole

Une solution mère du standard (la rutine pour *thymus* et la quercétine pour *Atriplex*) a été préparé avec une concentration 1 mg /ml.

- ✓ A partir de la solution mère de la rutine ou de la quercétine (utilisée comme étalon), on va préparer des solutions filles de différentes concentrations (5, 10, 50, 100 ,150 et 200 μg).
- ✓ 1ml de chaque solution de la rutine ou de l'extrait est introduit dans des tubes à essai, suivi de l'addition 1 ml d' AlCl_3 (2% préparé dans le méthanol).
- ✓ On laisse reposer dans une chambre noire pendant une heure [25].

Après on fait la lecture de l'absorbance au moyen de spectrophotomètre à 480 nm.

Les valeurs d'absorbances obtenues avec les solutions filles de la rutine ont permis d'établir la courbe d'étalonnage correspondante.

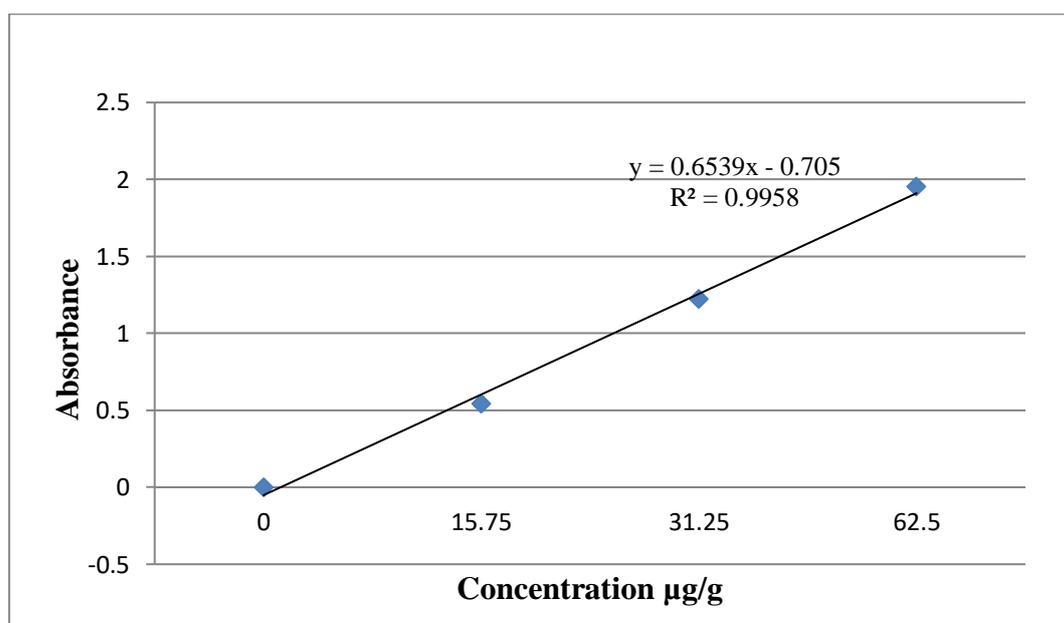


Figure II.12 : Courbe d'étalonnages de la rutine.

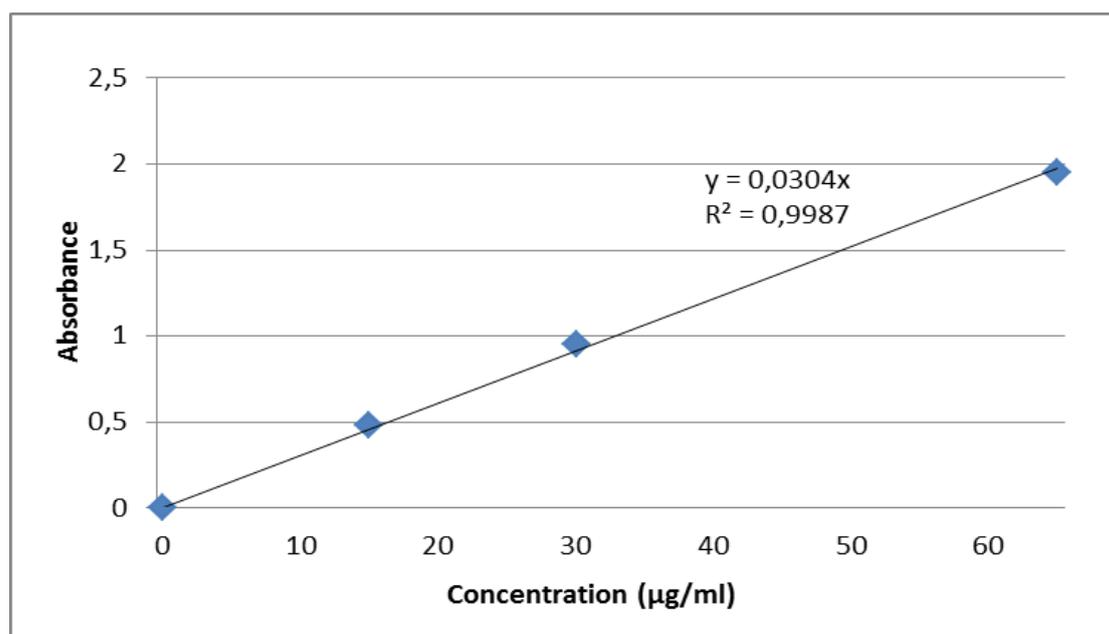


Figure II.13 : Courbe d'étalonnages de la quercétine.

2.1.2. Effet anti-radicalaire par le test au DPPH

L'effet anti-radicalaire de l'extrait n-BuOH des espèces étudiées a été évalué in vitro par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle) décrite par Ohinishi [26].

La solution du DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) est solubilisée dans le méthanol absolu pour en obtenir une solution de 0,2 mM.

1 mL de chacun des extraits à différentes concentrations (0-400 µg/ml) sont ajoutés à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,2 mM).

Après 30 min d'incubation dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance a été lue à $\lambda=517$ nm. La BHT, la BHA et α -tocophérol (0-50 µg) ont été également utilisés comme références.

L'effet antioxydant des extraits est exprimé en pourcentage de réduction de DPPH selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

2.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

❖ L'espèce *Thymus algeriensis*

Le test de blanchissement de la β -carotène a été réalisé en adoptant la méthode de Krishnaiah et ses collaborateurs [27].

L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la dissolution de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40.

Après l'évaporation complète du chloroforme par un rotavapeur (40 °C), on ajoute 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène. A 2.5 ml de l'émulsion précédente on ajoute de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Thymus* ou d'antioxydant de référence Trolox ou Vit C préparés dans le méthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence de l'extrait ou d'antioxydant de référence est suivie à $\lambda=490$ nm à des intervalles de temps réguliers pendant 120 minutes. L'activité antioxydante relative (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs au temps zéro}}{\text{Abs au temps 120 minutes}} \times 100$$

❖ L'espèce *Atriplex mollis*

L'acide linoléique en émulsion aqueuse est oxydé. Les radicaux libres formés sont piégés par le β -carotène. La mesure de l'activité antioxydante suit la diminution de la densité optique en fonction du temps. En effet la décoloration du β -carotène résulte du piégeage des radicaux formés au cours de l'autoxydation de l'acide linoléique, ce qui a pour effet de diminuer la conjugaison [28].

La méthode décrite par Marco, G.J., (1968) a été employée avec une légère modification.

Une émulsion β -carotène/acide linoléique est préparée par les mêmes procédures que dans l'espèce *T.algeriensis* sauf qu'on a ajouté seulement 50ml de l'eau distillée saturée en oxygène (barboter à l'oxygène pendant 30 min avec un débit de 100 ml/min) .Tout cela pour donner la solution A.

A 160 μ l de l'émulsion (solution A) on ajoute 40 μ l de l'extrait *n*-BuOH d'*Atriplex* ou d'antioxydant de référence : la BHT et la BHA préparés dans le méthanol (de la même manière). Les microplaques sont alors mises en incubation à 45°C pendant 120 min et l'absorbance est mesurée (à $t=0$ et $t=120$ min) à 470 nm.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence de l'extrait ou d'antioxydant de référence est suivie à $\lambda=470$ nm pendant 120 minutes.

L'activité antioxydante (pourcentage d'inhibition) des échantillons a été calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Abs du } (\beta - \text{ carotène}) \text{ à } 120 \text{ min}}{\text{Abs initiale du } (\beta - \text{ carotène})} \times 100$$

2.2. L'activité bactérienne

Pour caractériser l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol des espèces étudiées, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur gélose. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extrait végétaux.

2.2.1. Méthodes et matériels

L'étude in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait butanolique a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu solide [29].

➤ Souches bactériennes :

Toutes les souches que ce soit standard ou issues des prélèvements proviennent de l'institut Pasteur à Alger.

- ◆ *Staphylococcus aureus* : ATCC 25923
- ◆ *Pseudomonas aeruginosa* : ATCC 27853
- ◆ *Klebsiella pneumoniae* : ATCC 700603
- ◆ *Escherichia coli* : ATCC 25922

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur la gélose (MHA) nutritive en favorisant leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37°.

Les disques de papier WATMAN (N°3) imprégnés d'une quantité définie 20 µl d'extrait n-butanol sont déposés à la surface du milieu gélosé préalablementensemencé par les bactéries.

Puis, les boîtes sont incubées à 4 °C pendant 4 h pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Ensuite l'incubation est faite à 37 °C pendant 24 h (Figure II.14).

L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

2.2.2. Lecture

Toute activité antibactérienne se manifesterait par la formation d'un diamètre d'inhibition qui sera alors mesuré en mm avec une règle.



Figure II.14 : Boîtes de Pétri des quatre souches bactériennes utilisées après incubation d'extrait n-butanol (BETA et BEAM) des deux espèces.

3. Etude pharmacologique *in vivo*

3.1 Les animaux

Les expériences de notre étude pharmacologique, ont été réalisées sur les rats albinos de la souche Wistar femelles pesants entre 170-220 grammes. Les rats ont été divisés en plusieurs groupes, dans des cages en plastique opaques. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture, et la température de l'animalerie était maintenue entre 20° et 22°.

3.2. Préparation des solutions administrées

Nous avons administrés pour chaque rat une dose qui correspond à son poids corporel. Les solutions à administrer, à chaque rat, ont été préparées juste avant l'administration, en solubilisant la quantité du produit à tester dans l'eau distillée.

3.3. L'activité anti-inflammatoire

3.3.1. Protocole expérimental

3.3.1.1. Prétraitement par les extraits

Une demi-heure avant l'injection de la carragénine, un effectif de 16 rats pesant 170-200g est divisé selon les deux extraits en trois groupes, le diamètre de la patte arrière droite a été mesuré avant l'injection de la carragénine. Chaque groupe reçoit par voie orale les solutions expérimentales comme suit :

- ✓ Groupe témoin (n=4) : injecté seulement par la carragénine (non traité) pour suivre l'inflammation.
- ✓ Groupe standards (n=4) : l'anti-inflammatoire Diclofénac (50mg/kg) dissout dans l'eau.
- ✓ Groupe extrait n-but (n= 4) : l'extrait n-butanol (BETA et BEAM) à la dose de 50 mg/Kg dissous dans l'eau.

3.3.1.2. Induction de l'inflammation

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'une plante médicinale, un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte du rat induit par la carragénine a été sélectionné. Des œdèmes au niveau des pattes de rats sont induits après injection sub-plantaire (intra articulaire) d'une solution de carragénine au niveau de la patte arrière droite des rats, une heure après l'administration des extraits par voie orale. L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire [30]. Les rats utilisés sont privées de nourriture et d'eau pendant 12 heures avant la période d'expérimentation.

➤ Injection de la carragénine

Une demi-heure après l'administration des traitements, chaque animal reçoit par injection subplantaire dans la patte arrière droite 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% dissous dans l'eau.

3.3.1.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

➤ Mesure de l'œdème

Le diamètre de la patte a été mesuré, à l'aide d'un micromètre digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une demi-heure pendant trois heures. L'évolution de l'œdème de la patte a été déterminée chaque demi-heure jusqu'à 3 heures (Figure II.15).

➤ Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de rats. Il est donné par la formule suivante :

$$\%AUG = \frac{(D_n - D_o)}{D_o} \times 100$$

D_n : diamètre de la patte l'ième heure après l'injection de la carragénine.

D_0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)**

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de rats traités par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante :

$$\%INH = \frac{\%AUG \text{ témoin} - \%AUG \text{ traité}}{\%AUG \text{ témoin}} \times 100$$



Figure II.15 : Mesure de l'œdème.

3.4. L'effet diurétique

3.4.1. Protocole expérimentale

L'évaluation de l'effet diurétique consiste à mesurer le volume de l'urine émis par le rat mis en surcharge hydrosodique suivi immédiatement par l'administration du composé à tester avec une posologie de 50mg/kg. Nous avons séparé les rats en plusieurs lots, de trois rats chacun. Les animaux sont placés dans des cages de métabolisme transparent, qui nous permet de surveiller le comportement des animaux, et de récupérer les urines dans un récipient.

➤ **Administration des produits**

Pour cette étude, 15 rats sont utilisés. Ils sont repartis en cinq groupes en raison de 3 rats par cage. Les composés sont administrés en solution par gavage à l'aide d'une sonde métallique.

- ✚ Groupe 1 (3 rats) : (Témoins négatifs) animaux recevant par voie orale de l'eau distillée (40ml/kg).
- ✚ Groupe 2 (3 rats) : animaux recevant par voie orale une solution de NaCl à 0.9 %.
- ✚ Groupe 3 (3 rats) : (HCTZ) ces rats reçoivent par voie orale une solution de NaCl à 0.9 % suivie immédiatement d'une dose de 50mg/Kg de l'hydrochlorothiazide.
- ✚ Groupe 4 (3 rats) : animaux recevant par voie orale une solution de NaCl à 0.9 % suivie immédiatement d'une dose de 50 mg/Kg de l'extrait n-butanol des deux espèces (BETA et BEAM).

Les urines émises par les 3 rats de chaque cage sont collectées et mesurées chaque heure pendant 5 heures (Figure II.16).



Figure II.16 : La collection des urines.

3.4.2. Etude de l'influence des extraits sur le pH, les taux de sodium, potassium, et calcium dans les urines

Juste après le test on mesure le pH urinaire par un pH-mètre étalonné dans le but d'évaluer l'effet de nos extraits sur l'acidité des urines qui nous donne une idée sur les échanges ioniques au niveau rénal.

Les urines récupérées pour les 5 heures sont conservées au réfrigérateur en vue de les utiliser ultérieurement, pour effectuer des dosages des ions : calcium, potassium, et sodium.

Ce dosage urinaire permet de surveiller l'équilibre acido-basique de l'organisme, il est réalisé par la spectroscopie d'émission de flamme de marque AFP 100.

Principe de la méthode

Cette méthode décrite dès la fin du XIX siècle reste la méthode de référence [31]. Schématiquement les atomes sont stimulés à de hauts niveaux énergétiques en vaporisant la solution à déterminer dans une flamme. Lors de la stimulation, les électrons des sous-couches périphériques sont amenés à des niveaux énergétiques supérieurs. Lors du retour à leur état initial, ils libèrent leur énergie supplémentaire sous forme de photons. Cette émission de lumière dont la longueur d'onde de résonance est spécifique de l'atome (589 nm pour le Na^+ , 767 nm pour le K^+ , 671 nm pour le Li^+ ...) est appelée émission atomique.

La spectrométrie d'émission de flamme utilise une mesure quantitative de l'émission optique provenant des atomes stimulés pour déterminer la concentration de la substance à doser.

C- *Activité anticorrosion*

1. Introduction

Le pouvoir inhibiteur de la corrosion de l'acier en milieu acide sans et avec addition de l'extrait n-butanol sera évalué en utilisant la technique électrochimique.

Lors de cette étude expérimentale, le système électrochimique métal / solution considérée est composé par :

- une électrode en acier doux,
- un milieu acide chlorhydrique 1M.

La vitesse de corrosion d'un système électrochimique métal /solution peut être déterminée par plusieurs méthodes classiquement utilisées par les expérimentateurs.

Nous avons utilisé, pour y parvenir, l'extrapolation des droites de Tafel à partir du tracé des courbes intensité - potentiel et les diagrammes d'impédance de type Nyquist ainsi que la perte de masse de cet acier dans l'inhibiteur utilisé [32].

2. Matériels et méthodes

2.1. Inhibiteur utilisé

L'inhibiteur utilisé est l'extrait n-butanol des deux espèces étudiées (*Thymus et Atriplex*).

2.2. Matériel utilisé

Notre étude est effectuée sur l'acier de carbone 316L dont la composition massique répertoriée ci-dessous :

Tableau II.3 : La composition chimique de l'acier 316L.

Elément	C	Cr	Ni	Mo	Mn
% Massique	0,02	16-18	10,5-13	2-2,5	2

2.3. Milieu corrosif

Le milieu corrosif est constitué de l'acide Chlorhydrique HCl de 1M préparé à partir d'une solution d'acide 37%.

3. La mesure de perte de masse

Cette opération a été faite par immersion des coupons de l'acier de carbone 316L dans la surface de 1 cm² (1 cm x 1 cm x 2 mm), préalablement polies avec le papier SIC à différents graduant, et lavées avec de l'eau et de l'acétone, dans le milieu corrosif dans lequel a été additionnée l'inhibiteur à différentes concentrations, l'immersion durera 2 jours pour chaque opération [32].

L'efficacité inhibitrice a été calculée en absence et en présence d'inhibiteur selon l'expression suivante :

$$EI (\%) = \frac{W_0 - W_i}{W_0} \times 100$$

W_0 : la perte de la masse en absence de l'inhibiteur.

W_i : la perte de la masse en présence de l'inhibiteur.

4. Les mesures électrochimiques

Les expériences électrochimiques sont effectuées dans une cellule en verre pyrex, thermostatée (à double paroi) et équipée d'un montage conventionnel à trois électrodes.

- ✓ L'acier comme électrode de travail (ET).
- ✓ Le platine comme électrode auxiliaire (CE)
- ✓ Une électrode au calomel Hg / Hg₂Cl₂ / KCl saturé (ECS) comme électrode de référence (ER).

4.1. Les courbes de polarisation

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un montage comprenant un

potentiostat-galvanostat PGZ 301 de type VOLTALAB et de marque Radiometer, piloté par un logiciel d'analyse « VoltaMaster4 ».

Dans la méthode potentiodynamique, le potentiel appliqué à l'échantillon varie de façon continue de -530 à 800 mV, avec une vitesse de balayage de 1 mV.mn^{-1} [32].

L'efficacité inhibitrice a été calculée selon l'expression suivante :

$$EI(\%) = \frac{I_{\text{corr}} - I_{\text{corr}(i)}}{I_{\text{corr}}} \times 100$$

I_{corr} , $I_{\text{corr}(i)}$: représentent la densité de courant de corrosion en absence et en présence de l'inhibiteur.

Le tracé des courbes intensité-potentiel permet la détermination du potentiel de corrosion (E_{corr}), la résistance de polarisation (R_P), la densité de courant de corrosion (I_{corr}), les pentes cathodiques (b_c) et anodiques (b_a) de Tafel et par conséquent le taux d'inhibition dans les conditions opératoires utilisées.

4.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

Les mesures d'impédance électrochimique sont effectuées après une heure d'immersion en milieu acide chlorhydrique 1M à la température d'étude désirée.

Le système électrochimique et les conditions opératoires utilisés sont les mêmes que ceux des courbes de polarisation [32].

L'amplitude de la tension sinusoïdale appliquée au potentiel de polarisation est de 5 mV à des fréquences entre 10 kHz et 100 MHz .

L'efficacité inhibitrice a été calculée selon l'expression suivante :

$$EI(\%) = \frac{R_2 - R_1}{R_1} \times 100$$

R_2 et R_1 représentent respectivement les valeurs de résistance de transfert de charge en présence et en absence d'inhibiteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Takeuchi H, Lu Z G, Fujita T. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 2004; 68 (5): 1113- 1134.
- [2] Benzarti M, Rejeb KB, Debez A, Abdelly C. Environmental and economic opportunities for valorisation of the genus *Atriplex*: new insight. In: Hakeem KR, Ahmad P, Ozturk M, editors. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*. New York: Springer US; 2013; 441-57.
- [3] Awaad AS, Maitland DJ, Donia Ael R, Alqasoumi SI, Soliman GA. Novel flavonoids with antioxidant activity from a Chenopodiaceous plant. *Pharm Biol*. 2012; 50(1): 99-104.
- [4] Kamal Z, Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Ahmad S, Zeb A, et al. Anticholinesterse and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata L.*: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biol Res*. 2015; doi: 10.1186/s40659-015-0011-1.
- [5] Jabrane A, Ben Jannet H, Miyamoto T, Tanaka C, Mirjolet JF, Duchamp O, et al. Glucosides A-C, three saikosaponins from *Atriplex glauca L.var. ifiniensis* (Caball) Maire. *Magn Reson Chem*. 2011; 49(2): 83-9.
- [6] Emam SS. Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *J Nat Prod*. 2011; 4: 25-41.
- [7] Donia Ael R, Alqasoumi SI, Soliman GA, Radwan AM. Secondary metabolites and antifertility potential of *Atriplex farinosa Forssk*. *Phytopharmacology*. 2012; 2(1) : 16-25.
- [8] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Editions du centre national de la recherche scientifique : Paris. 1963.
- [9] LE Houerou HN. The role of saltbushes (*Atriplex sp.*) in arid land rehabilitation in the mediteranean bassin: A review". *Agrof. Syst*. 1992; 18 : 107-146.
- [10] Ladik C M. Rôle des produits secondaires (tanins et alcaloïdes des espèces forestières de l'est de Madagascar face à populations animales).2000; 107.
- [11] Bekro Y A, Mamyrbekova Bekro J A, Boua B B, Tra Bi F H, Éhilé E E. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*. 2007 ; 4 (2) : 220.
- [12] Mibindzou M A. Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa L*(Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata Aubrev. & Pellegr.* (Rubiaceae) récoltées au Gabon. 2004 ; 62.

- [13] Trease E. and Evans W.C. Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 3th Ed. 1987 ;61-62.
- [14] Najjaa H, Zouari S, Arnault I, Auger J.E, Ammar R, Neffati M. Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Botanica. Gallica*. 2011 ; 158(1) : 111-123.
- [15] Koudougou K. Étude de la chimie et de l'activité antimycosique des extraits de *Biophytum petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae). Université de Ouagadougou-DEA. 2000 ; 16.
- [16] Kongo-Nzuzi Y. Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de *candidas albicans*. *ISTM Kinshasa*. 2009; 25.
- [17] Bouquet A. Plantes médicinales de Congo Brazzaville. Travaux et document O.R.S.T.O.M paris.1972 ; 13-9.
- [18] Dohou N, Yamini K, Tahrouch S, Idrissi Hassani L M, Badoc A, Gmira N. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société. Pharmacie Bordeaux*. 2003 ; 66.
- [19] Mollica A, Locatelli M, Macedonio G, Carradori S, Sobolev A P, De Salvador R F, Monti S M, Buonanno M, Zengin G, Angeli A, et al. Microwave-assisted extraction, HPLC analysis, and inhibitory effects on carbonic anhydrase I, II, VA, and VII isoforms of 14 blueberry Italian cultivars. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2016; 31: 1–6.
- [20] Petrović N V, Petrović S S, Džamić A M, Ćirić A D, Ristić M S, Milovanović S L, Petrović S D. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus praecox* supercritical extracts. *J. Supercrit. Fluids* 2016; 110: 117–125.
- [21] Solovchenko A E, Chivkunova O B, Merzlyak M N, Reshetnikova I V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Russian J. Plant. Physiol*. 2001; 48: 693–700.
- [22] Wellburn A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*. 1994; 144: 307–313.
- [23] Adams R P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co.Carol Stream, Illinois 4th Ed. 2007.
- [24] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 1999; 299, 152-178.
- [25] Ayoola G A, Ipav S S, Solidiya M O, Adepoju-Bello A A, Coker H A B ,Odugbemi T O. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of

Allanblackia floribunda Oliv (Guttiferae). *International journal of health research*. 2008; 1(2): 81-93.

[26] Ohinishi M, Morishita H, Iwahashi H, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*. 1994; 36: 579-583.

[27] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011; 89: 217-233.

[28] Marco G J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1968; 45: 594–598.

[29] Carbonnelle B F, Denis A, Marmonierand G, Rivargues P. Bacteriologie medicale-techniques usuelles. 1987; 224-243.

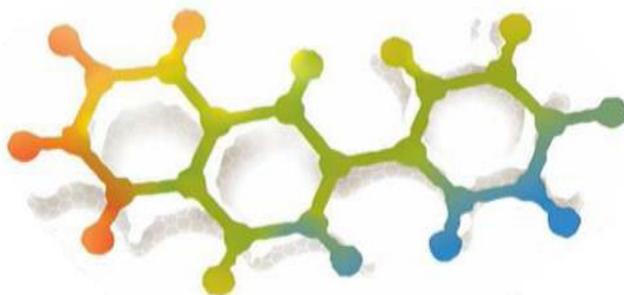
[30] Winter C A, Ristey E A, Nuss G W. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 111 : 544–547.

[31] Urbain H, Desquesnes W. Compensation instrumentale des fonds de flamme à l'aide d'un dispositifs d'émission différentielle-application à l'analyse multi élémentaire par spectrométrie d'émission atomique en flamme peroxyde d'azote-acétylène. *Spcctrochimiu Acta*. 1977; 328, 189 – 206.

[32] Benahmed M, Lafhal M, Djeddi N, Laouer H, Akkal S. Inhibition of the corrosion of carbon steel in acid solution by the extract of *Limonium thouinii* (Plumbaginaceae). *Advances in Environmental Biology*. 2012; 6(12): 4052-4056.

CHAPITRE III

Résultats et discussion



Partie 1 : L'espèce *Thymus algeriensis* Boiss & Reut.

A. Caractérisation phytochimique des parties aériennes de l'espèce *Thymus algeriensis* Boiss & Reut

1. Criblage phytochimique

Le tableau, ci-dessous, présente les résultats obtenus au terme des tests préliminaires pour le criblage phytochimique des parties aériennes de *T.algereinsis* (Tableau III.1).

Il ressort de ces résultats que notre espèce renferme la majorité des molécules polaires (flavonoïdes, des tanins et coumarines) et même apolaires (alcaloïdes, stérols et triterpénoïdes).

Il est à signaler que les quinones, les anthocyanes, les terpènes sont absents dans cette espèce.

Tableau III.1 : Résultats de screening phytochimique de *Thymus algeriensis*.

Groupe chimique	Résultats du criblage
Alcaloïdes	+
Terpènes	+
Stérols insaturés	+
Triterpènes	+
Quinones	-
Coumarines	+
Tanins	+
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	-

+: Réaction positive. -: Réaction négative

2. Rendement d'extraction

Le tableau III.2 présente le rendement d'extraction de *Thymus algeriensis* par trois méthodes à savoir: macération, SFE-CO₂ et MAE avec des solvants de polarité croissante.

Tableau III.2: Rendement des extraits.

Méthode d'extraction	Matériel végétal	Solvant	R (%)
Macération	Partie aériennes (2000g)	Ether de pétrole	0.13%
		Chloroforme	0.37%
		Acétate d'éthyle	0.21%
		n-butanol	1.65%
MAE	1g	H ₂ O	8.3–10.1%
SFE	3.29g	/	0.65-0.73%

3. Analyses qualitative et quantitative

3.1. Analyses chromatographiques par GC-FID et GC-MS des huiles essentielles de l'espèce *Thymus algeriensis*

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante.

Le tableau III.3 regroupe les composés identifiés avec leurs temps de rétention, leurs pourcentages et leurs indices de Kovats.

Tableau III.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*

N°	TR	Composé	KI	%
1	5.02	tricyclene	920	0.22
2	5.11	α -thujene	924	0.14
3	5.26	α-pinene	932	8.29
4	5.59	camphene	948	5.16
5	6.06	sabinene	971	0.43
6	6.15	β -pinene	975	1.73
7	6.41	myrcene	987	0.87
8	6.91	α -terpinene	1015	0.19
9	7.06	p-cymene	1023	0.81
10	7.15	limonene	1028	1.18
11	7.23	1,8-cineole	1032	25.12
12	7.47	(E)- β -ocimene	1045	0.16
13	7.67	γ -terpinene	1056	0.43
14	7.91	cis- hydrate de sabinene	1069	1.19

15	8.14	terpinolene	1082	0.17
16	8.37	perillene	1095	0.11
17	8.41	Linalool	1098	2.14
18	8.85	α -camphollène aldehyde	1126	1.32
19	9.09	trans-pinocarveol	1142	1.22
20	9.21	camphre	1150	18.33
21	9.43	pinocarvone	1162	1.07
22	9.59	borneol	1174	5.07
23	9.72	terpinen-4-ol	1181	0.96
24	9.82	p-cymen-8-ol	1188	0.33
25	10.30	trans-carveol	1219	0.63
26	10.67	carvone	1244	0.37
27	11.13	carvone oxide	1276	tr
28	11.25	acétate de bornyle	1284	3.38
29	11.43	carvacrol	1299	1.29
30	12.09	Acétate α -terpenyle	1345	0.23
31	12.49	α -copaene	1375	tr
32	12.60	β -bourbonene	1384	0.15
33	13.09	β -caryophyllene	1420	0.51
34	13.57	allo-aromadendrene	1461	0.34
35	13.82	ar-curcumene	1479	0.22
36	13.83	germacrene D	1481	0.28
37	13.98	α -zingiberene	1493	0.15
38	14.01	bicyclogermacrene	1496	0.21
39	14.04	α -muurolene	1497	tr
40	14.14	β -bisabolene	1506	tr
41	14.22	γ -cadinene	1513	0.12
42	14.27	δ -cadinene	1517	0.37
43	14.34	β -sesquiphellanrene	1522	0.44
44	14.55	α -cadinene	1536	tr
45	14.92	ledol	1573	0.9

Tableau III.3, suite.				
46	14.99	spathulenol	1579	1.17
47	15.06	caryophyllene oxide	1585	3.15
48	15.10	globulol	1588	0.10
49	15.20	epi-globulol	1597	0.17
50	15.68	Caryophylla-4(12) ,8(13)-diène-5-β-ol	1640	tr
51	15.74	epi-α-muurolol	1645	0.26
52	15.88	β-eudesmol	1658	1.02
53	15.95	ar tumerone	1663	0.15
54	16.22	germacrone	1695	0.21
				(%)
Total identifié				92.15
Rendement en huile				0.58
Composés groupés :				
Hydrocarbures monoterpéniques				19.81
Monoterpènes oxygénés				62.79
Sesquiterpènes hydrocarbures				03.15
Sesquiterpènes oxygénés				06.40

tr : trace

Les analyses chromatographiques de l'huile essentielle ont permis d'identifier 54 composés qui représentent environ 92.15 %. L'huile a été dominée par les **monoterpènes oxygénés** (62.79 %), suivis par **les hydrocarbures monoterpénique** (19.81%), **les sesquiterpènes oxygénés** (6.40%) et **les hydrocarbures sesquiterpéniques** (3.15 %) (Figure III.1).

L'huile essentielle de *T.algeriensis* de la région de M'sila est composée principalement de 1,8-cinéole (25.12%), camphre (18.33%) et le α-pinène (8.29%) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : camphène (5.16%), bornéol (5.07%), acétate de bornyl (3.38%), caryophyllène oxide (3.15%) et le linalol (2.14 %).

Le 1.8 cinéol est un monoterpène oxide, il est connu par leur activité anti-inflammatoire et son utilisation thérapeutique à long terme dans les maladies des voies respiratoires, comme l'asthme [1].

Le camphre est une substance aromatique pour une utilisation en médecine traditionnelle depuis des siècles, et plus récemment dans l'industrie agro-alimentaire, les parfums et les produits pharmaceutiques [2] et est un ingrédient actif utilisé pour traiter les douleurs froides et musculaires [3].

L' α -pinène est un ingrédient aromatisant alimentaire important et a été reconnu comme un additif alimentaire sûr par la Food and Drug Administration des États-Unis [4]. Il possède diverses propriétés pharmacologiques telles que les propriétés antimicrobiennes, hypertensives, antinociceptives et anti-inflammatoires. Il a été utilisé pendant des siècles dans les industries cosmétiques en particulier à des fins de saveur et de parfum [5,6].

Le diagramme ci-dessous reporte les pourcentages des différents groupes chimiques présents dans l'huile essentiels du *T.algeriensis*.

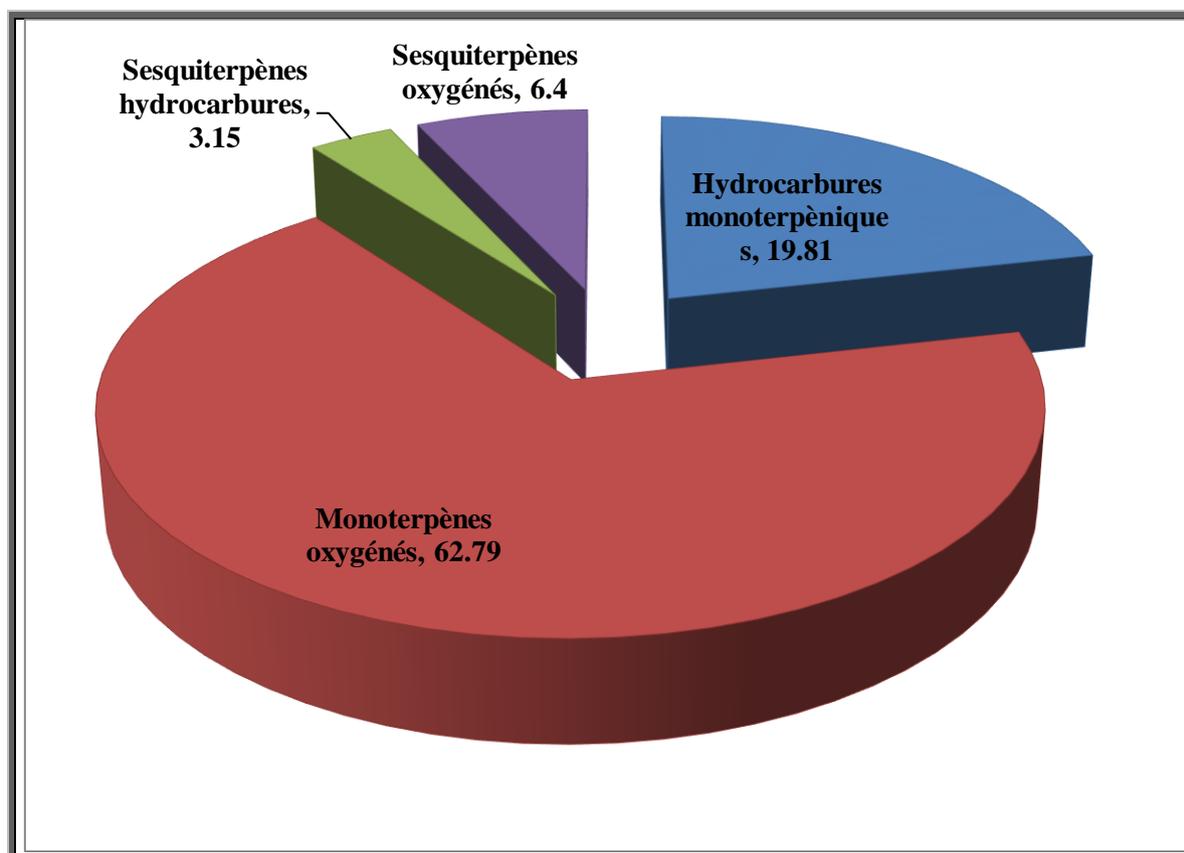


Figure III.1 : Diagramme représentatif des différents groupes chimiques présents dans l'huile essentielle du *T.algeriensis*.

Nous avons comparé la composition chimique des différents échantillons d'huiles essentielles de *Thymus algeriensis* de quatre régions en Algérie : M'Sila (espèce étudiée), Media, Souk aharas et Rélizane.

La figure III.2 regroupe les structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle de l'espèce étudiée.

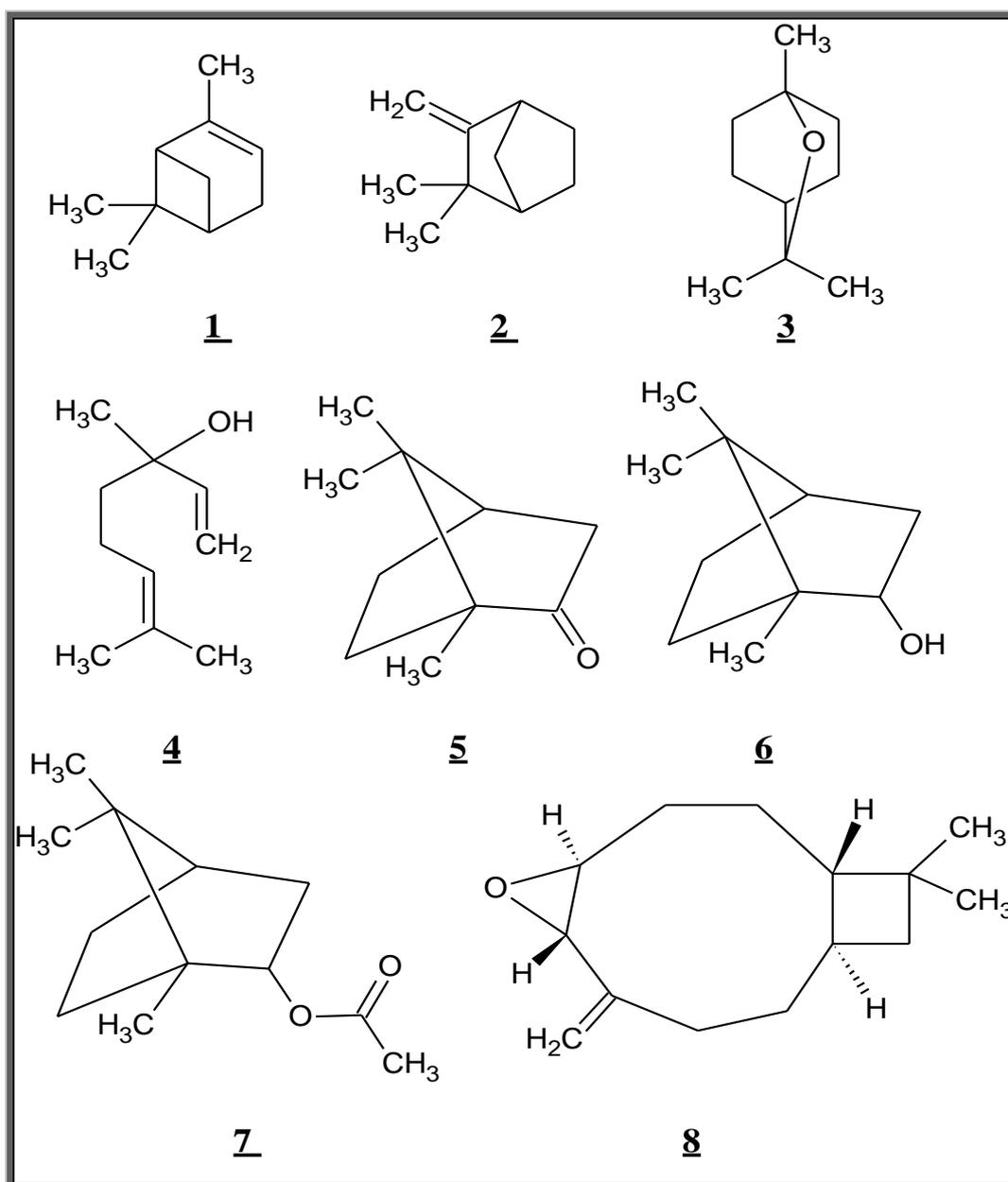


Figure III.2 : Les constituants majoritaires de l'huile essentielle de l'espèce étudiée.

En ce qui concerne la composition d'une population algérienne précédemment étudiée, on constate que L'huile essentielle de *T. algeriensis* présente un polymorphisme chimique très important. La teneur et la nature des constituants varient d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes. D'après **R.Giordani et al.** (2008) [7] ont trouvés que le α -pinène (25.52%) est le constituant le plus abondant avec le camphre et le 1,8 cinéol avec des teneurs moins important (8.45% et 7.68% respectivement).

T. Dob et al. (2006) [8] ont trouvés d'autres constituants avec des teneurs différents avec le linalol (43.7%) est le constituant principale. Tandis que **S. Bendjabeur et al.** (2018) [9] ont montrés un profil totalement différent avec des teneurs plus faible en composés majoritaire de notre espèce étudiée.

Le tableau III.4 résume une comparaison entre de la composition chimique des composés majoritaires identifiés dans notre espèce des trois régions.

Tableau III.4: Les principaux composés de l'HE de *T.numidicus* provenant de différentes régions.

Composés	N°	Teneurs relatifs %			
		l'espèce étudiée de M'Sila	L'espèce de Souk aharas Giordani et al.	L'espèce de Media T. Dob et al.	L'espèce de Relizane Bendjabeur et al.
α -pinene	<u>1</u>	8.29	25.52	0.1	2.2
camphene	<u>2</u>	5.16	-	-	0.2
1,8 cineol	<u>3</u>	25.12	7.68	tr	0.1
linalool	<u>4</u>	2.14	1.57	47.3	2.4
camphre	<u>5</u>	18.33	8.45	tr	-
borneol	<u>6</u>	5.07	1.81	0.2	0.3
bornyl acetate	<u>7</u>	3.38	1.12	0.1	-
caryophylene oxide	<u>8</u>	3.15	-	-	-
Rendement %		0.58	2.67	1.13	2-3

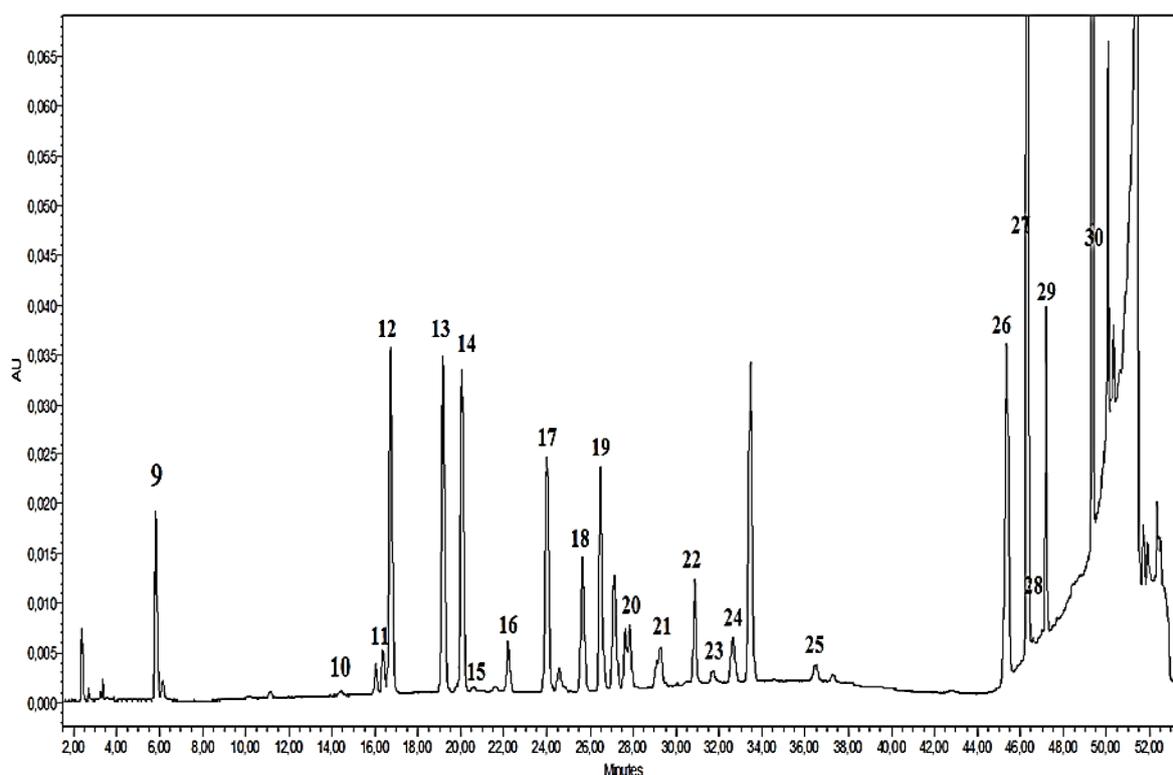
tr : trace

Plusieurs facteurs influent sur le rendement, la composition et la teneur des constituants des huiles essentiels :

- ✓ Environnement chimique de la plante
- ✓ la partie de la plante utilisée,
- ✓ l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif,
- ✓ des facteurs génétiques [10-14]

3.2. Profil des polyphénols par la méthode HPLC-PDA

Les figures III.3 et III.4 représentent ainsi que le chromatogramme enregistré à 280nm et les structures chimiques des standards utilisés dans l'analyse HPLC-PDA.



9 Acide gallique, **10** Catechine, **11** Acide chlorogénique, **12** Acide 4- hydroxybenzoïque, **13** Acide vanillique, **14** Epicatechine, **15** Acide syringique, **16** Acide 3-hydroxybenzoïque, **17** Isovanilline, **18** Acide p-coumarique, **19** Rutine, **20** Acide sinapinique, **21** Acide t-ferulique, **22** Naringine, **23** Acide 2,3-dimethoxybenzoïque, **24** Acide benzoïque, **25** Acide o-coumarique, **26** Quercétine, **27** Harpagoside, **28** Acide t-cinnamique, **29** Naringénine, **30** Carvacrole.

Figure III.3: chromatogramme du mélange des standards utilisés.

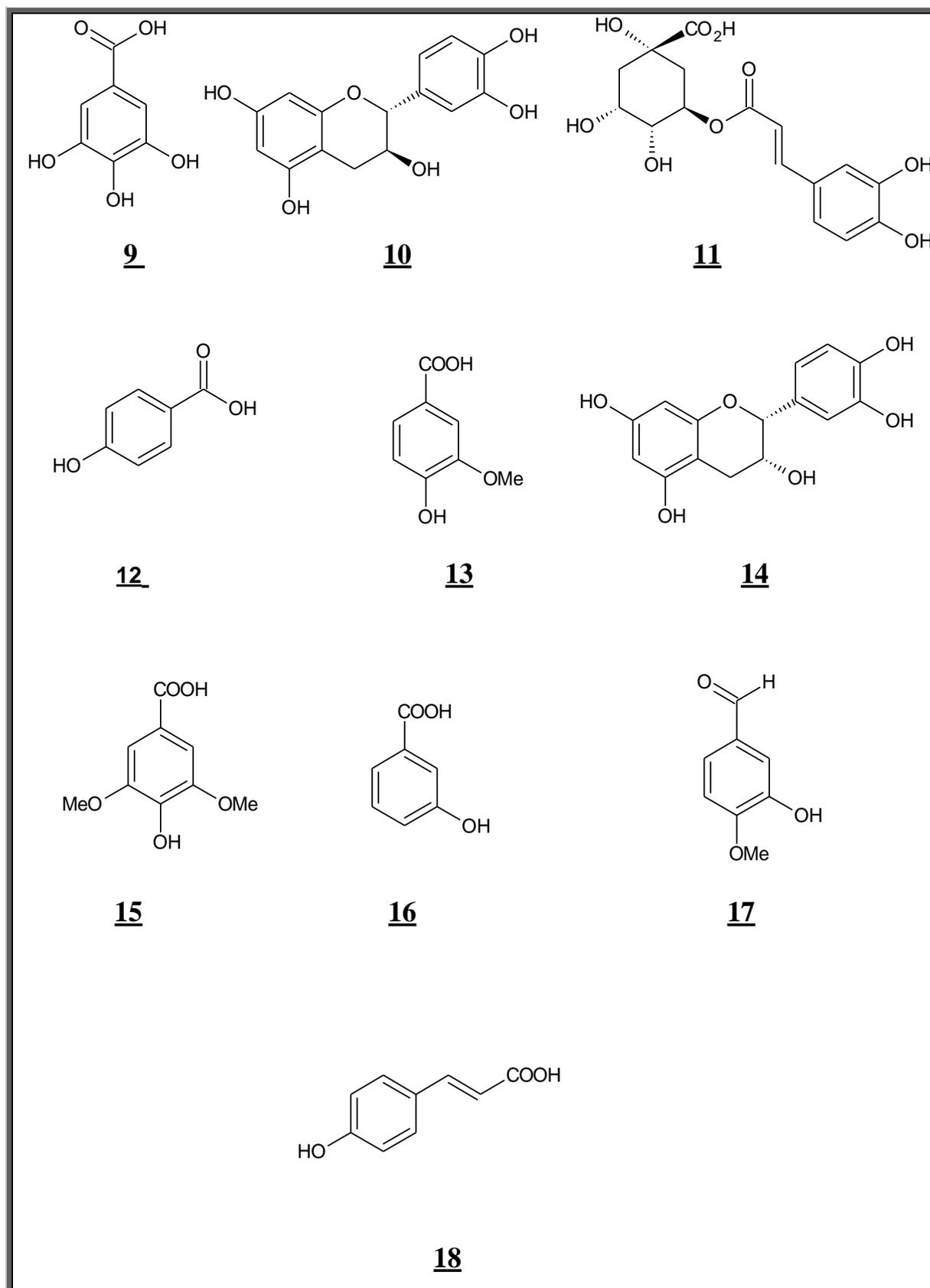


Figure III.4 : Les structures chimiques des standards utilisés.

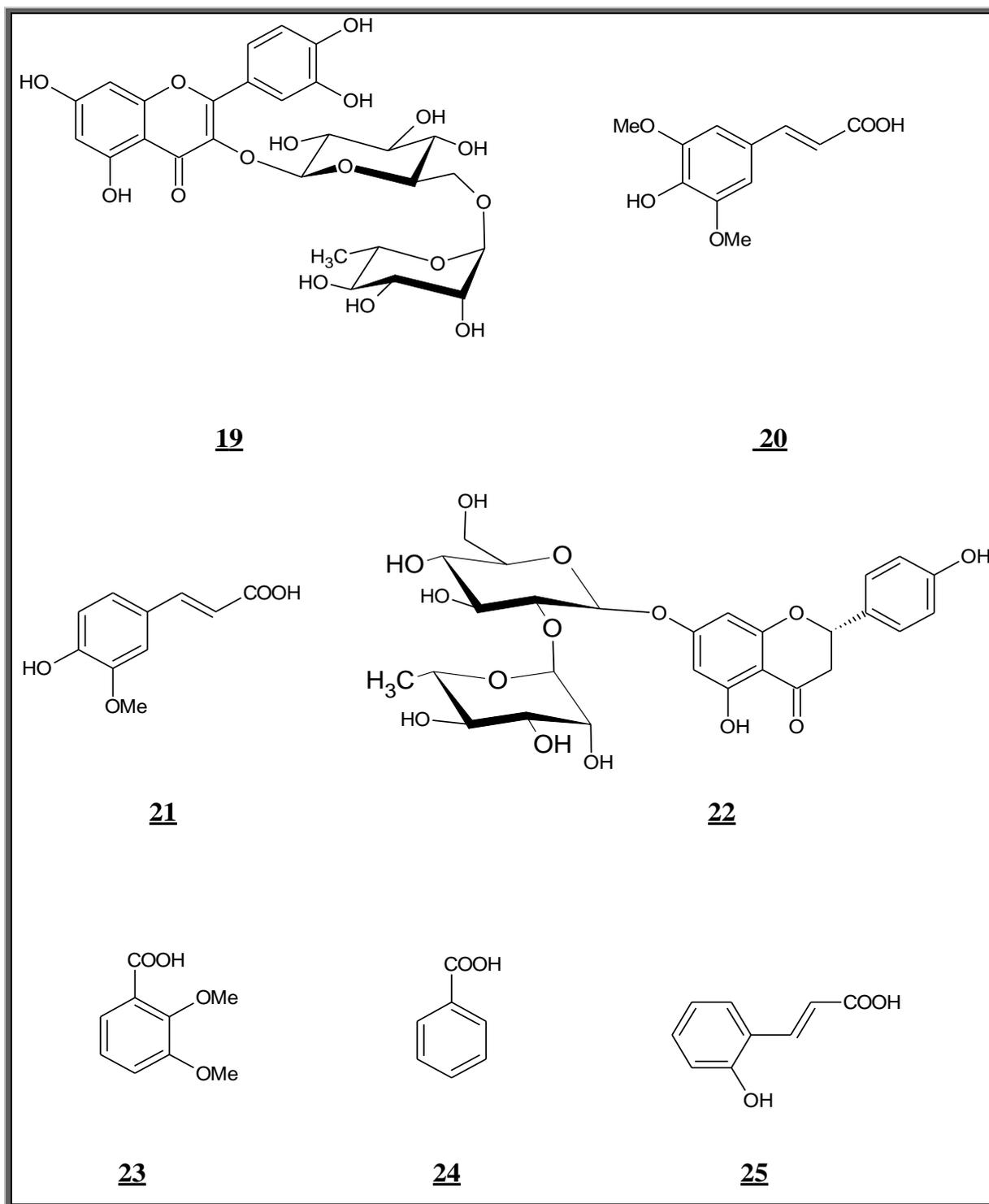


Figure III.4, la suite.

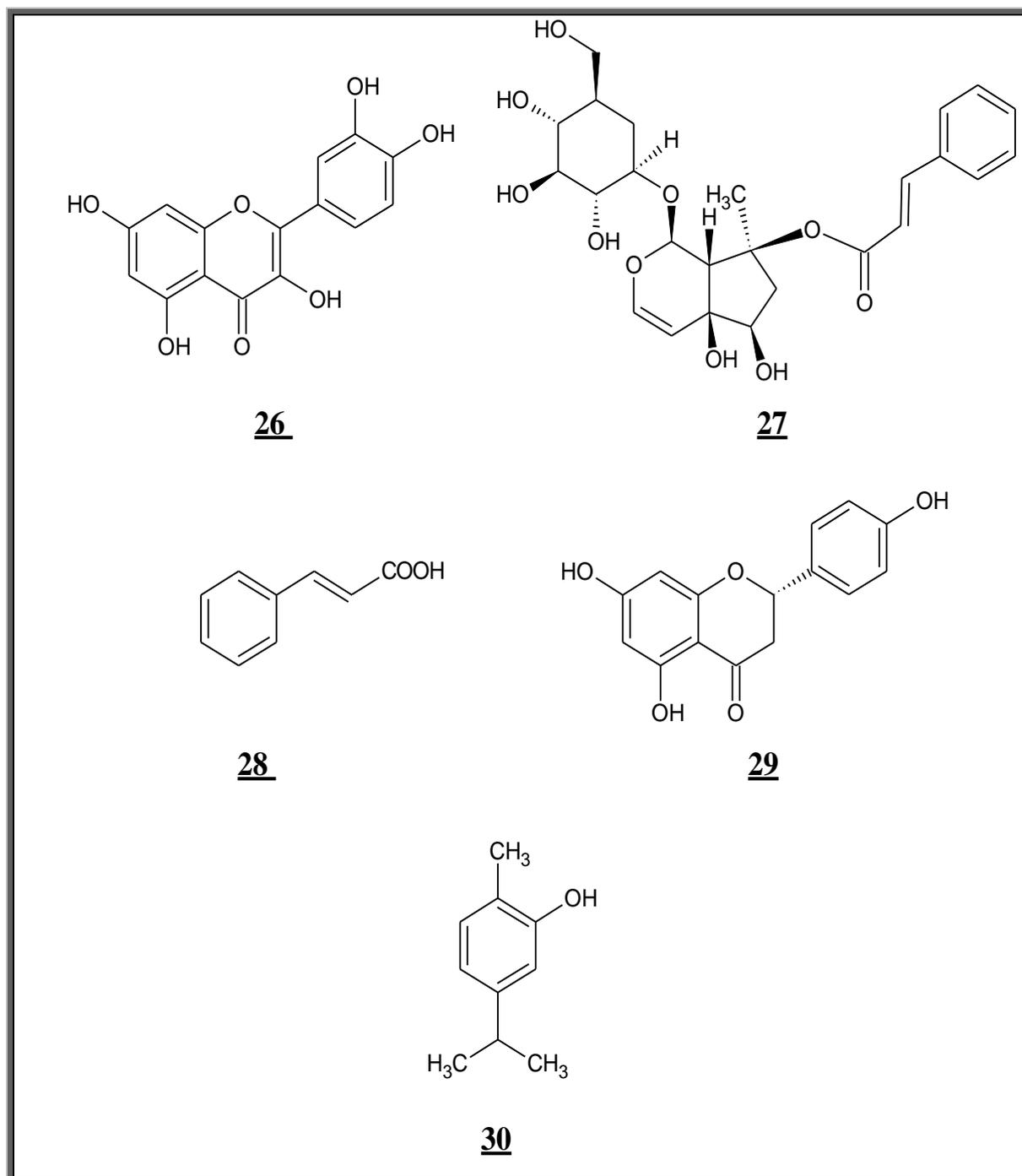


Figure III.4, la suite.

3.2.1. Le profil des polyphénols des sous fractions des extraits obtenus par macération

L'objectif de l'étude qualitative et quantitative des différents extraits et sous-fractions de parties aériennes de *T. algeriensis* est de comparer les procédures d'extraction afin de les développer pour obtenir des meilleurs rendements.

Les résultats de la composition chimique des sous fractions et de l'extrait n-butanol des parties aériennes de *T.algeriensis* obtenus par HPLC-PDA sont présentés dans le tableau III.5. L'extraction liquide-liquide on utilisant des différents solvants avec une polarité croissante nous a conduit à une purification préliminaire et nous oriente vers des métabolites spécifiques. Le sous-fractionnement successif des extraits de CHCl₃ et d'AcOEt a mis en évidence la présence de métabolites secondaires spécifiques sur la base des résultats obtenus d'analyse chromatographique (HPLC-PDA).

Tableau III.5 : L'analyse HPLC-PDA des différents extraits du *T.algeriensis* obtenus par extraction hydroalcoolique et des sous-fractions.

Composés identifiés	Teneur ($\mu\text{g/g PS} \pm \text{ET}$)						n-BuOH
	(CHCl ₃)			(AcOEt)			
	F ₁₆	F ₂₄	F ₃₀	F ₁₃	F ₂₂	F ₂₇	
Catéchine	1.12 \pm 0.01	n.d	n.d	n.d	n.d	6.23 \pm 0.05	n.d
Acide 4-Hydroxy-benzoïque	n.d	n.d	n.d	n.d	16.31 \pm 0.91	3.61 \pm 0.30	0.66 \pm 0.02
Acide Vanillique	5.17 \pm 0.11	0.23 \pm 0.01	n.d	n.d	0.22 \pm 0.0	n.d	n.d
Epicatéchine	n.d	n.d	6.78 \pm 0.12	0.55 \pm 0.01	n.d	n.d	48.03 \pm 2.98
Acide Syringique	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.93 \pm 0.11
Acide p-Coumarique	n.d	n.d	n.d	1.26 \pm 0.81	40.62 \pm 3.01	1.63 \pm 0.88	1.70 \pm 0.58
Rutine	0.57 \pm 0.02	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4.52 \pm 0.41
Acide t-Ferulique	0.20 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01	n.d	n.d	1.46 \pm 0.13	0.84 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01
Naringine	n.d	0.16 \pm 0.01	n.d	4.02 \pm 0.39	0.46 \pm 0.01	n.d	n.d
Acide 2,3-Dimethoxy-benzoïque	6.51 \pm 0.59	n.d	n.d	n.d	7.51 \pm 0.47	n.d	3.52 \pm 0.20
Acide benzoïque	n.d	10.92 \pm 1.21	n.d	5.71 \pm 0.47	n.d	n.d	n.d

Acide o-Coumarique	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.03 ± 0.09	9.83 ± 0.87
Naringenine	8.97 ± 0.74	0.90 ± 0.03	n.d	n.d	n.d	n.d	0.47 ± 0.01
Carvacrole	0.43 ± 0.01	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Composés identifiés	7	5	1	4	6	5	9
Composés identifiés par extrait	10			10			9
Totale	22.97 ± 1.01	12.44 ± 1.03	6.78 ± 0.12	11.54 ± 0.99	66.58 ± 2.70	13.34 ± 1.12	71.21 ± 2.40

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. µg /g PS : poids sec.

L'extrait acétate d'éthyle était le plus riche en composés phénoliques (10 produits parmi les standards) appartenant aux deux grandes familles des métabolites secondaires (acides phénoliques et flavonoïdes), tandis que les deux extraits chloroforme et n-butanol 10 et 9 composés ont été détecté respectivement.

Le principal composé présent dans les fractions acétate d'éthyle était l'acide p-coumarique avec une teneur moyenne de 40.62 µg / g.

L'acide p-coumarique est largement distribué dans le raisin, le vin blanc et rouge, la tomate, les épinards, le café, les carottes et les ails. PCA possède des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, hépato-protecteur et reno-protecteur, anti neurodégénératif, hypocholestérolémiant et améliore la résistance à l'insuline [15].

D'autres composés abondants dans cet extrait étaient l'acide 4-Hydroxy-benzoïque (16.31 µg/g), acide 2,3-dimethoxybenzoïque (7.51 µg/g), catéchine (6.23 µg/g) et l'acide benzoïque (5.71 µg/g).

D'autre part, pour l'extrait chloroforme le produit principale est acide benzoïque avec une teneur de 10.92 µg/g, avec des composés plus abondants étaient la naringénine (8.97 µg/g), epicatéchine (6.78 µg/g) et l'acide 2,3-dimethoxybenzoïque (6.51 µg/g).

L'acide benzoïque est connu pour son activité antimicrobienne contre divers champignons pathogènes [16]. Il est largement utilisés avec ses sels sont comme agents de conservation des aliments et sont connus sous les numéros E210, E211, E212 et E213 [17-19].

L'acide benzoïque et ses sels sont autorisés comme additifs alimentaires selon les lois internationales, mais leur contenu doit être déclaré sur l'emballage et ne doit pas dépasser les

limites établies, car leur utilisation excessive peut entraîner une acidose métabolique, des convulsions et une hyperpnée chez l'homme [20]. La direction de l'Union européenne a établi la teneur maximale en acide benzoïque à 150 mg.l^{-1} (0,015%). Par conséquent, la surveillance de la teneur en acide benzoïque dans les aliments et les boissons est une tâche importante pour la chimie analytique. Un contrôle particulièrement strict devrait être effectué pour la nutrition des enfants.

Le carvacrol, un monoterpène monocyclique a été détecté uniquement dans la phase chloroforme avec une teneur moins importante $0.43 \text{ }\mu\text{g/g}$.

L'épicatéchine était également la plus abondante dans l'extrait n-butanol avec une teneur considérable atteint $48.03 \text{ }\mu\text{g/g}$, tandis que parmi les six acides phénoliques présents dans cet extrait, l'acide o-coumarique est le plus abondants atteint $9.83 \text{ }\mu\text{g/g}$.

De façon intéressante, la catéchine est connue par leur activité antioxydante et antimicrobienne, elle est utilisée dans l'emballage actif, incorporé dans le film d'amidon PVA, pour améliorer la durée de conservation des aliments [21].

A notre connaissance, les études sur la détermination qualitative et quantitative des composés phénoliques dans *T.algeriensis* n'ont jamais été rapportées jusqu'à présent.

La majeure partie de la littérature concerne la séparation des polyphénols dans *T.algeriensis*.

La figure suivante regroupe les chromatogrammes des différents extraits et fractions obtenus par macération de l'espèce *T.algeriensis*.

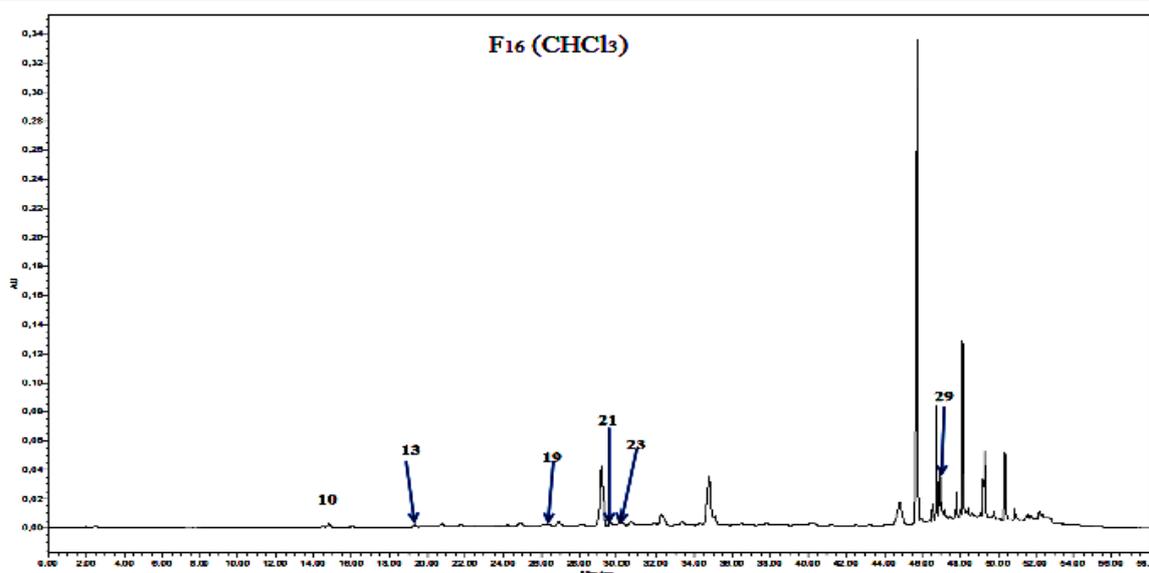


Figure III.5 : Chromatogrammes des extraits obtenus par macération (extraction hydroalcoolique).

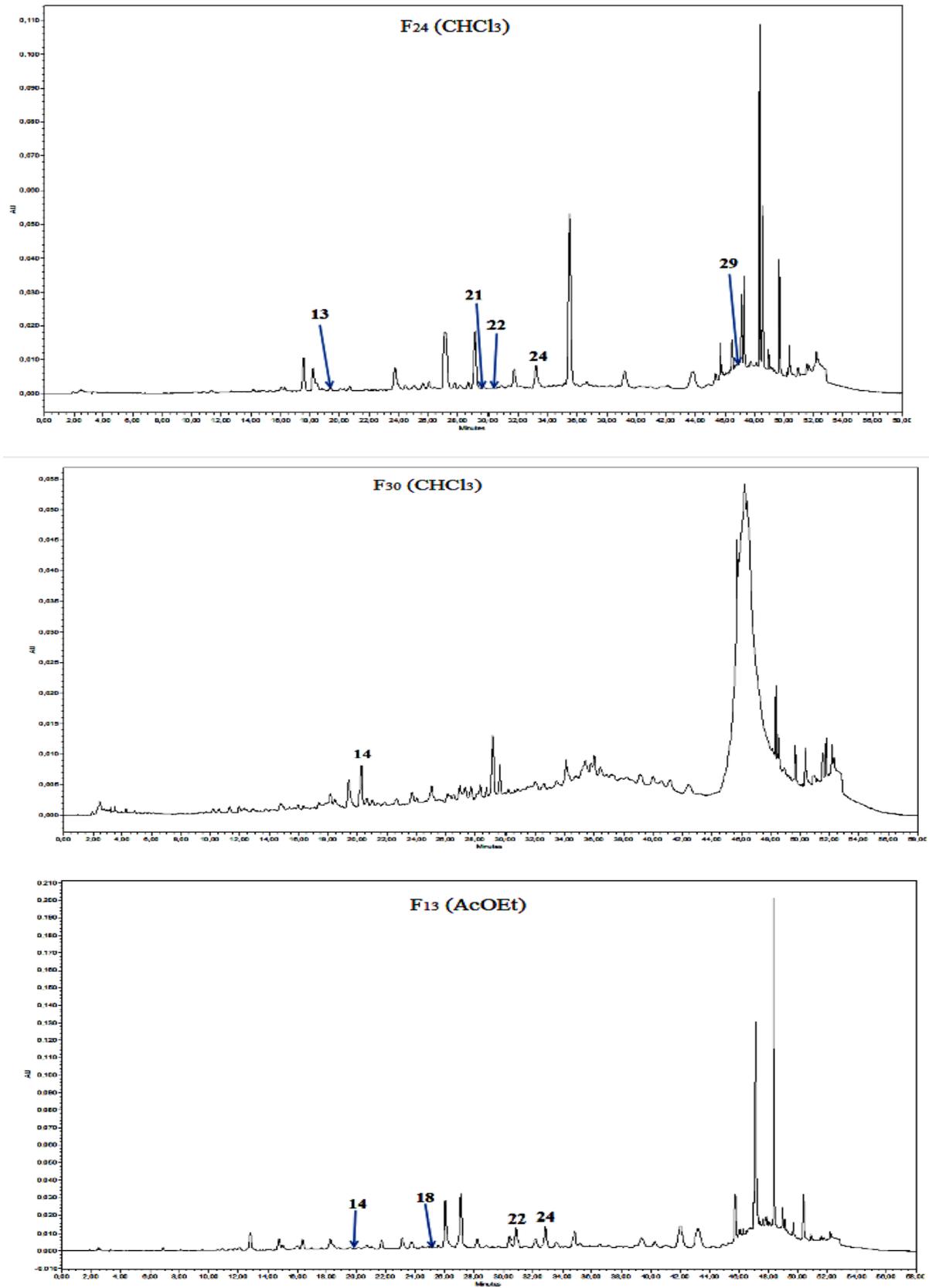


Figure III.5, la suite.

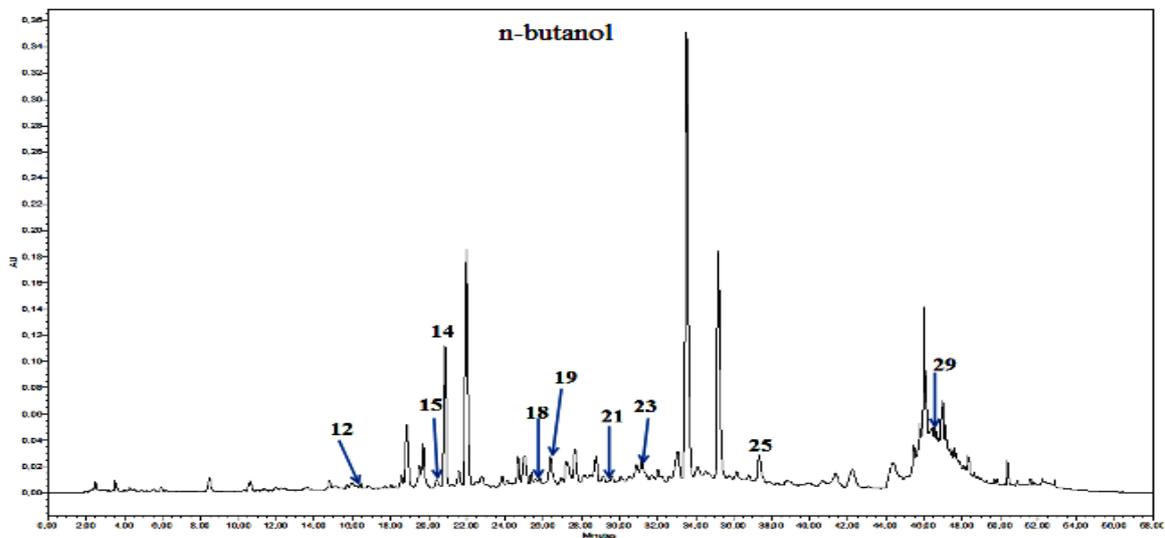
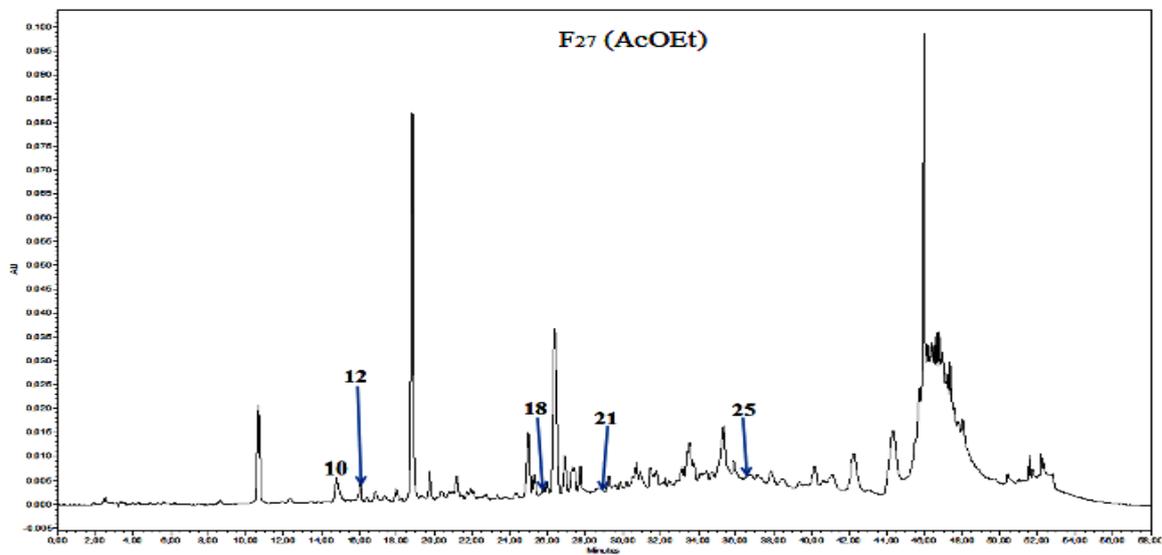
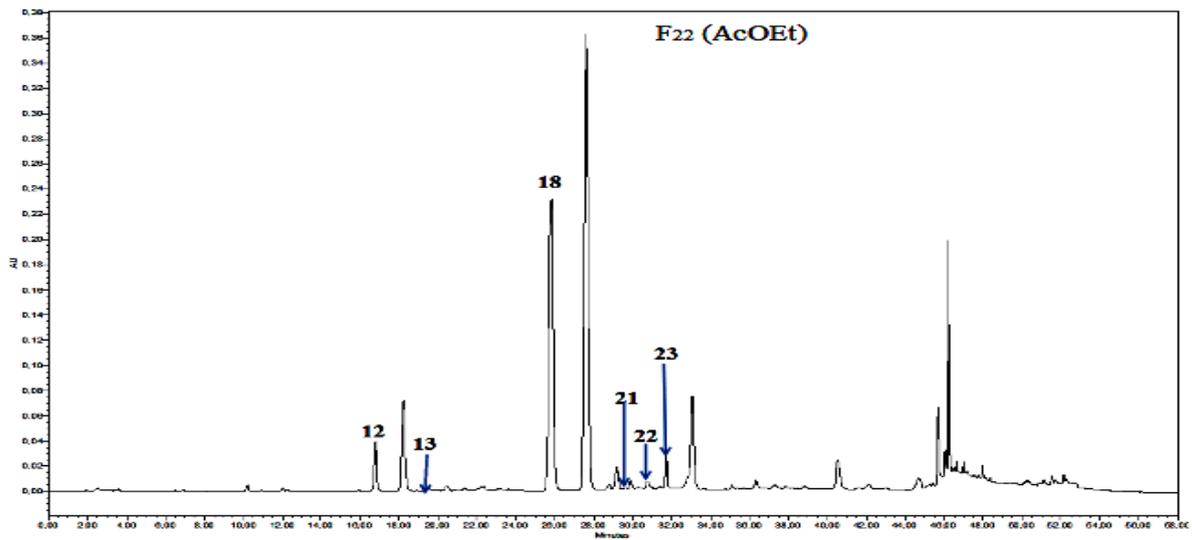


Figure III.5, la suite.

❖ Discussion :

Nous rappelons que les quantités des polyphénols ont été déterminées dans trois extraits obtenues à partir de l'extrait hydroéthanolique en utilisant trois solvants organiques à polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et le butanol.

Nous constatons que la quantité en phénols totaux est variable d'un système solvant à un autre et d'une fraction à une autre.

L'analyse HPLC-PDA des différents extraits obtenus par macération a montré que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en métabolites secondaires (parmi les standards utilisés) appartenant à la famille des polyphénols (Figure III.6).

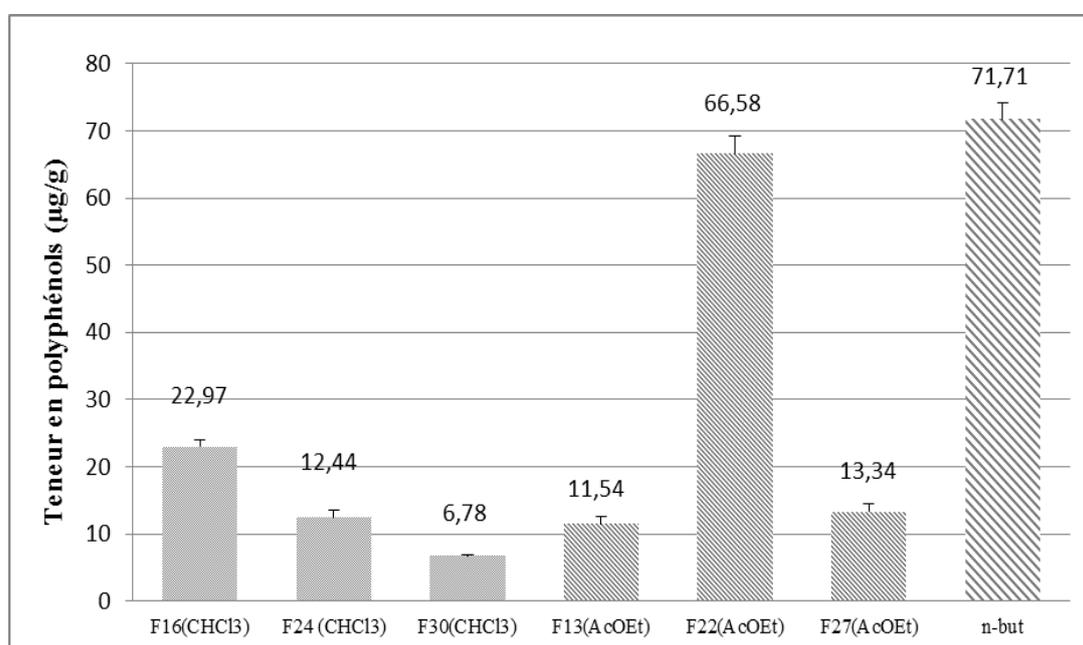


Figure III.6 : Effet de solvant sur la teneur des polyphénols.

Dix composés ont été détectés dans cet extrait parmi 23 standards utilisés, avec des teneurs plus faibles par rapport au poids sec.

L'effet du solvant sur le rendement d'extraction a été signalé dans de nombreuses études [22,23]

La polarité du solvant ainsi que la polarité des différents composés influent sur le rendement des polyphénols [24, 25].

Ces résultats nous mène à réaliser d'autre extraction afin d'améliorer le rendement d'extraction.

3.2.2. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction assistée par micro-ondes

Les résultats de la composition chimique des différents extraits obtenus lors d'une extraction assistée par micro-ondes des parties aériennes du *T.algeriensis* obtenus par HPLC-PDA sont présentés dans le tableau III.6 et les chromatogrammes HPLC-PDA des différents extraits sont montrés dans la figure III.7.

L'optimisation de l'extraction assistée par micro-ondes de *T.algeriensis* a été effectuée en tenant compte de l'impact de différents paramètres (température, durée et nature de solvant) sur le profil des principaux métabolites utilisés comme marqueur discriminant.

Le choix du solvant est l'une des plus importantes étapes pour le développement d'une méthode d'extraction d'une matrice. C'est pour cela, une extraction préliminaire assistée par micro-ondes à base d'eau en tant que solvant polaire, non toxique et non polluant (volume de solvant: 20 ml; matériel végétal: 1 g; temps d'extraction: 10 min), a été réalisée à des températures variant entre 40-120°C.

Le premier paramètre (la température) a été sélectionné au niveau des résultats fournis par l'analyse HPLC-PDA. Le meilleur rendement était obtenu à 100°C.

Pour améliorer le rendement des polyphénols à cette température, nous avons réalisé une autre extraction dans le même solvant en deux temps différents : 5 et 15min. le meilleur rendement en polyphénol était obtenu à 15 min dans la même température.

Enfin, nous avons appliqué ces conditions pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction.

L'effet des solvants sur le rendement d'extraction a été signalé dans de nombreuses études. Nous avons trouvé que l'extrait aqueux était plus riche en métabolites secondaires que l'extrait éthanolique EtOH/H₂O (70/30, v/v) obtenu dans les mêmes conditions (Tableau III.6).

Tableau III.6 : L'analyse HPLC-PDA des différents extraits du *T.algeriensis* obtenus par extraction assistée pas micro-ondes.

Composés identifiés	Teneur ($\mu\text{g/g PS} \pm \text{ET}$)							EtOH/H ₂ O 70:30 100 °C, 15 min
	H ₂ O							
	40 °C, 10 min	60 °C, 10 min	80 °C, 10 min	100 °C, 10 min	120 °C, 10 min	100 °C, 5 min	100 °C, 15 min	
Acide gallique	36.51 ± 0.23	72.84 \pm 0.36	24.57 ± 0.21	28.05 \pm 0.19	20.31 \pm 0.20	9.70 \pm 0.09	37.97 \pm 0.25	n.d
Catéchine	n.d	n.d	n.d	46.69 \pm 0.33	238.91 ± 1.66	45.23 \pm 0.18	359.80 ± 1.98	n.d
Acide chlorogénique	118.34 ± 1.01	1203.98 ± 5.29	1090.0 0 \pm 4.77	1766.64 ± 5.13	930.04 ± 3.99	1570.40 ± 4.33	1745.98 ± 5.65	n.d
Acide 4-hydroxy-benzoïque	n.d	n.d	18.38 ± 0.20	n.d	n.d	n.d	n.d	37.38 \pm 0.66
acide vanillique	n.d	37.56 \pm 0.71	50.17 ± 0.98	9.73 \pm 0.12	n.d	176.74 ± 1.02	23.92 \pm 0.66	n.d
Epicatéchine	n.d	n.d	813.21 ± 2.29	1675.51 ± 3.95	821.40 ± 3.02	200.62 ± 1.15	2462.75 ± 2.00	66.11 \pm 0.99
Acide syringique	n.d	17.86 \pm 0.99	52.22 ± 1.39	315.18 ± 3.00	n.d	747.63 ± 3.23	615.20 ± 4.03	n.d
Acide 3-hydroxy-benzoïque	n.d	243.31 ± 2.21	57.94 ± 0.98	212.38 ± 1.75	70.62 \pm 0.67	75.06 \pm 0.60	166.73 ± 1.02	19.82 \pm 0.51
Isovanilline	n.d	223.75 ± 1.97	248.12 ± 1.88	271.11 ± 2.04	59.05 \pm 0.77	68.21 \pm 0.67	40.42 \pm 0.78	200.37 \pm 1.09
Acide p-coumarique	15.78 ± 0.13	14.07 \pm 0.29	21.65 ± 0.28	40.00 \pm 0.32	23.05 \pm 0.27	18.82 \pm 0.23	106.99 ± 0.77	62.02 \pm 0.19
Rutine	39.70 ± 0.23	375.42 ± 1.01	37.63 ± 0.65	89.45 \pm 0.69	n.d	16.22 \pm 0.09	196.89 ± 1.00	55.32 \pm 0.55
Acide sinapinique	4.96 \pm 0.13	31.58 \pm 0.60	5.37 \pm 0.17	5.53 \pm 0.17	5.26 \pm 0.18	29.64 \pm 0.60	46.20 \pm 0.63	8.48 \pm 0.10
acide t-férulique	n.d	19.89 \pm 0.99	14.22 ± 0.50	27.56 \pm 0.52	21.72 \pm 0.54	1869.72 ± 2.01	140.64 ± 0.73	n.d
Naringine	89.63 ± 0.98	385.92 ± 2.12	179.46 ± 2.03	29.64 \pm 0.23	31.31 \pm 0.24	132.37 ± 1.00	376.60 ± 2.77	1611.91 \pm 2.49
Acide 2,3-dimethoxy-benzoïque	520.37 ± 2.02	1212.75 ± 5.84	222.84 ± 1.95	n.d	n.d	n.d	n.d	507.77 \pm 2.39
Acide benzoïque	1455.8 2 \pm 3.39	4896.51 ± 5.77	2425.6 6 \pm 4.23	2393.82 ± 4.78	2697.97 ± 5.00	3889.74 ± 4.77	4157.75 ± 4.67	n.d

Acide o-coumarique	227.74 ± 1.04	348.86 ± 2.20	37.66 ± 0.45	23.51 ± 0.29	30.27 ± 0.28	812.41 ± 2.00	341.55 ± 1.17	163.21 ± 0.99
Quercetine	n.d	n.d	63.04 ± 0.20	74.71 ± 0.23	59.52 ± 0.20	68.60 ± 0.28	180.72 ± 0.77	n.d
Composés identifiés	9	14	17	16	13	16	16	10
Total	2508.8 5 ± 5.36	9084.30 ± 8.12	5362.1 3 ± 4.99	7009.51 ± 8.54	5009.41 ± 4.12	9731.14 ± 7.98	11000.1 2 ± 9.96	2732.38 ± 5.88

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. µg /g PS: poids sec.

L'extrait aqueux obtenu par extraction assistée par micro-ondes dans les conditions : T=100°C, t=15min est le plus riche en métabolites secondaires.

Seize composés ont été identifiés dans cet extrait, appartenant à deux grandes classes des métabolites secondaires : les flavonoïdes et les acides phénoliques qui ont connus par leurs activités pharmacologiques [26,27].

Onze acides phénoliques ont été identifiés dont l'acide benzoïque est le produit principale dans cet extrait avec une teneur de 4145,75 µg /g. D'autres composés abondants étaient l'épicatéchine (2462,75 µg / g), l'acide chlorogénique (1745,98 µg / g), l'acide syringique (615,20 µg / g), la naringine (376,60 µg / g), la catéchine (359,80 µg / g) et l'acide o-coumarique (341,55 µg / g).

La consommation des produits riches en catéchines, tels que le thé ou le cacao pour prévenir ou améliorer le stress oxydatif et réduire le risque de maladies associées, a fait l'objet d'un nombre impressionnant d'études scientifiques. Bien que de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets bénéfiques des catéchines, les propriétés antioxydantes de ces polyphénols sont fréquemment citées comme le facteur le plus important [28].

L'acides chlorogénique était un additif alimentaire potentiel protégeant la crevette contre le stress oxydatif [29].

D'autre part, pour l'extrait éthanolique, le composé principal était la naringine avec une teneur de 1611,91 µg /g. l'acide 2,3-diméthoxy benzoïque et isovanilline ont été détectés dans cet extrait avec une teneur abondante : 507 µg /g, 200.37 µg /g respectivement.

L'extrait éthanolique obtenu par extraction assistée par micro-ondes était très riche par rapport au même extrait obtenu par extraction hydroalcoolique.

La naringine et acide 2,3-diméthoxy benzoïque ont été également détecté dans l'extrait éthanolique obtenu par l'extraction hydroalcoolique avec des teneurs moins importante.

Acide sinapinique, isovanilline et acide 3-hydroxybenzoïque n'ont pas été détectés dans l'extrait obtenu par macération.

Certain métabolites tel que : acide chlorogénique, acide t-férulique, quercétine, isovanilline, épicatechine, acide syringique, catéchine et acide p-coumarique ont été récupéré avec une teneur maximal à une température égale à 100°C, tandis que certains composés tel que : acide vanillique, acide gallique, acide sinapinique, naringine, acide 2,3-diméthoxybenzoïque et acide o-coumarique ont été détecté avec des teneurs maximale à des températures inférieur à 100°C.

L'acide para et ortho coumarique, l'acide sinapinique et naringine ont été détecté dans tous les extraits avec des teneurs considérables confirme la richesse de notre espèce en composés phénoliques.

Les chromatogrammes des différents extraits obtenus par l'extraction assistée par micro-onde sont regroupés dans la figure III.7.

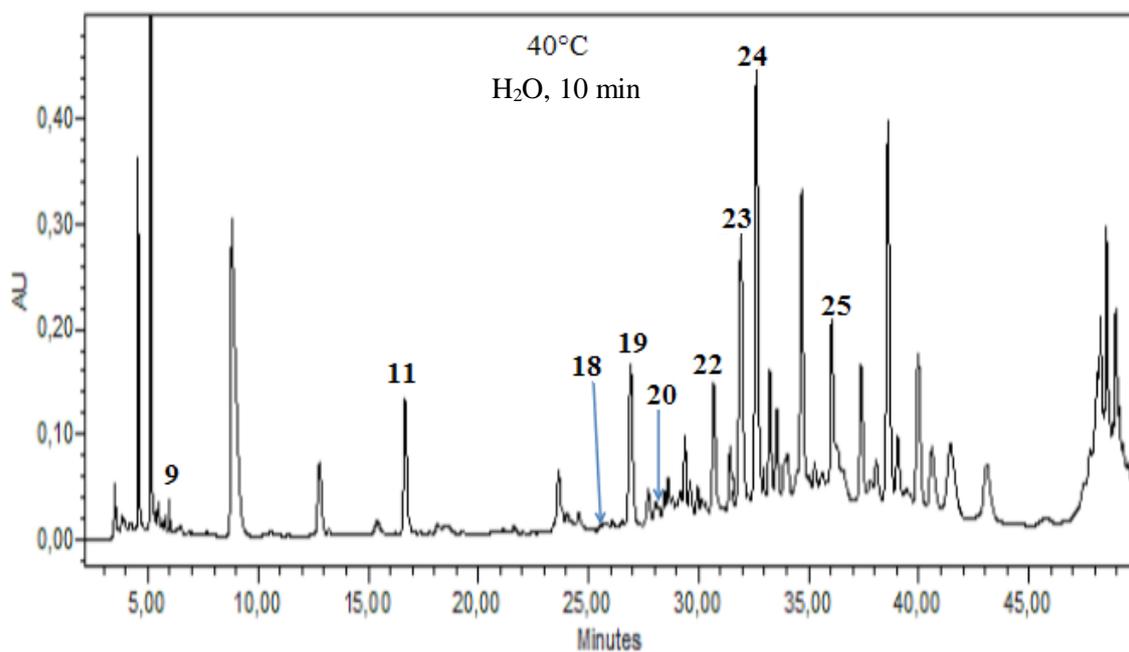


Figure III.7 : Chromatogrammes des extraits obtenus par MAE de l'espèce *Thymus algeriensis*.

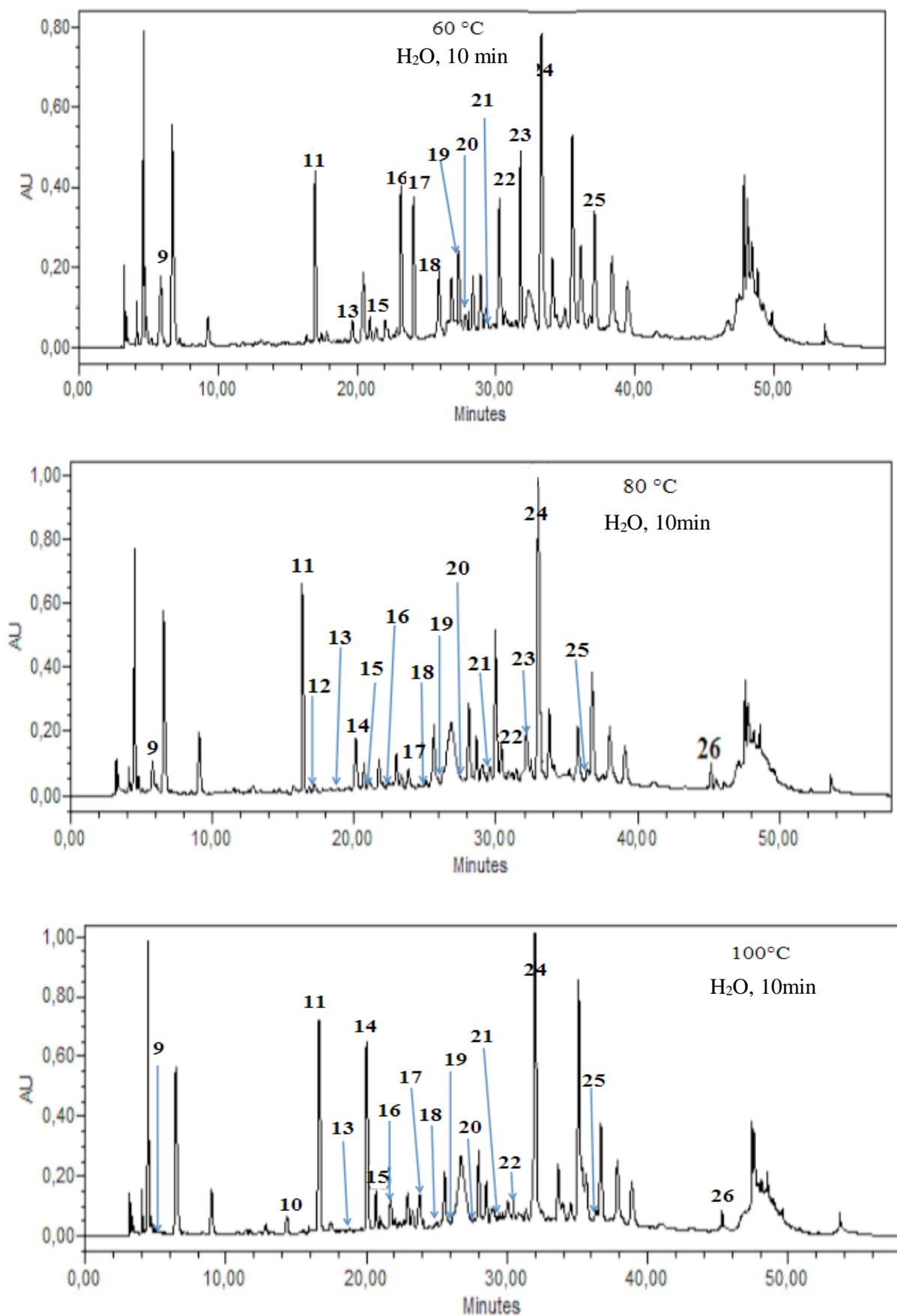


Figure III.7, la suite.

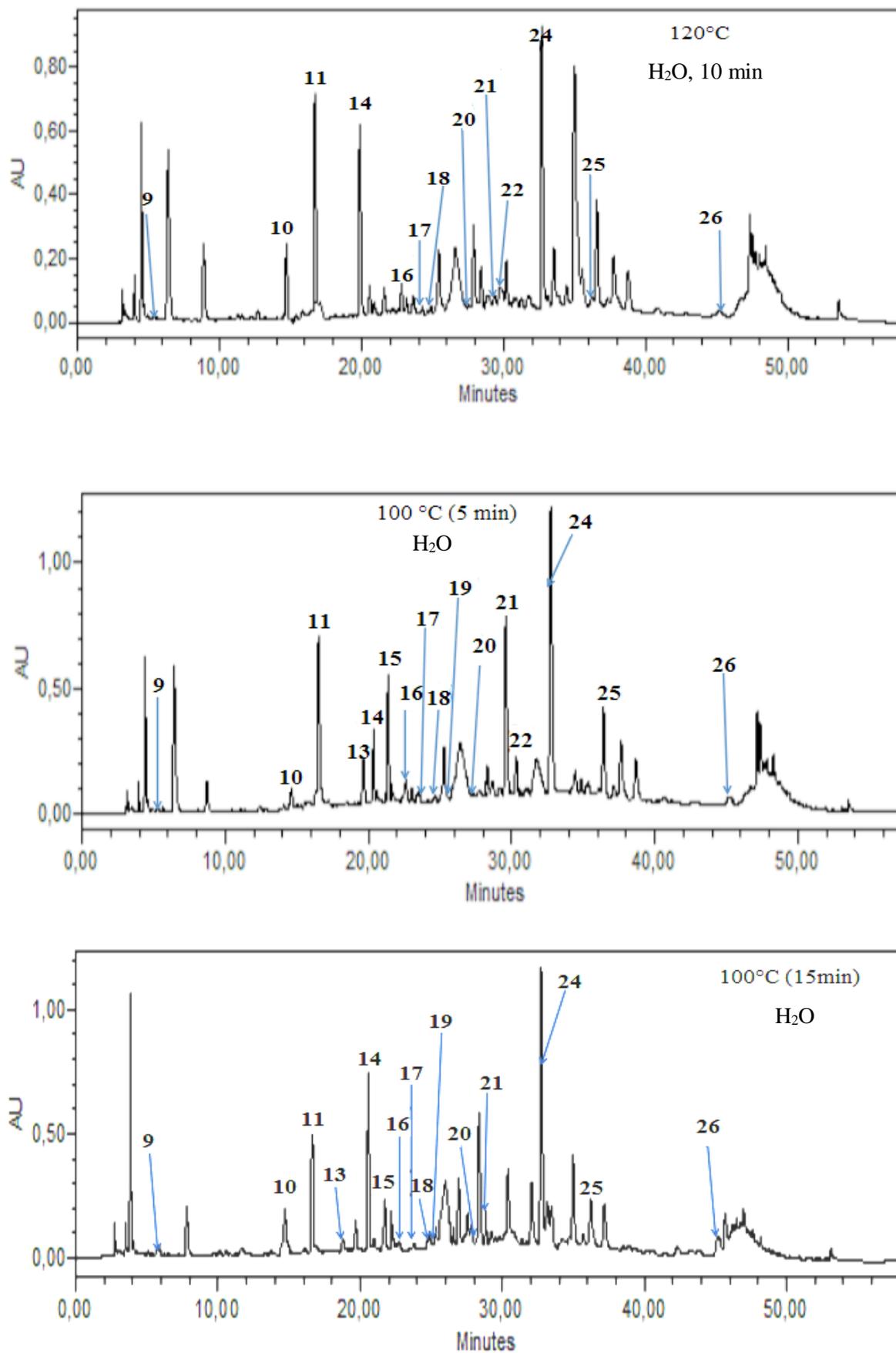


Figure III.7, la suite.

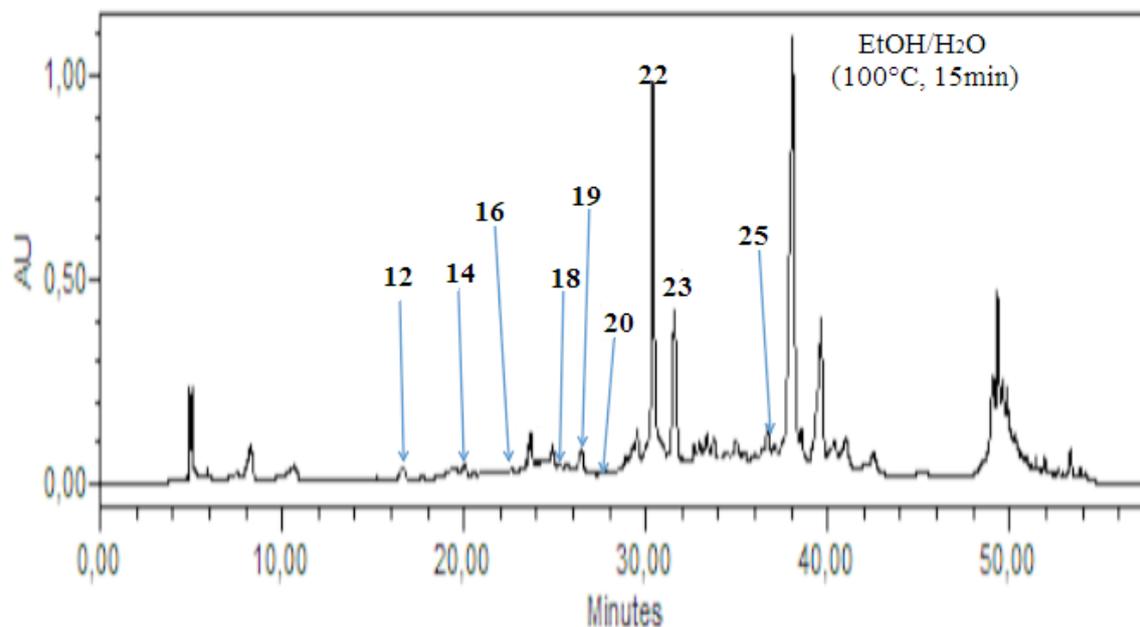


Figure III.7, la suite.

❖ Discussion

Les résultats expérimentaux montrent que l'extraction aqueuse, assistée par micro-ondes des parties aériennes de *Thymus algeriensis* à une température de 100 ° C et pendant 15 minutes est la plus riche en métabolites secondaires (parmi les standards utilisés) (Figure III.8).

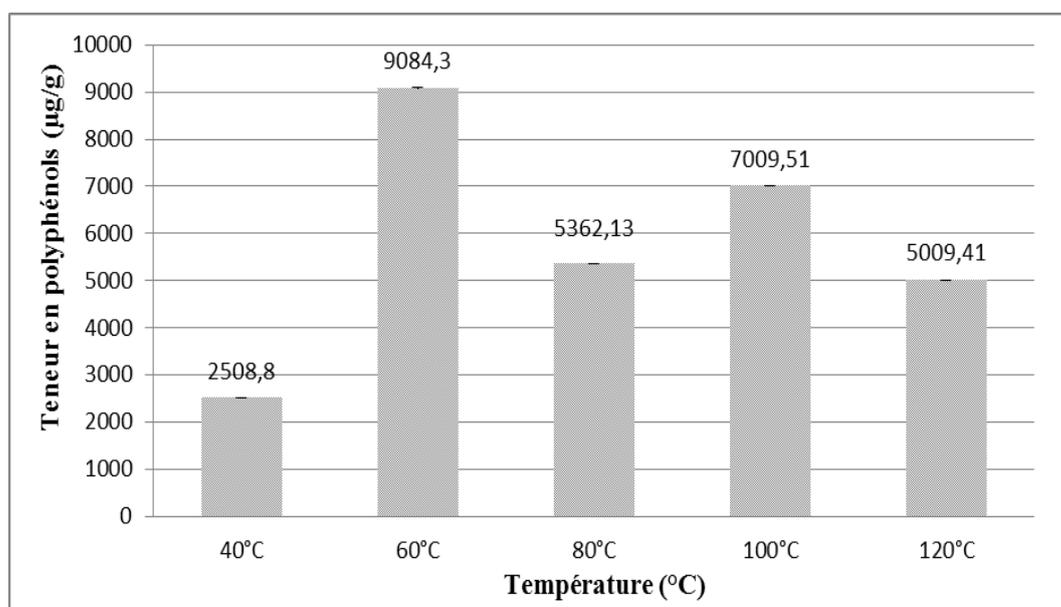


Figure III.8 : Effet de la température sur la teneur des polyphénols des extraits MAE.

L'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel l'énergie micro-onde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales [30,31].

16 polyphénols ont été détectés parmi 23 avec des teneurs plus importants, ce qui nous confirme la richesse de l'espèce étudié ainsi que l'efficacité de l'extraction dans les conditions utilisés.

Au cours du traitement par micro-ondes, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles par la rotation dipolaire des molécules.

Une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus et améliore la porosité de la matrice. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice [31, 32] et facilite l'extraction des composés entre autre les composés phénoliques [33]. Les principaux paramètres de l'extraction assistée par micro-ondes sont : la température, le temps d'extraction et le type de solvant.

Malgré le risque de la dégradation et l'oxydation des molécules par la température élevée mais elle est nécessaire pour augmenter la solubilité et le taux de transfert de masse [34], ce qui confirme la teneur maximale obtenus à 100°C des parties aériennes du *T.algeriensis*.

Le temps d'extraction a une influence positive sur le rendement d'extraction [35]. Toutefois, une exposition prolongée peut conduire à une dégradation des composés phénoliques avec une surchauffe du système solvant/soluté.

D'après les résultats obtenus, 15 min est la durée optimale pour une teneur maximale en polyphénols (Figure III.9).

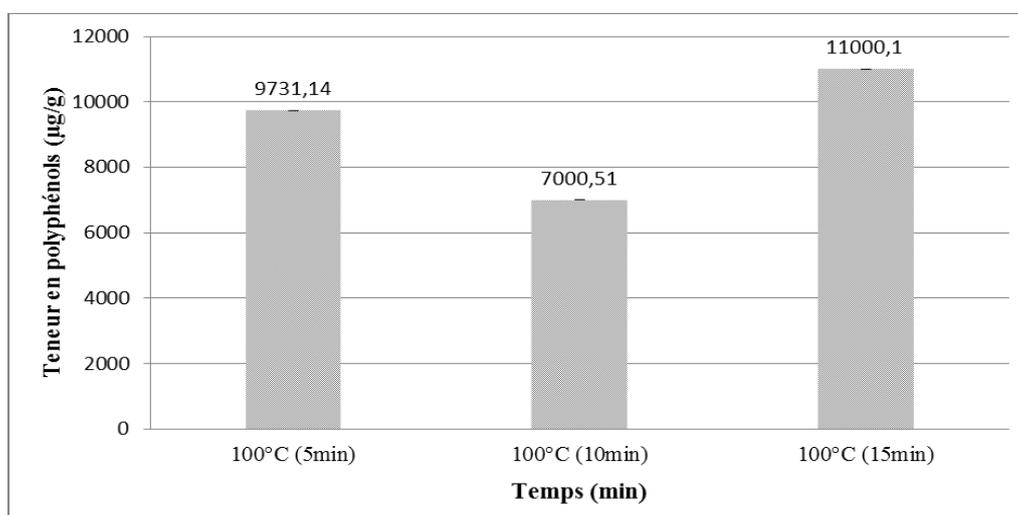


Figure III.9: Influence du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols.

Pour l'extraction assistée par micro-ondes des polyphénols, des solutions aqueuses de méthanol ou d'éthanol ont été fréquemment utilisées [36, 37].

La teneur en polyphénols de l'extrait éthanoïque est faible comparée à celle obtenu par l'extrait aqueux (Figure III.10).

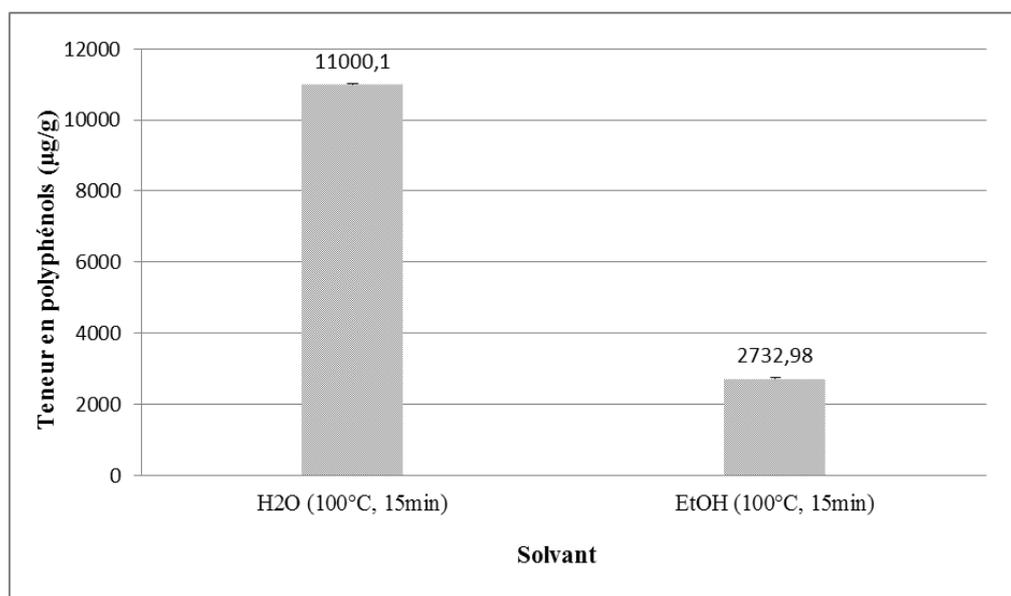


Figure III.10: Influence du solvant sur la teneur en polyphénols.

La polarité du solvant semble aussi influencer le rendement d'extraction. Les rendements les plus élevés sont obtenus avec les solvants polaires tels que : eau, MeOH et EtOH [38,39].

Gião et al (2007) ont montré que l'eau chaude permet avoir une teneur plus élevée en polyphénols, ce qui peut être expliqué par la destruction des cellules dans l'eau et la libération d'un maximum des composés phénoliques.

Le volume de solvant doit être suffisant pour s'assurer que la matrice solide demeure entièrement immergée dans le solvant. Toutefois, dans le MAE, un ratio plus élevé peut entraîner la baisse du rendement. Ceci est probablement dû à une agitation insuffisante du solvant [40].

3.2.3. Profils des polyphénols obtenus par extraction par fluide supercritique

Le but de cette expérience était d'étudier l'influence du paramètre de pression sur la cinétique du processus d'extraction à fluide supercritique, afin d'optimiser les conditions opératoires et de comparer les performances avec les autres méthodes d'extraction, en utilisant le profil des métabolites secondaires comme marqueur discriminant.

Les résultats de la composition chimique des extraits obtenus par l'extraction par fluide supercritique des parties aériennes de l'espèce *T.algeriensis* sont présentés dans le tableau III.7

Tableau III.7 : La composition chimique des extraits obtenus par fluide supercritique.

Composés identifiés	Teneur ($\mu\text{g/g PS} \pm \text{ET}$)	
	40 °C, 10 MPa	40 °C, 30 MPa
Acide gallique	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
Catéchine	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Acide vanillique	n.d	0.18 \pm 0.02
Epicatéchine	0.15 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01
Isovanilline	1.49 \pm 0.09	1.48 \pm 0.06
Acide p-coumarique	0.17 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01
Naringine	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
Harpagoside	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
Composés identifiés	7	8
Totale	2.12 \pm 0.10	2.26 \pm 0.10

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.
 $\mu\text{g /g PS}$: poids sec.

Nous avons effectué deux extractions par fluide supercritique de l'espèce *T.algeriensis* à une température fixe (40°C) dans deux différentes valeurs de pression (10 MPa et 30 MPa) afin de trouver les meilleures coordonnées qui nous mènent vers le meilleur rendement d'extraction.

Nous avons constaté que l'augmentation de la pression n'améliorait ni la qualité ni la quantité en polyphénols, avec seulement une légère différence sur la quantité d'acide vanillique. Selon la qualité et la quantité de métabolites, les résultats les plus intéressants ont été obtenus dans les conditions opératoires suivantes: 40 ° C pour la température et 30 MPa pour la pression (tableau III.7).

Huit composés ont été détectés dont isovanilline est le produit principale avec une teneur 1,48 $\mu\text{g/g}$. L'isovanilline présente de bonnes propriétés optiques telles que la transmission optique, l'indice de réfraction, l'effet électro-optique [41].

Cette méthode a fourni de faibles quantités de composés phénoliques provenant des parties aériennes de *T. algeriensis* (Figure III.11).

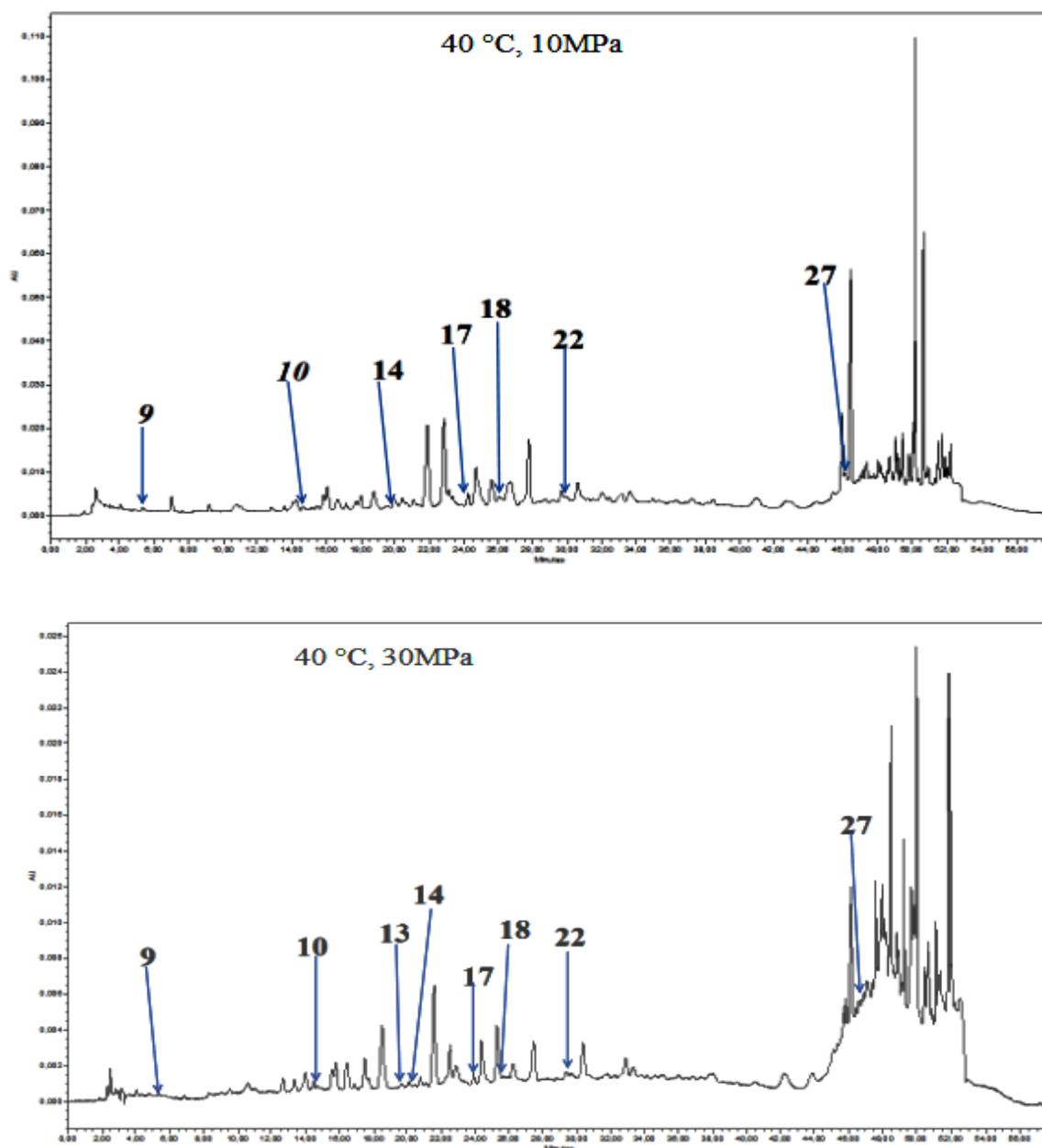


Figure III.11 : Chromatogrammes des extraits obtenus par SFE de l'espèce *Thymus algeriensis*.

❖ Discussion

Le rendement de l'extraction à fluide supercritique est très faible par rapports aux autres extractions. Huit composés seulement parmi 23 standards utilisés ont été identifiés avec des

teneurs très faibles dans deux différentes conditions de la pression (10MPa et 30MPa), Cela contraste avec la richesse de l'espèce étudiée (Figure III.12).

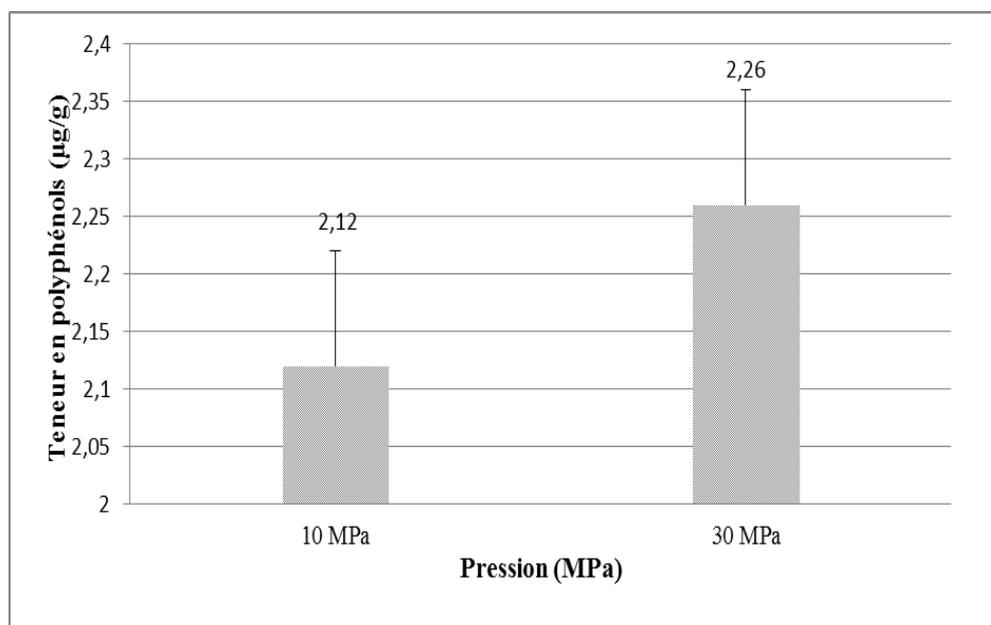


Figure III.12 : Influence de la pression sur la teneur en polyphénols

L'utilisation de l'extraction par CO₂ supercritique permet d'éviter la dégradation thermique et la décomposition des composés labiles du fait que l'opération est effectuée à une basse température (40°C), tandis que l'absence de la lumière et de l'oxygène empêche les réactions d'oxydation [42].

L'efficacité de la technique d'extraction SC-CO₂ est associée à plusieurs paramètres, notamment la température, la pression [42].

L'avantage de cette extraction est l'élimination de l'utilisation de solvants organiques tout en diminuant la durée d'extraction et la consommation d'énergie.

Il a été rapporté que l'augmentation de la pression induit l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques polaires, de poids moléculaire élevé, alors qu'en absence de ces composés, une augmentation de la pression ne renforce pas le rendement d'extraction. Pour notre étude, le pilote utilisé ne permet pas d'appliquer une pression de 22 MPa à 80°C [42].

La variation de la température ou de la pression induit un changement de la densité du fluide, ce qui affecte l'extraction par solvant supercritique. En général, la température élevée réduit la densité du solvant et diminue le taux d'extraction et améliore la solubilisation. Une augmentation de pression peut se traduire par une augmentation de la densité du fluide, ce qui

modifie la solubilité du soluté. La composition de l'extrait peut donc être contrôlée à l'aide de paramètres de pression et de température [43].

En conclusion, une augmentation de la pression du fluide supercritique entraîne l'augmentation des phénols totaux mais on ne peut pas proposer un couple optimal vu qu'une plus large gamme de pression devrait être exploitée.

3.3. Détermination des pigments foliaires (chl a, chl b et caroténoïdes)

Les résultats des concentrations des pigments de l'espèce *T.algeriensis* sont présentés dans le tableau III.8

Les données sont rapportées en tant que moyennes de trois répétitions et exprimées en $\mu\text{g} / \text{mg PS}$ (poids sec) \pm ET (écart type).

Tableau III.8 : Concentration des pigments dans l'espèce *Thymus algeriensis*.

pigment	Concentration ($\mu\text{g} / \text{mg PS} \pm \text{ET}$)
Chlorophylle a	$0,0529 \pm 0,0072$
Chlorophylle b	$0,0452 \pm 0,0069$
Caroténoïdes	$0,0165 \pm 0,007$

Les parties aériennes de *T. algeriensis* présentait des différences significatives dans la concentration des pigments analysés. La teneur en chlorophylle **a** ($0,0529 \pm 0,0072 \mu\text{g} / \text{mg}$) est plus élevée que celle des autres pigments (chlorophylle **b** = $0,0452 \pm 0,0069 \mu\text{g} / \text{mg}$ et caroténoïdes $0,0165 \pm 0,007 \mu\text{g} / \text{mg}$) ($p < 0,002$).

La chlorophylle **b** était présente dans de bonnes proportions, comme prévu dans les plantes d'ombrage.

En général, la concentration de chlorophylle **a** est deux à trois fois supérieure à la concentration de chlorophylle **b** en raison de l'importance de la chlorophylle **a** comme pigment primaire dans la photosynthèse. Chez les plantes, seule la chlorophylle **a** est directement impliquée dans les réactions lumineuses, elle absorbe la lumière des régions bleu violet et rouge du spectre et apparaît vert foncé, car réfléchit principalement la lumière verte.

La chlorophylle **b** n'est pas directement impliquée dans les réactions lumineuses, mais transmet l'énergie absorbée à la chlorophylle **a** [44].

Dans cette plante, la valeur du rapport Chl **a** / **b** était de 1,17, indiquant une forte teneur en chlorophylle **a**. Le rapport Chl **a** / **b** peut être un indicateur utile du partage de l'azote dans une

feuille et on prévoit que ce rapport répondra à la disponibilité de la lumière et de l'azote. En particulier, le rapport Chl **a** / **b** devrait augmenter avec une irradiance croissante à une disponibilité d'azote donnée [45].

En ce qui concerne la concentration totale en caroténoïdes, nos résultats ont montré une quantité environ trois fois inférieure à celle de la chlorophylle **a** ($0,0165 \pm 0,007 \mu\text{g} / \text{mg}$ et $0,0529 \pm 0,0072 \mu\text{g} / \text{mg}$, respectivement) (Figure III.13).

Des teneurs élevées en caroténoïdes sont révélées à un niveau d'insolation élevé, car dans ce cas elles agissent comme des protecteurs contre la photo-inhibition [45].

L'évaluation qualitative et quantitative de ces substances présente un intérêt crucial, non seulement en raison de leur rôle dans la protection contre le stress oxydatif [46], mais aussi de leur interférence avec les essais biologiques générant des résultats faussement positif et négatif [47].

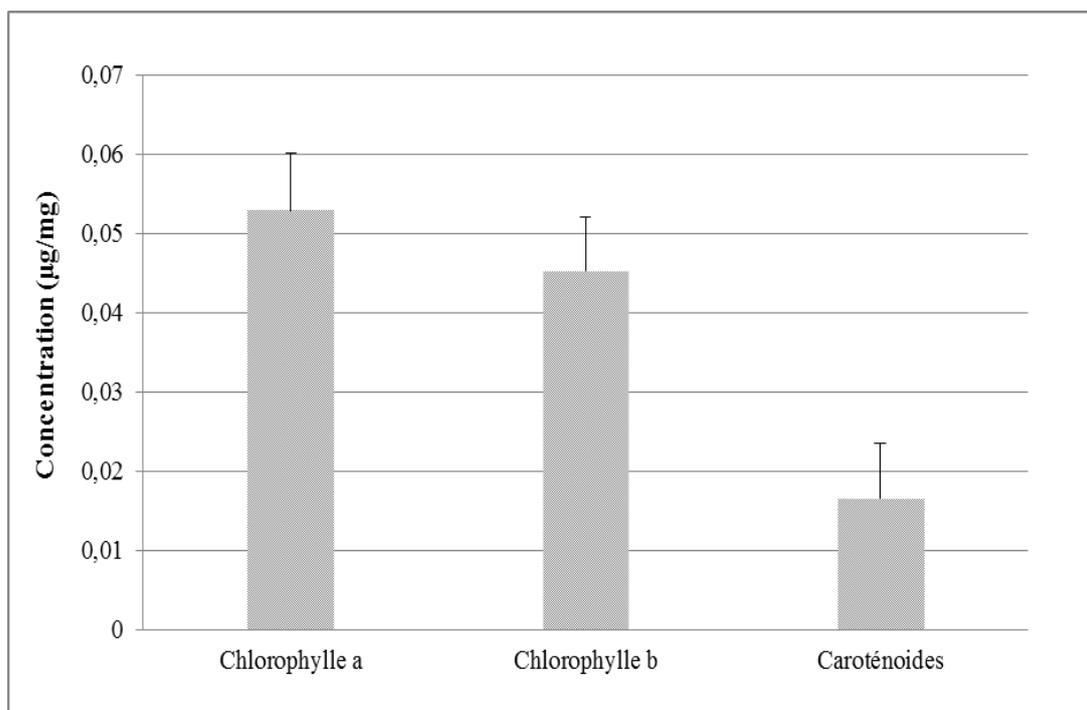


Figure III.13 : Concentrations des pigments détectés dans *T.algeriensis*.

Conclusion

L'étude des plantes endémiques pourrait favoriser leur utilisation ethnobotanique grâce à une large compréhension du profil qualitatif et quantitatif.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse des huiles et des extraits de *T.algeriensis*, ainsi la teneur en pigments (Chl **a**, Chl **b** et caroténoïdes).

Du point de vue phytochimique, l'analyse des huiles par GC-MS a montré que les parties aériennes de *T.algeriensis* est caractérisée par la présence des monoterpènes oxygénés comme des produits principaux tel que : le camphre, α -pinène, camphène et le 1,8-cinéole.

Nous avons développé une méthode HPLC couplée avec détecteur à photodiode pour l'estimation quantitative et qualitative des composés phénoliques obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Trois méthodes d'extraction ont été réalisées dans ce travail, afin de développer et d'améliorer les paramètres d'extractions pour obtenir des meilleurs rendements.

Une forte teneur en polyphénols a été détectée au niveau des extraits aqueux obtenu par l'extraction assistée par micro-onde et cela la rend la procédure la plus performante.

Une faible teneur pour les extraits éthanoliques a été observé, Le principal composé était l'isovanilline et l'épicatéchine, pour les extraits obtenus par MAE tandis que l'épicatéchine et l'acide p-coumarique étaient les composés principaux dans l'extrait obtenu par macération.

Plusieurs composés phénoliques connus pour leurs propriétés pharmacologiques ont été identifiés et quantifiés dans différents extraits de cette plante, qui sont des composés dotés d'importantes activités biologiques

La présence d'une quantité significative de composants bioactifs respectifs dans cette plante et après l'évaluation des paramètres de couleur et de la teneur en pigments des parties aériennes de *T. algeriensis*, ont assuré sa recommandation sans équivoque pour une utilisation dans le secteur pharmaceutique et nutraceutique.

Les résultats de la présente étude ont révélé d'importantes données concernant la composition phénolique des parties aériennes de *Thymus algeriensis* jusqu'à présent,

En raison de la richesse de la plante étudiée avec les polyphénols et les flavonoïdes connus leur multiples propriétés pharmacologique, en particulier propriétés antioxydants, anti-inflammatoire, antibactérienne.....etc

Nous avons décidé de compléter cette étude en évaluant et en réalisant des activités biologiques pour confirmer l'importance du profil phénolique des parties aériennes de *Thymus algeriensis*.

B- Evaluation de l'activité biologique

1. Etude pharmacologique *in vitro*

1.1 Activité antioxydante

1.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux de l' extrait n-BuOH (BETA) exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de rutine par g d'extrait (mg ER/g d'extrait) pour les flavonoïdes sont reportés dans la figure III.14.

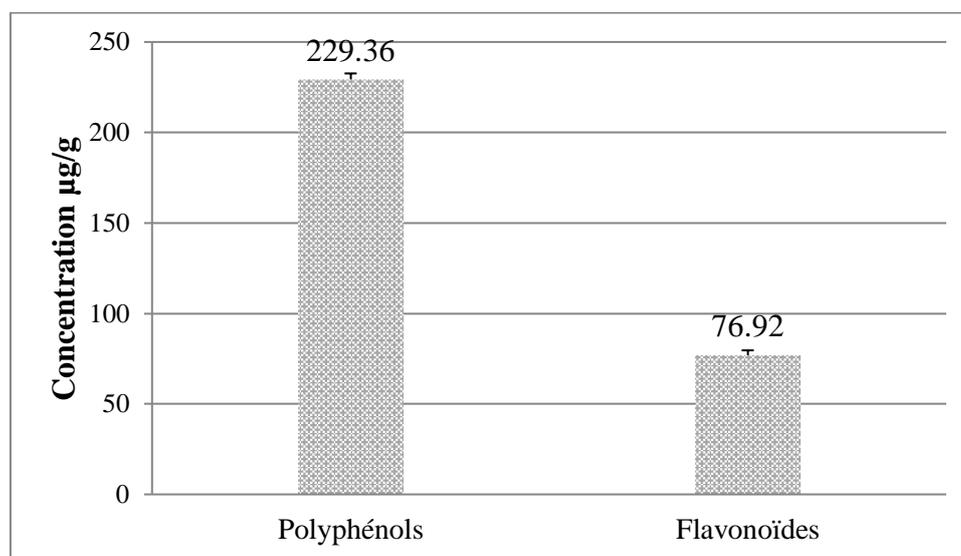


Figure III.14 : Teneur de l'extrait n-BuOH (BETA) en polyphénols et flavonoïdes totaux.

D'après les résultats, on peut constater que n-BuOH de la plante étudiée, est riche en polyphénols par rapport aux flavonoïdes.

Les teneurs des polyphénols ($365,45 \pm 0.057$) et flavonoïdes ($107,36 \pm 0.043$) totaux déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols et des flavonoïdes du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique et à la rutine.

Les conditions d'extraction et les solvants utilisés ont des effets sur le taux des composés phénoliques. En plus, la quantité des polyphénols dans les plantes dépend de nombreux facteurs :

- ✓ Facteurs génétiques
- ✓ Facteurs environnementaux
- ✓ Saisons de récolte

- ✓ Séchage et stockage [48].

Aussi la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également avec les acides aminés aromatiques des protéines, les glucides réducteurs et la vitamine C donnant un taux phénolique apparent élevé [49].

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante est liée à :

- ✓ La solubilité qui dépend à la polarité du solvant et aussi de la position des groupements hydroxyles libres.
- ✓ Poids moléculaire.
- ✓ Glycosilation [49].

1.1.2. Effet scavenger du radical DPPH

Les résultats obtenus par ce test permettent de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour l'extrait n-BuOH (BETA) de *T.algeriensis* (figure III.15).

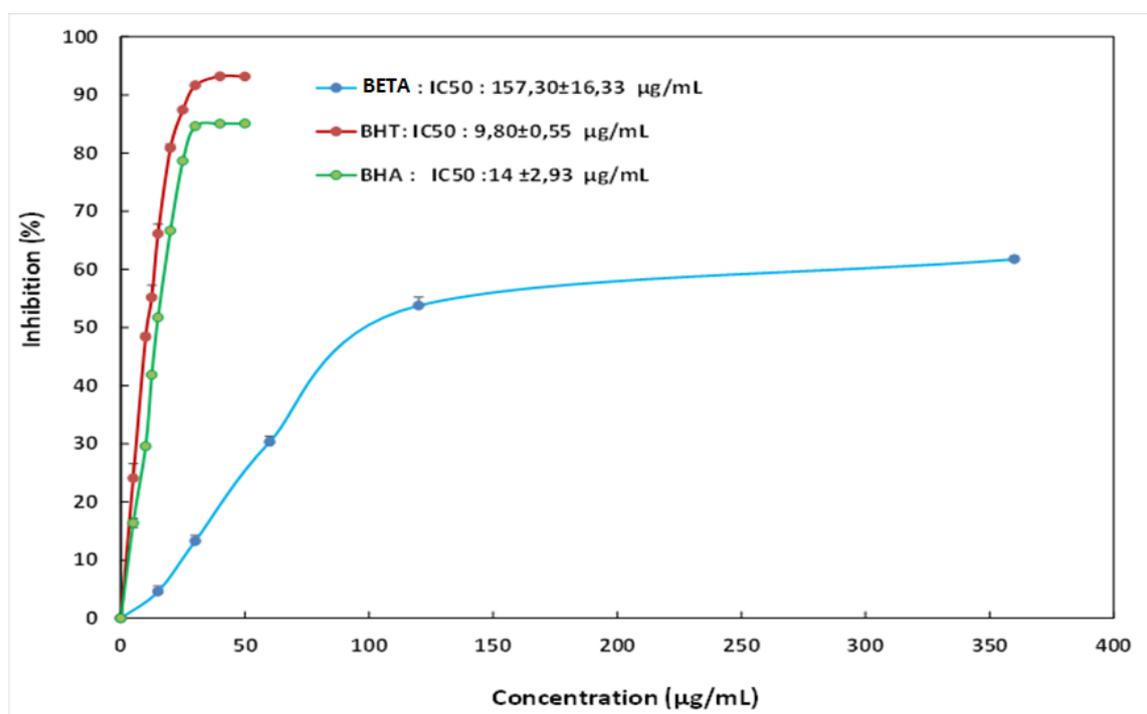


Figure III.15 : Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait BETA

Et les standards : BHT et BHA. Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart type (n=3).

En présence d'un produit naturel antioxydant, le DPPH, qui est un radical libre stable d'une couleur violette, prend un électron ou un hydrogène de l'antioxydant et se convertit en α -diphenyl- β -picryl hydrazine doté d'une couleur jaune [50].

D'après la figure, l'extrait n-BuOH de *Thymus algeriensis* inhibe la formation du DPPH d'une façon dépendante de la dose.

L'inhibition maximale du DPPH ($61,74 \pm 2,73$ %) a été observée à une concentration de 360 $\mu\text{g/ml}$ comparativement au standard BHA ($66,67 \pm 5,81$ %) qui n'a nécessité que 20 $\mu\text{g/ml}$ et au standard BHT ($66,14 \pm 0,57$) et qui n'a demandé que 15 $\mu\text{g/ml}$. Les valeurs IC_{50} de l'extrait n-BuOH, et les standards (BHA et BHT) prouvant un effet scavenger vis-à-vis le DPPH étaient présentés dans la figure suivante :

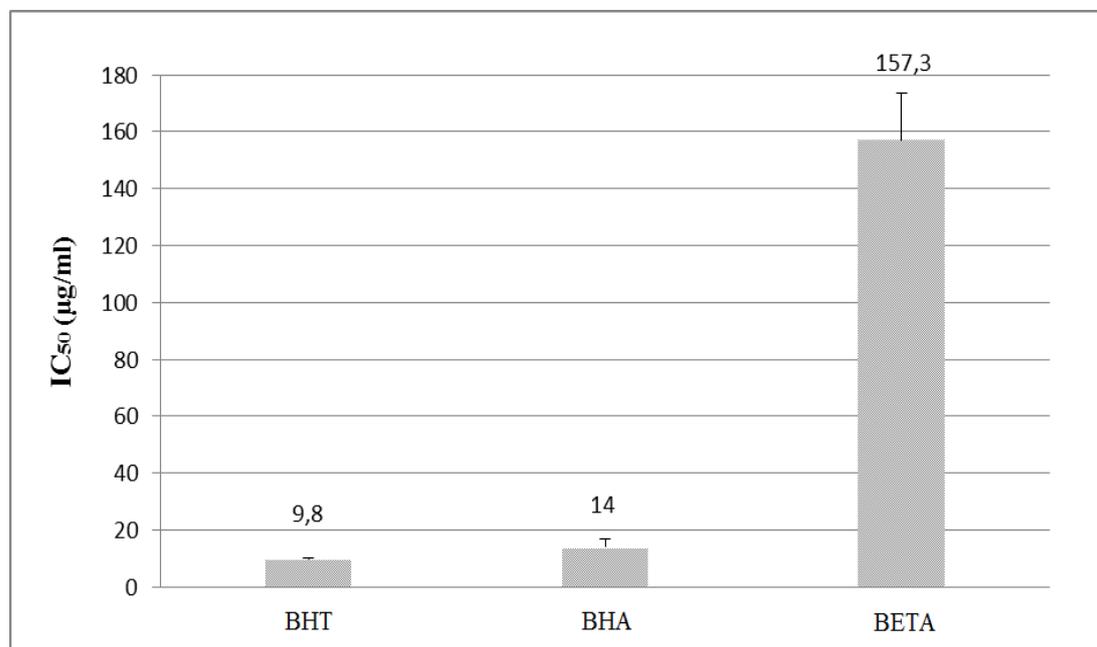


Figure III.16 : Valeurs de l' IC_{50} de l'extrait n-butanol (BETA) et des standards.

La capacité à éliminer les radicaux DPPH formés suggère que l'extrait n-BuOH de *Thymus* pourrait être un donneur d'électrons et réagir avec les ROS en les convertissant en produits plus stables [51].

1.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

L'oxydation d'acide linoléique produit des hydroperoxydes, qui sont des radicaux libres dérivés attaquant le chromophore de β -carotène et aboutissent au blanchissement de son émulsion réactionnelle [52].

Le suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps est réalisé et les résultats obtenus sont présentés dans la figure III.17.

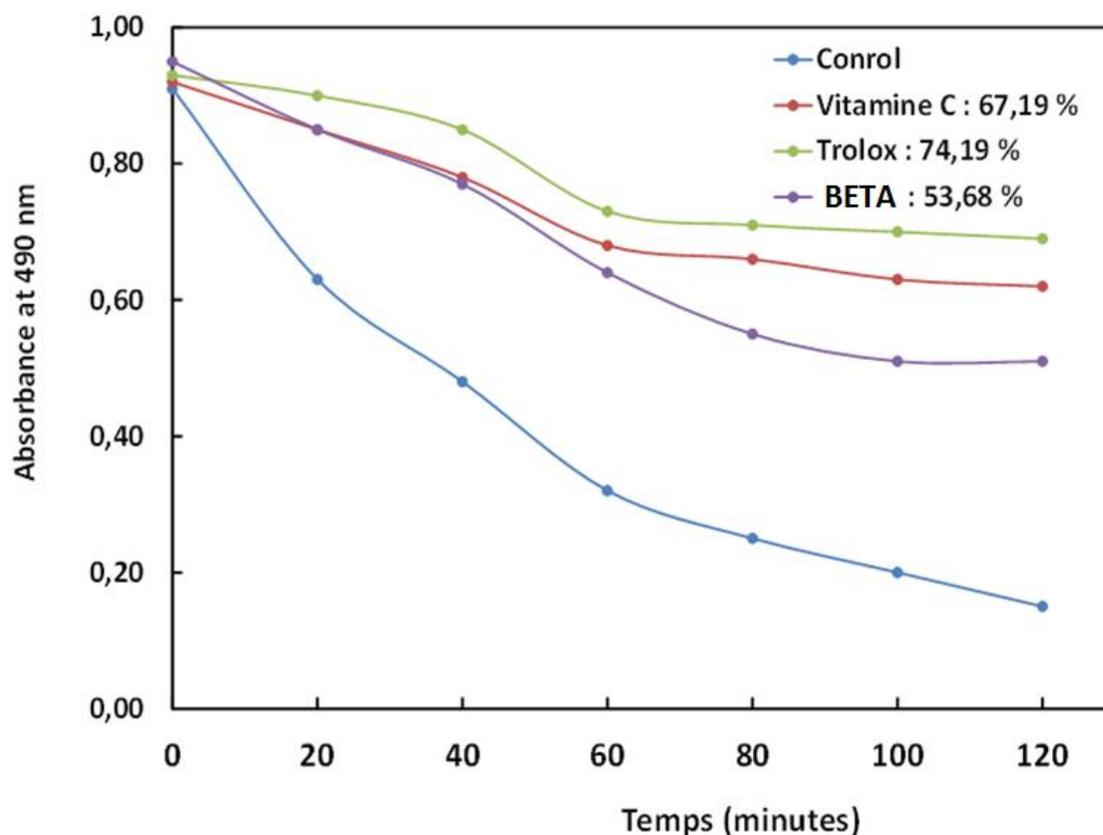


Figure III.17 : Test de blanchissement de β -carotène : variations de l'absorbance à 490 nm avec le temps dans les émulsions β -carotène/linoléique mélangé avec l'extrait n-BuOH (BETA) ou les standard. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

D'après ces résultats, il apparaît qu'il y a une diminution des absorbances au cours du temps, ce qui prouve l'oxydation continue du β -carotène par les radicaux résultant de l'oxydation de l'acide linoléique.

Cependant, la présence de l'extrait (BETA) ou des antioxydants standards (vitamine et Trolox) diminue différemment le degré de l'oxydation et par conséquent l'inhibition de la décoloration du β -carotène en comparaison avec le control négatif.

La figure III.17 montre que l'absorbance diminue rapidement dans le contrôle de $0,91 \pm 0,01$ à $0,15 \pm 0,01$. Par contre, dans le l'extrait BETA ($100 \mu\text{g/ml}$), la diminution de l'absorbance de $0,900$ jusqu'à $0,510 \pm 0$ était plus lente jusqu'à 120 minutes.

L'activité inhibitrice du blanchissement de cet extrait (BETA) est de l'ordre de à 53.68 %, celle du contrôle positif Trolox de 74.19 % et de la Vit C 67.19 % (Figure III.17).

Le test β -carotène mesure le potentiel d'inhibition la formation des hydroperoxydes diène conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique [51].

1.2. L'activité bactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol de *T.algeriensis* (BETA) sur différents germes (Gram (+) et (Gram (-)) par la méthode de diffusion sur solide donne des diamètres qui varient en fonction de la souche testée. Le tableau III.9 regroupe les résultats des diamètres d'inhibition vis-à-vis des souches testés.

Tableau III.9 : Zones d'inhibition en mm en présence de l'extrait n-butanol de *T.algeriensis*.

Souches bactériennes	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	7.5	8.5	9	9.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.5	8.5	10	11	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	7	7.25	7.5	9
<i>Escherichia coli</i>	9	9.5	10	11	11.5

Les résultats obtenus montrent une corrélation directe avec l'accroissement de la concentration de l'extrait n-butanol (BETA).

Nous constatons des valeurs importantes de diamètres d'inhibition qui expriment une action inhibitrice maximale sensiblement augmentée surtout pour : *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Gram (-)) avec une zone d'inhibition de 12 et 11.5mm respectivement à 10mg/ml, et les bacilles Gram (+) surtout : *Staphylococcus aureus*, avec une inhibition moyenne de 9.5mm à une concentration de 10mg/ml.

Pour le reste des souches testées, on constate une action inhibitrice très faible par rapport aux autres, ceci traduit probablement une sensibilité relativement différente des bactéries et/ou par la présence d'une activité antibactérienne éventuellement sélective de nos extraits. L'épicatéchine est le produit majoritaire détecté par la méthode HPLC/PDA. Plusieurs méthodes ont déjà étudiés l'effet antibactérien des flavonoïdes.

Certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2, 4,2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire [53].

2. Etude pharmacologique *in vivo*

2.1. L'activité anti-inflammatoire

L'injection de la carragénine dans la patte du rat provoque une douleur locale et une réaction inflammatoire, qui est une méthode appropriée pour évaluer les agents anti-inflammatoires [54].

Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation (développement de l'œdème dans l'heure qui suit l'injection, avec un effet maximal au bout de 5 heures) et également en raison de sa reproductibilité.

La figure III. 18 montre que l'injection de la carragénine provoque une augmentation progressive du volume de l'œdème chez les rats du lot témoin durant l'expérimentation.

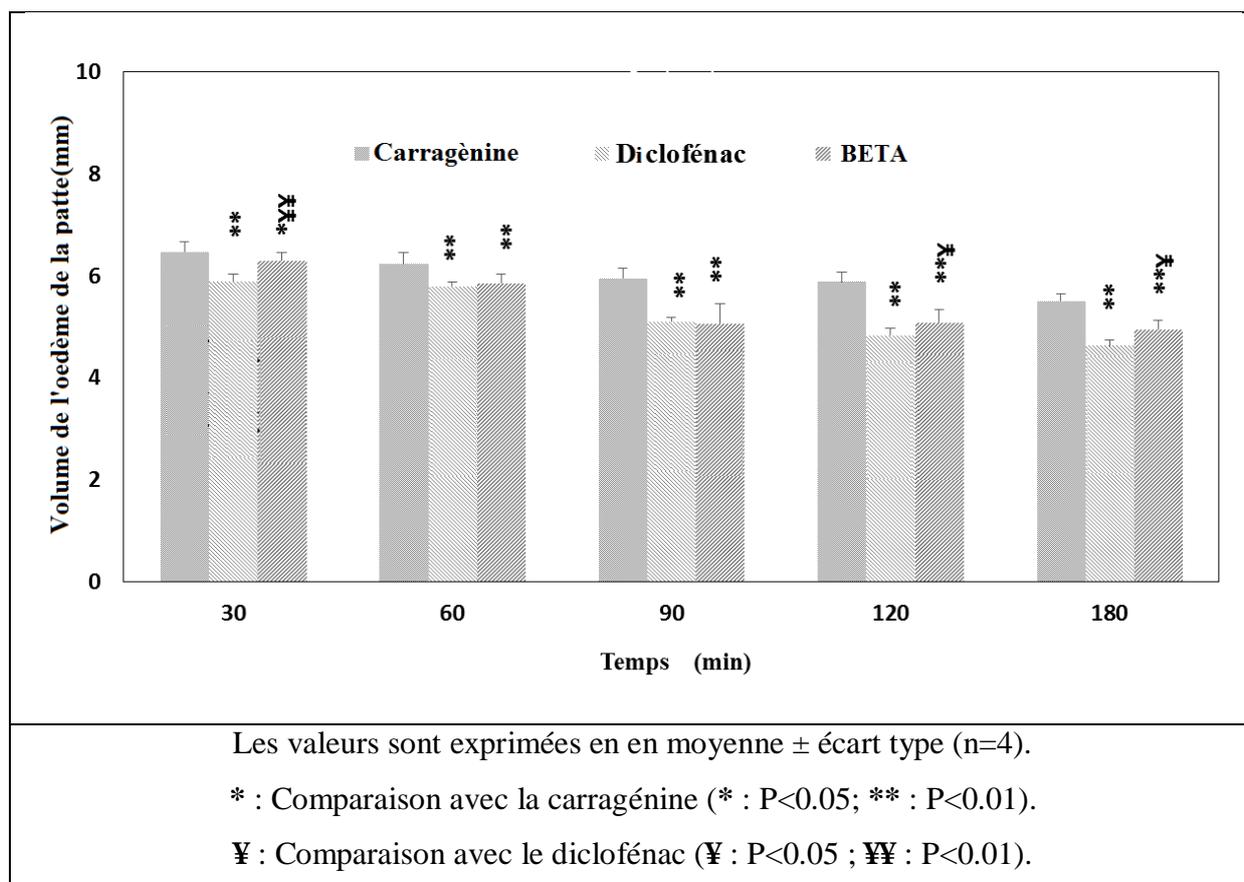


Figure III. 18 : Effets de l'extrait BETA sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez les rats.

L'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5–3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure [55]. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur [56].

L'extrait n-butanol ne provoque pas une diminution du volume des œdèmes des rats pendant les premiers 30 min. A partir de la 1^{ère} heure on remarque que cet extrait entraîne une diminution du volume de l'œdème de même pour le lot traité par le Diclofénac (Figure III. 19).

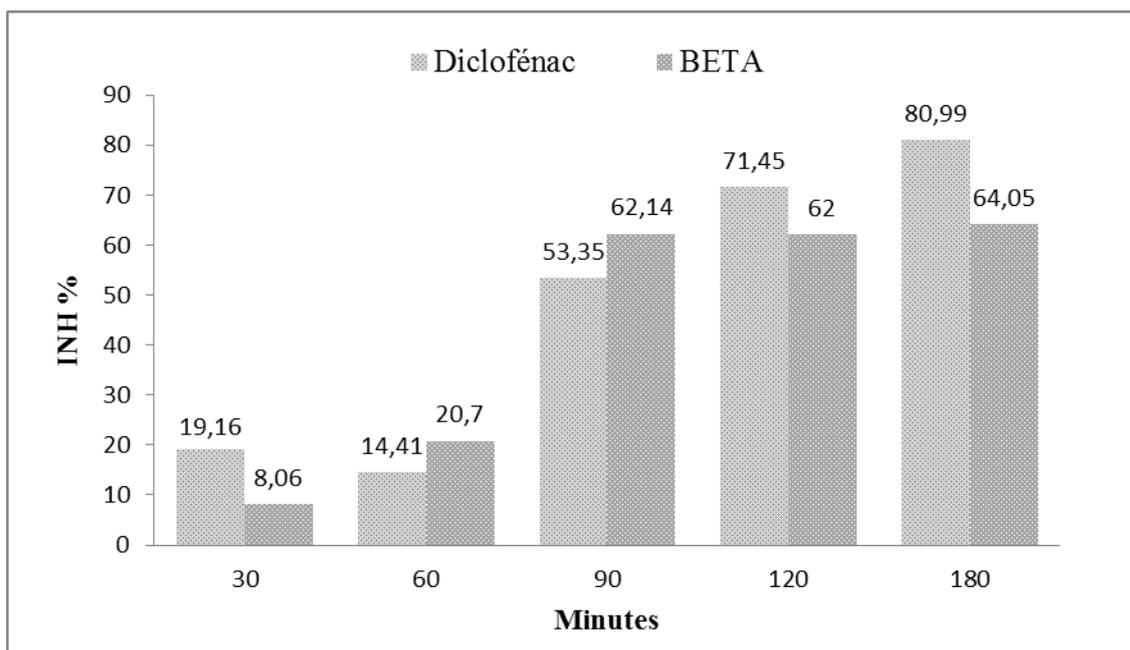


Figure III. 19 : Pourcentage d'inhibition de l'inflammation par l'extrait BETA et le Diclofénac. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=4).

Dans le cas où l'extrait n-butanol est utilisé à une dose 50mg/kg, on observe que l'épaisseur de l'œdème passe de 6.30 ± 0.15 mm à 5.85 ± 0.18 mm, une heure après l'injection de carragénine. Ces résultats montrent une diminution de l'œdème évaluée à 20.7% après une heure. Après 180 min, le lot de rats traités par l'extrait n-butanol présente une moyenne d'épaisseurs de 4.95 ± 0.17 mm correspondant à un pourcentage de diminution de 64.05%.

Si l'on considère le Diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé chez les rats injectés de carragénine, l'épaisseur de la patte passe de 5.90 ± 0.13 mm à 5.80 ± 0.09 mm après une heure avec un pourcentage d'inhibition de 14.41%. En outre ces valeurs évoluent après 180 min d'injection de carragénine pour atteindre 4.63 ± 0.12 mm avec un pourcentage d'inhibition de 80.99%.

Certaines études semblent indiquer que les flavonoïdes contenues dans les extraits de plantes, possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [57].

En définitive les résultats de notre expérimentation montrent que l'extrait n-butanol présente un effet anti-inflammatoire chez les rats injectés par la carragénine à 1% comparativement au lot n'ayant reçu aucun traitement. Aussi l'utilisation du Diclofénac montre un effet anti-inflammatoire plus prononcé que celui de l'extrait n-butanol.

2.2. L'effet diurétique

2.2.1. Variation de la diurèse en fonction du temps

La figure III.20 représente la variation de la diurèse en fonction du temps pour la dose 50ml/Kg.

On a comparé les résultats de nos extraits avec celles obtenus par le témoin 2 et l'hydrochlorothiazide (médicament de référence).

Le traitement par voie orale par l'hydrochlorothiazide à la dose de 50ml/kg implique une émission importante d'urine (25.23ml/kg)

L'administration de cette dose de l'extrait n-butanol (BETA) par voie orale à donner un effet important à la première heure avec un volume de 13.29 ml/kg dépassant ainsi l'hydrochlorothiazide (12.65 ml/kg). Cet extrait exerce son effet diurétique dès la première heure.

Le traitement par voie orale de cet extrait montre un maximum d'effet diurétique dans les deux premières heures avec une légère différence dans les trois dernières heures, cela montre que cet extrait est actif par cette voie d'administration.

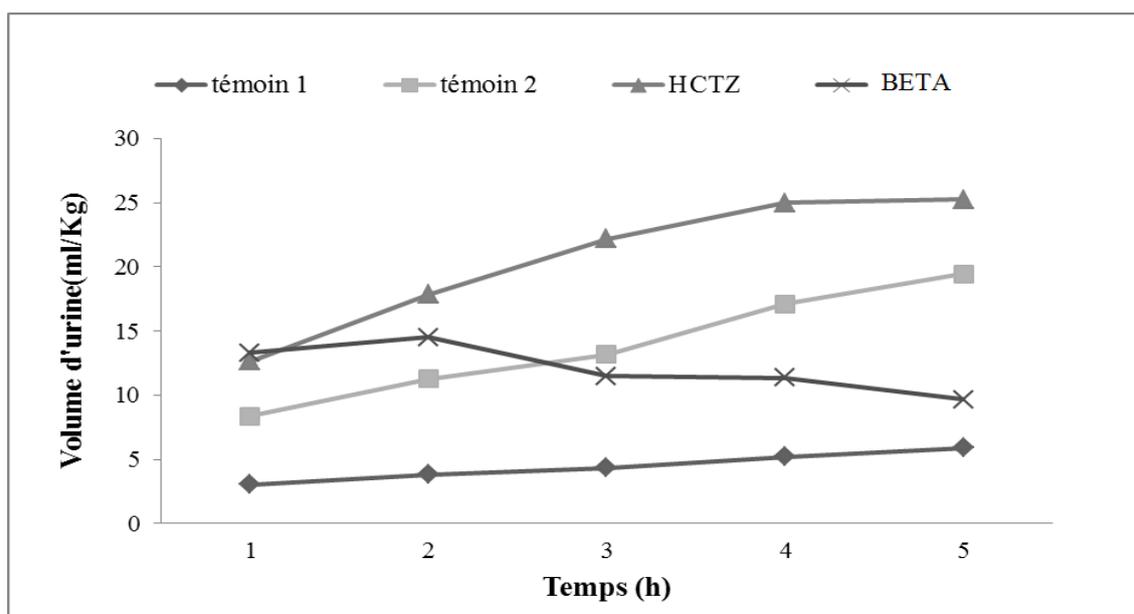


Figure III. 20 : Variation de la diurèse en fonction du temps après administration de l'extrait (BETA) par voie orale à la dose de 50ml/kg.

2.2.2. Valeurs du pH urinaire

Les valeurs du pH des urines collectées après 05 heures d'administration des différents produits par voie orale sont rapportées sur la figure III.21.

Le pH des urines est basique pour les témoins ainsi que pour les rats traités par les deux extraits.

Toutes les valeurs de pH enregistrés par l'administration per os de l'hydrochlorothiazide et nos extraits n'ont aucun changement sur le pH urinaire.

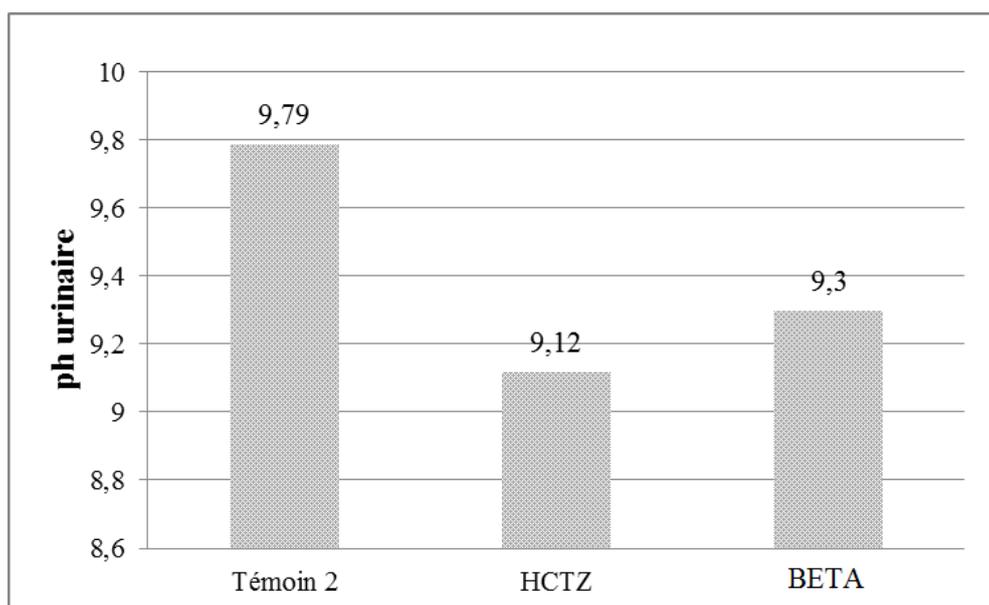


Figure III.21 : Variation du pH urinaire.

2.2.3. Variations de la concentration des ions Na^+ urinaires

Les urines des rats collectées après 05 heures de traitement par les différents produits par voie orale pour la dose de 50 mg/kg sont analysées pour déterminer la teneur en sodium éliminé en 05 heures, les résultats sont représentés sur la figure III.22.

Ces derniers montrent une concentration de sodium de 3,15 mmol/kg pendant 05 heures pour le témoin 02 qui reçoit 50 ml/kg de l'eau physiologique. L'hydrochlorothiazide à provoquer une élimination importante en sodium pour la dose de 50 mg/kg avec une concentration de 7,43 mmol/kg pendant 05 heures. La concentration du sodium résultant de l'administration de notre extrait montre que ces composés exercent une élimination importante en sodium 4,83 mmol/kg pendant 05 heures comparativement avec le témoin 02, mais cette concentration reste inférieure à celle provoquée par l'HCTZ.

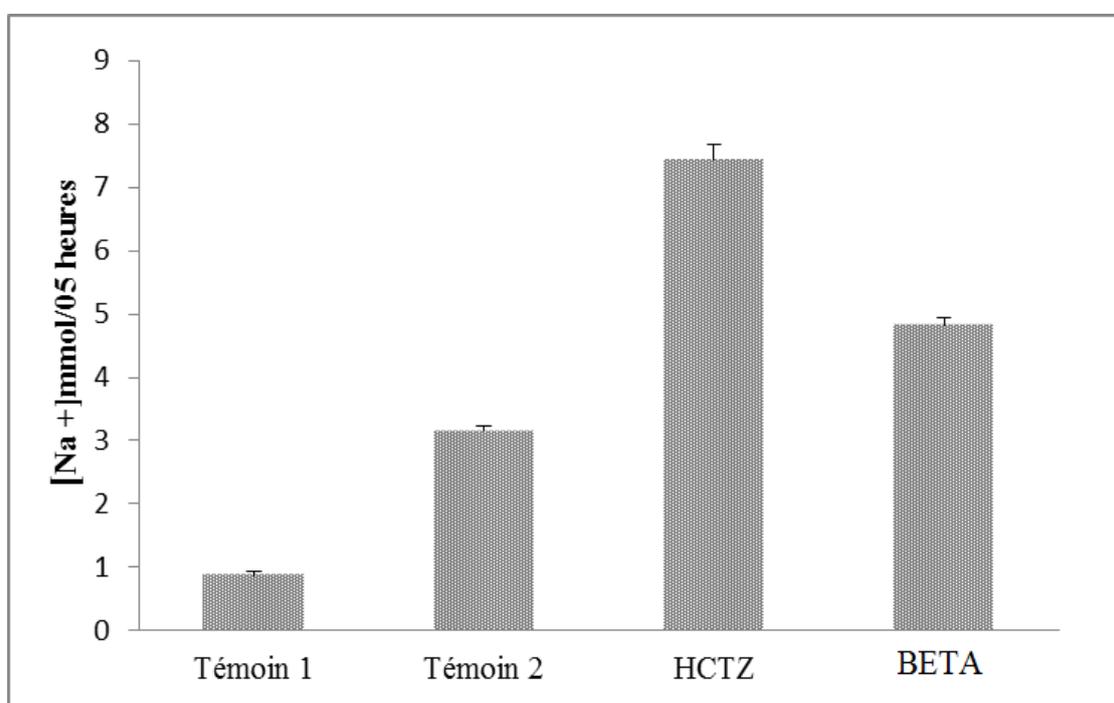


Figure III.22 : Variations de $[\text{Na}^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

2.2.4. Variations de la concentration des ions K^+ urinaires

Les résultats du taux de potassium des urines collectées après cinq heures lors de l'administration des différents composés par voie orale sont présentés sur la figure III. 23. Le témoin 02 a marqué un taux d'élimination de potassium de 2.09 mmol/kg pendant 05 heures.

La concentration de potassium urinaire pour les rats traités par l'hydrochlorothiazide est de 3.41 mmol/kg pendant 05 heures. Concernant notre extrait, l'élimination du potassium est supérieure à la concentration de témoin 2 et HCTZ, est de 7.29mmol/kg pendant 05 heures.

On voit clairement que notre extrait provoque une élimination accrue en K^+ par la voie orale, ce qui implique que l'hypokaliémie enregistrée lors du traitement par les diurétiques thiazidiques est plus important par l'administration de notre extrait.

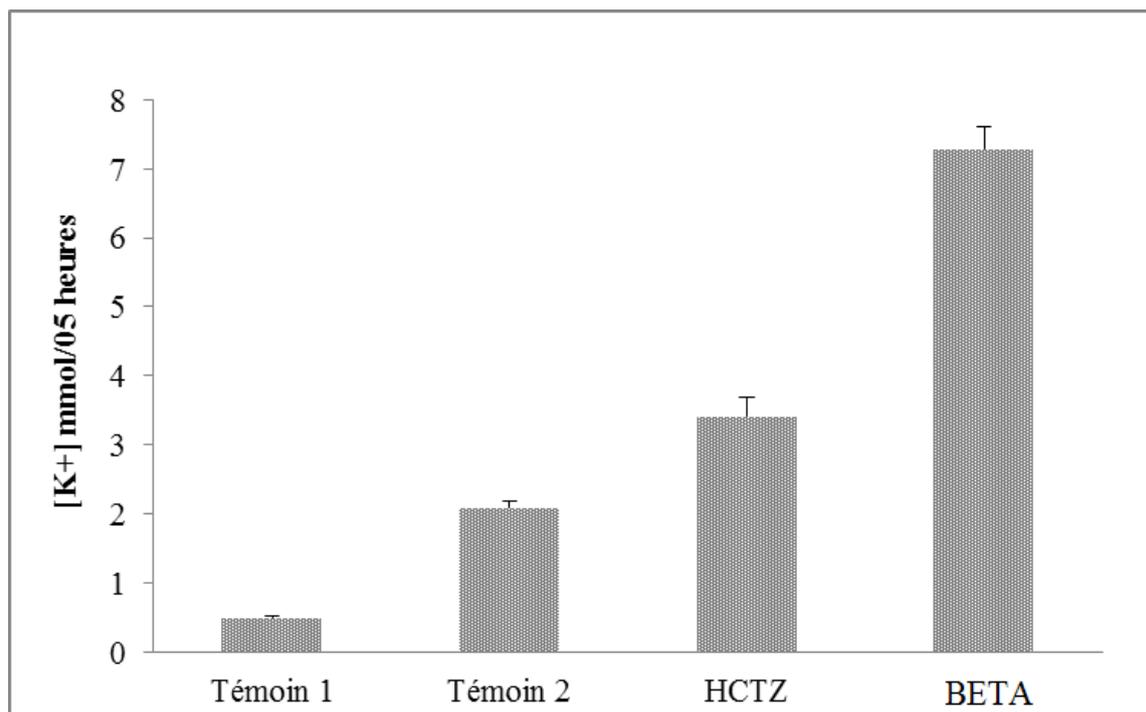


Figure III. 23 : Variations de $[K^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

2.2.5. Variations de la concentration des ions Ca^{2+} urinaires

La figure III. 24 représente les variations des concentrations du Ca^{2+} urinaire après traitement des animaux par les différents produits par la voie orale.

Les résultats montrent une variation de la concentration en Ca^{+2} pour le lot témoin 2 de 83.15 μ mol/kg pendant 05 heures environ. Les taux d'élimination de calcium des lots traités par l'HCTZ et notre composés sont comparables à ceux des lots témoins ou légèrement supérieurs : 97.2 et 84.03 μ mol/kg pendant 05 heures respectivement.

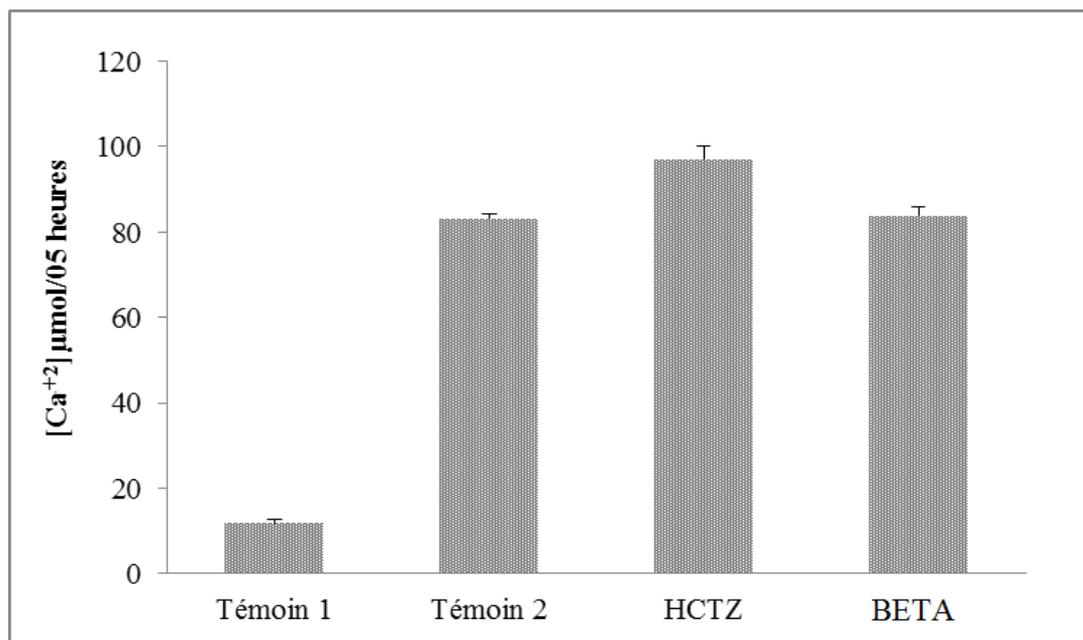


Figure III. 24 : Variations de [Ca²⁺] urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

Conclusion

Dans cette partie, différentes activités de l'extrait n-butanol de l'espèce *Thymus algeriensis* ont été étudiés.

L'activité antioxydante de cet extrait a été évaluée par deux méthodes à savoir: test Folin-Ciocalteu, DPPH et blanchissement du β -carotène.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur solide, les résultats indiquent que cet extrait possède une activité antibactérienne considérable sur les souches testées. On peut dire alors que cet extrait manifeste une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens.

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée en mesurant l'œdème induit par injection de la carragénine au niveau de la patte postérieure gauche des rats Wistar.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait n-butanol de *T.algeriensis* à 50 mg/kg, est capable de réduire significativement l'œdème de l'inflammation avec un pourcentage d'inhibition de 64.05%. L'effet de notre extrait est comparable à celui obtenu pour le lot de rats de référence traité avec le Diclofénac.

A la fin, l'étude de l'effet diurétique a été réalisée. Le traitement par voie orale de cet extrait montre un maximum d'effet diurétique dans les deux premières heures, il implique ainsi une l'hypokaliémie très importante que celle enregistrée par administration de HCTZ.

C- Activité anticorrosion

1. La perte de masse

Les résultats de la perte de masse de l'acier en milieu HCl 1M en absence et en présence de l'inhibiteur BETA (extrait n-butanol de l'espèce *T.algeriensis*) dans différentes concentrations sont regroupés dans le tableau III.10.

Tableau III.10 : L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

Concentration de l'inhibiteur en ppm	La perte de la masse (cm ²)	EI (%)
0	0.0114
100	0.0088	22.80
200	0.0082	28.07
300	0.0094	17.54

D'après les résultats de cette méthode on peut constater que la concentration de l'inhibiteur joue un rôle primordial pour l'évolution de l'efficacité inhibitrice (Figure III.25).

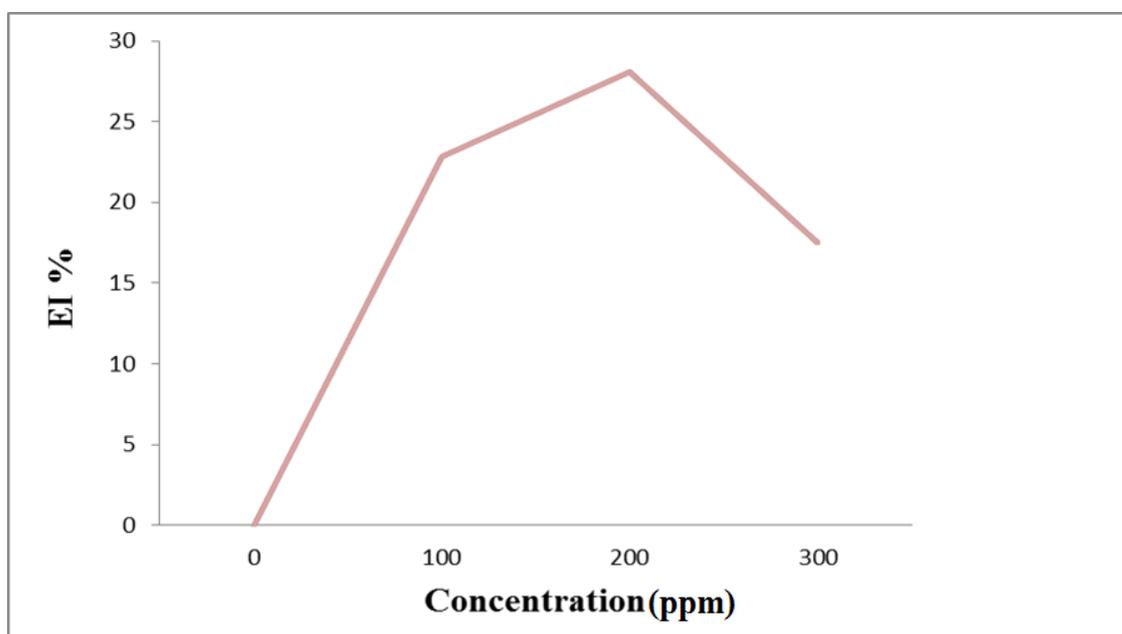


Figure III.25 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentrations de l'inhibiteur (Extrait n-butanol de *T.algeriensis*).

Le développement de l'efficacité inhibitrice corrèle toujours avec l'accroissement de la concentration d'inhibiteur (28.07% avec la concentration de 200 ppm d'inhibiteur), cela peut s'exprimer par le phénomène d'adsorption de produits naturels sur la surface du métal [58]. Tandis que à une concentration plus élevée (300ppm) , l'efficacité inhibitrice par cette méthode diminue cela nous permet de déterminer que la concentration 200ppm nous donne une efficacité inhibitrice maximale, au-delà de cette concentration l'efficacité diminue.

2. Les mesures électrochimiques

2.1. La polarisation potentiodynamique

Les courbes de polarisation cathodique et anodique de l'acier en milieu HCl 1M, en absence et en présence de l'extrait n-butanol (BETA) à différentes concentrations sont présentées dans la figure III.26.

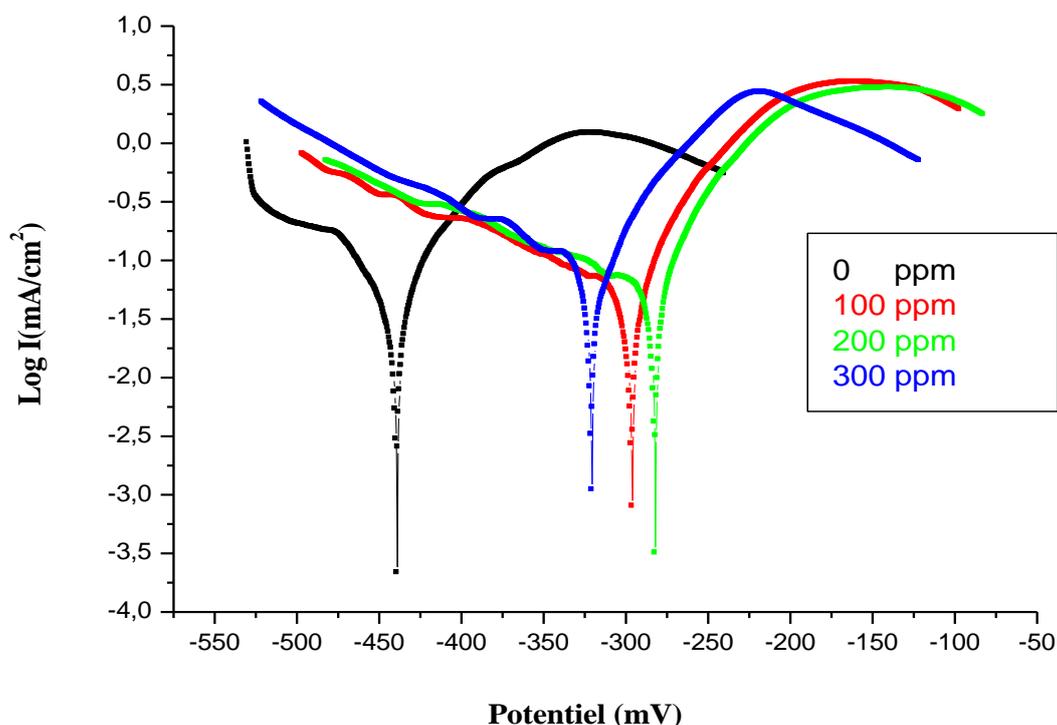


Figure III. 26 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.

Le tableau III.11 rassemble les valeurs associées aux paramètres électrochimiques déterminées à partir de ces courbes ainsi que l'efficacité inhibitrice de la corrosion obtenue de l'extrait n-butanol de l'espèce *T.algeriensis*.

Tableau III.11 : Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

[conc] ppm	$-E_{\text{corr}}$ (mV)	i_{corr} (mA.cm ²)	β_a (mV)	$-\beta_c$ (mV)	CR (mm.y ⁻¹)	EI (%)
0	438.9	0.1662	123.9	-93.4	1.943
100	296.2	0.0489	60.6	-150.5	0.572	70.57
200	281.9	0.0485	57.2	-163.7	0.570	70.81
300	320.6	0.0548	61.8	-126.4	0.640	67.02

On assiste à un déplacement des deux branches de la courbe de polarisation (anodiques et cathodiques).

Les valeurs des pentes de Tafel cathodiques et anodique varient dans l'intervalle 60-62 mV/décade et 126-150 mV/décade indiquant que des réactions anodiques et cathodiques étaient effectuées, mais que l'effet sur les réactions anodiques était plus important. Ainsi, l'extrait n-butanol de l'espèce *T.algeriensis* a agi comme un type mixte, mais principalement un inhibiteur anodique.

L'addition de l'extrait n-butanol au milieu corrosif conduit à une diminution des densités de courant de corrosion au fur et à mesure que la concentration en inhibiteur augmente et par conséquent une augmentation des résistances de polarisation sauf aux grandes concentrations.

Les efficacités inhibitrices de cet extrait augmentent avec la concentration et atteignent approximativement 70.81% pour l'extrait à 200 ppm.

Tandis qu'à forte concentration (300ppm) l'efficacité inhibitrice diminue ce qui est déjà observée dans le test de la perte de masse ou nous avons déterminé que l'efficacité inhibitrice à 200ppm est considérée comme maximale pour cet inhibiteur en milieu HCl 1M.

2.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Concernant les mesures d'impédance électrochimique, la figure III.27 représente les diagrammes de Nyquist de l'acier doux dans une solution HCl 1M en absence et en présence des molécules inhibitrices de l'extrait n-butanol à différentes concentrations.

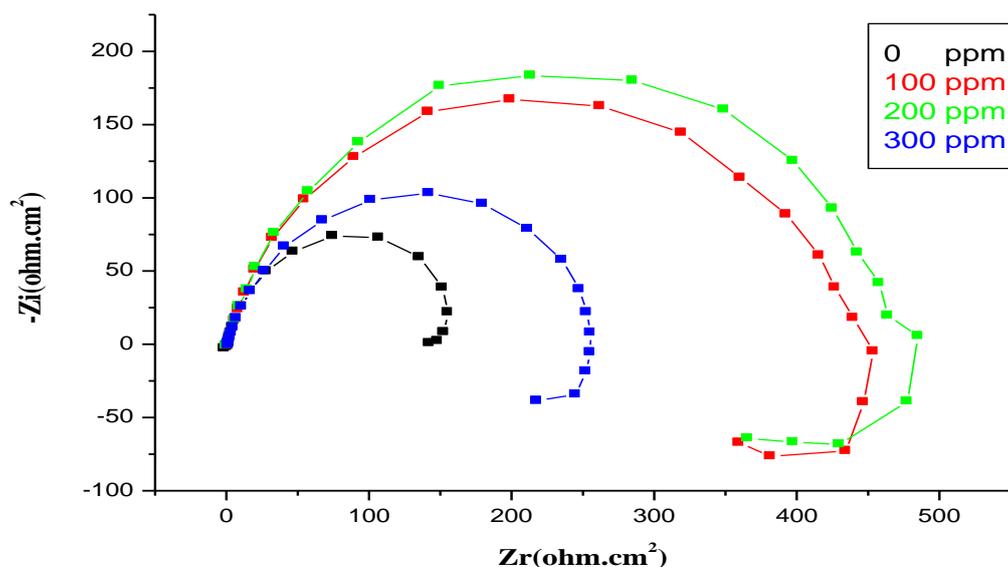


Figure III. 27 : Les courbes de Nyquist de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.

Nous remarquons, pour toutes les concentrations des différents extraits, la présence d'une seule boucle capacitive correspondant à la résistance de transfert de charge (R_t). A partir de ces diagrammes réalisés aux potentiels d'abandon (potentiel de corrosion), nous avons pu accéder aux valeurs de la résistance de transfert de charge R_t et de la capacité de la double couche C_{dl} et par conséquent à l'efficacité inhibitrice de l'extrait dans les conditions opératoires considérées.

Les paramètres relatifs aux mesures des impédances électrochimiques de l'acier en milieu HCl 1M avec et sans extrait sont regroupés dans le tableau III.12.

Tableau III.12 : Les paramètres d'impédance électrochimique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

[conc] ppm	C_{dl} (μ F.cm ²)	R_s (Ω . cm ²)	R_{tc} (Ω . cm ²)	EI (%)
0	0.724	156	24.83
100	4.30	93.92	294.4	91.56
200	3.16	87.63	322.9	92.31
300	4.14	30.42	207.2	88.02

La résistance de transfert de charge augmente avec la concentration de l'inhibiteur tandis que la capacité de la double couche diminue au fur et à mesure que la quantité de l'inhibiteur

croît. La diminution de C_{dl} est due à l'adsorption de l'inhibiteur à la surface de l'acier (figure III.28).

Le comportement électrochimique au potentiel d'abandon, peut être décrit par un schéma électrique équivalent simple (Figure III.26) constitué par une capacité en parallèle avec une résistance, le tout en série avec la résistance de l'électrolyte.

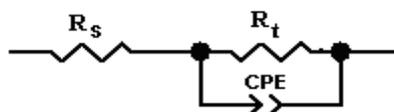


Figure III.28 : Circuit équivalent utilisé déterminant les spectres d'impédance.

Les efficacités inhibitrices augmentent avec la concentration de l'inhibiteur pour atteindre une valeur maximale de 92.31% à 200 ppm.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux déterminés à partir des courbes de polarisation ainsi à partir le test de la perte de masse.

Hamdani et al. a trouvé que l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* présente d'excellentes propriétés d'inhibition de corrosion de l'acier doux dans du HCl 1,0 M.

Ils ont trouvés aussi que l'efficacité de l'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration en HE et que les efficacités des inhibiteurs déterminées par la perte de poids, la polarisation Tafel et la méthode d'impédance ont raisonnablement en accord. Ils ont attribués que l'huile essentiel étudié peut être classé comme inhibiteur mixte [59].

Conclusion

Le travail présent dans cette partie constitue une contribution à l'utilisation d'un nouveau type d'inhibiteurs de corrosion de métaux dits inhibiteurs verts.

L'étude consiste à déterminer l'efficacité inhibitrice de l'extrait n-butanol de l'espèce *Thymus algeriensis* vis-à-vis de la corrosion de l'acier 316L en milieu HCl 1M par des méthodes électrochimiques (perte de masse, courbes de polarisation et mesures de l'impédance électrochimique).

En effet, l'extrait n-butanol a été testé en plusieurs concentrations. L'extrait inhibe efficacement la corrosion de l'acier dont l'efficacité maximale atteindra 70.81% à 200ppm.

Les molécules existant dans cet extrait agissent comme un inhibiteur de corrosion mixte avec une tendance anodique. L'efficacité augmente avec la concentration de l'inhibiteur.

L'évaluation de l'activité anti corrosion de l'extrait n-butanol de l'espèce *T.algeriensis* n'a jamais été étudiée précédemment.

Partie 2 : L'espèce *Atriplex mollis* Desf.

A. Caractérisation phytochimique de l'espèce *Atriplex mollis* Desf.

1. Rendement d'extraction

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau III.13.

Tableau III.13 : Rendement des extraits.

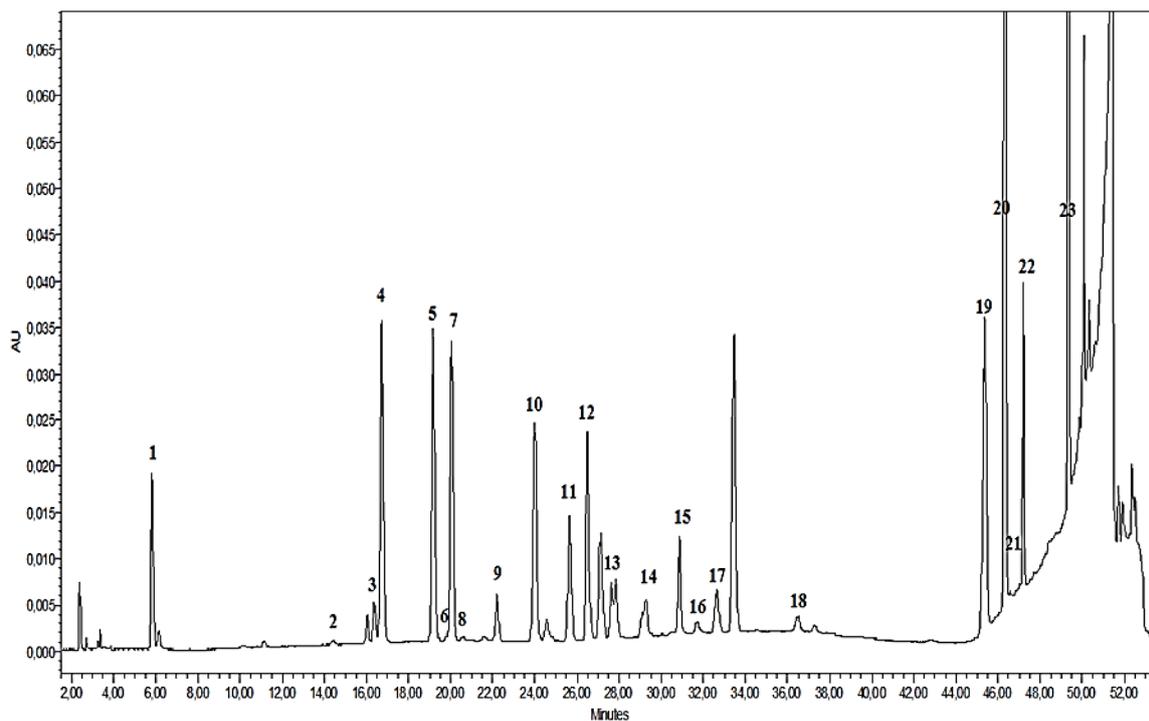
Méthode d'extraction	Matériel végétal	Solvant	R (%)
Macération	Partie aériennes (2000g)	Ether de pétrole	0.25%
		Chloroforme	0.12%
		Acétate d'éthyle	0.13%
		n-butanol	1.01%
MAE	1g	H ₂ O	7.1–9.5%
SFE	3.29g	/	0.53-0.68%

2. Analyse qualitative et quantitative

2.1. Profil des polyphénols par la méthode HPLC-PDA

L'objectif de cette analyse résume dans le cadre de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques ainsi l'effet des différents paramètres opératoire sur le rendement global d'extraction.

Les figures III.29 et III.30 représentent le chromatogramme enregistré à 280nm ainsi que les structures chimiques des standards utilisés dans l'analyse HPLC-PDA.



1 Acide gallique, 2 Catéchine, 3 Acide chlorogénique, 4 Acide 4-hydroxybenzoïque, 5 Acide vanillique, 6 Acide caféique, 7 Epicatechine, 8 Acide syringique, 9 Acide 3-hydroxybenzoïque, 10 3-OH, 4-MeO benzaldéhyde, 11 Acide p-coumarique, 12 Rutine, 13 Acide sinapinique, 14 Acide t-férulique, 15 Naringine, 16 Acide 2,3-dimethoxybenzoïque, 17 Acide benzoïque, 18 Acide o-coumarique, 19 Quercétine, 20 Harpagoside, 21 Acide t-cinnamique, 22 Naringénine, 23 Carvacrole.

Figure III.29: chromatogramme du mélange des standards utilisés.

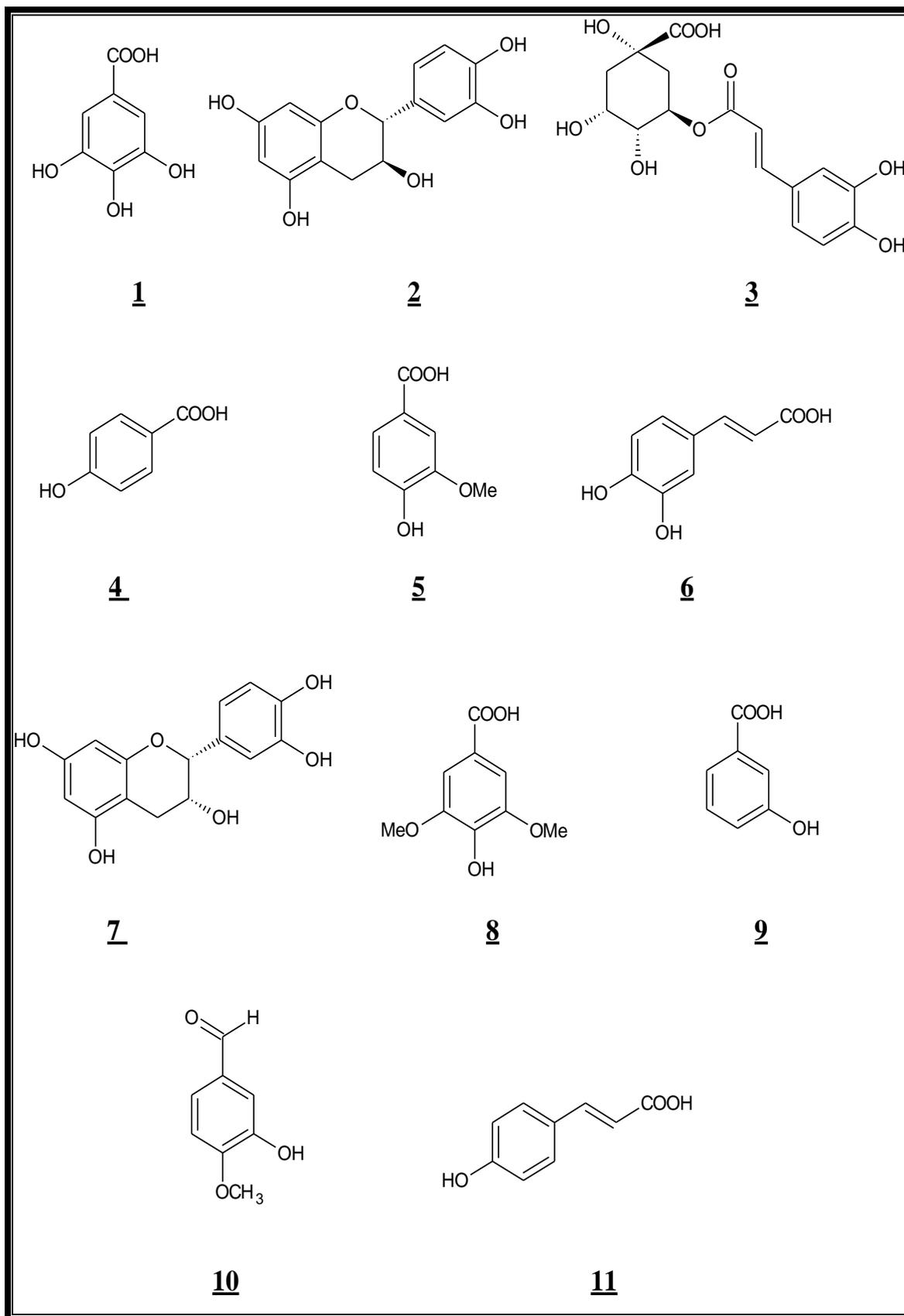


Figure III.30: les structures chimiques des standards utilisés.

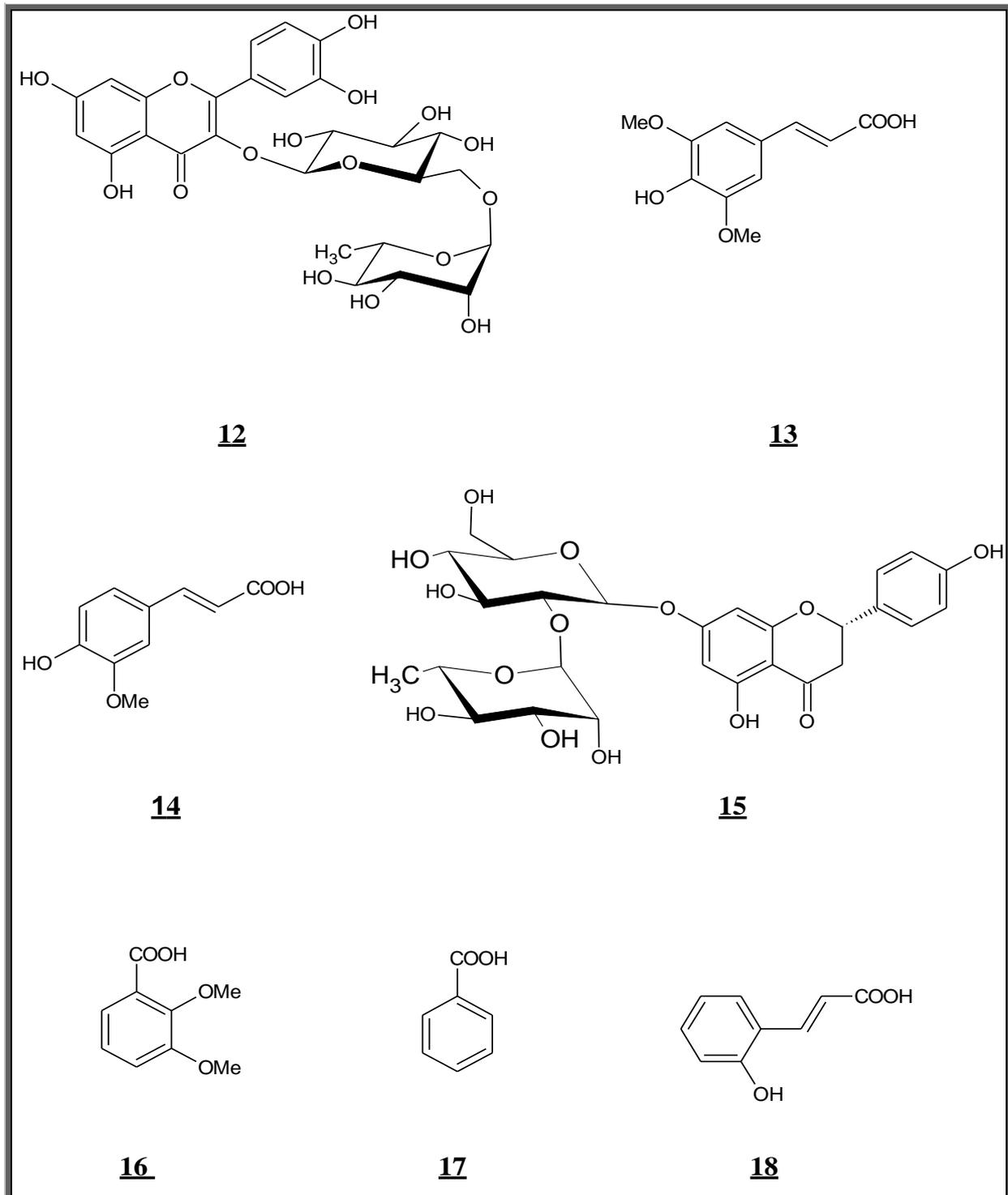


Figure III.30, la suite.

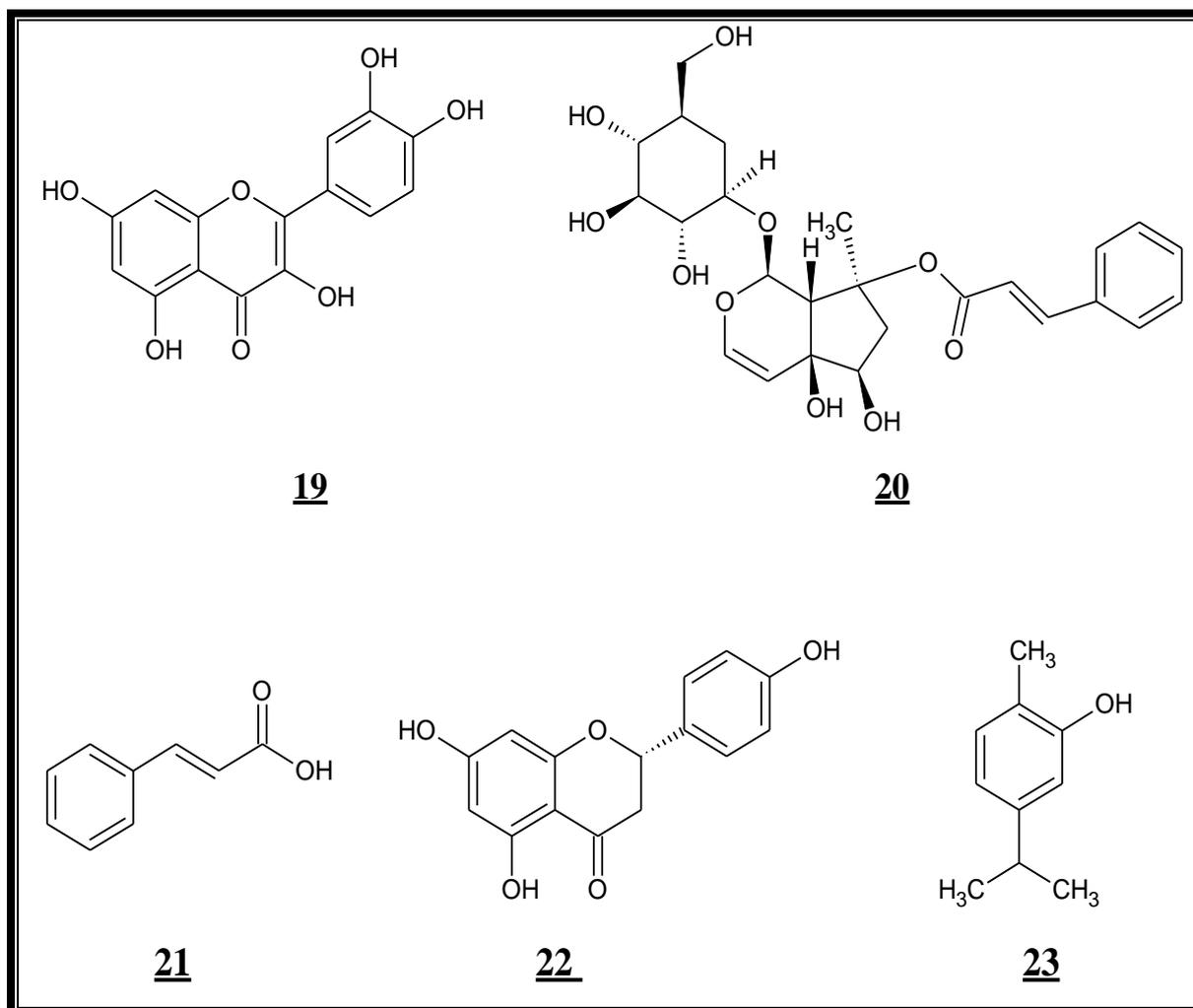


Figure III.30, la suite.

2.1.1. Le profil des polyphénols des sous fractions des extraits obtenus par macération

Des extraits à polarité croissante ont été obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) à partir des parties aériennes de l'espèce *A.mollis*.

Les résultats du profil phénolique de ces extraits par HPLC-PDA sont présentés dans le tableau III.14.

Tableau III.14 : Le profil phénolique des différents extraits de l'espèce *A.mollis* obtenus par extraction hydroalcoolique analysé par HPLC-PDA.

Composés identifiés	Teneur ($\mu\text{g/g PS} \pm \text{ET}$)						
	CHCl_3			AcOEt			n-BuOH
	F ₄	F ₇	F ₁₃	F ₆	F ₁₀	F ₁₆	
Acide gallique	n.d	n.d	n.d	0.23± 0.02	0.70± 0.07	1.5 ± 0.1	0.84± 0.07
Catéchine	n.d	n.d	9.9± 0.9	0.94± 0.08	2.7± 0.1	34.0 ± 2.2	0.80± 0.06
Acide chlorogénique	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.0 ± 0.1
Acide p-Hydroxybenzoïque	0.36± 0.04	n.d	n.d	115± 8	n.d	0.49± 0.05	n.d
Acide Vanillique	0.46± 0.06	7.9± 0.7	42.2± 1.3	1.3± 0.1	0.48 ± 0.05	7.7 ± 0.7	n.d
Epicatéchine	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.2	158 ± 10	2.2 ± 0.3	4.0 ± 0.3	8.6 ± 0.8	0.31 ± 0.02
Acide Syringique	n.d	2.2 ± 0.1	0.37 ± 0.03	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide 3-hydroxybenzoïque	n.d	n.d	0.19 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	1.5 ± 0.1
3-OH-4-MeO benzaldéhyde	0.53 ± 0.05	n.d	1.9± 0.2	0.23 ± 0.02	6.0 ± 0.5	4.1 ± 0.4	n.d
Acide p-Coumarique	24.9 ± 1.2	n.d	n.d	20.3 ± 2.3	n.d	n.d	n.d
Rutine	n.d	n.d	n.d	9.1 ± 0.8	65.1 ± 5.3	1.0 ± 0.1	12.3 ± 0.2
Acide sinapinique	n.d	n.d	8.6 ± 0.8	1.8 ± 0.1	n.d	n.d	n.d
Acide t-Ferulique	n.d	n.d	n.d	1.8 ± 0.2	0.93 ± 0.08	n.d	n.d
Naringine	0.17 ± 0.02	5.8 ± 0.3	6.3 ± 0.2	0.17 ± 0.01	n.d	9.6 ± 0.8	n.d
Acide 2,3-Dimethoxybenzoïque	n.d	n.d	0.28 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide benzoïque	2.3 ± 0.1	2.6 ± ±0.3	12.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4	0.25 ± 0.02	7.4 ± 0.5	n.d
Acide o-Coumarique	0.28 ± 0.02	n.d	0.17 ± 0.01	n.d	n.d	0.84 ± 0.07	n.d

Quercétine	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.96 ± 0.08	n.d
Acide t-cinnamique	n.d	0.51 ± 0.04	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Naringenine	0.16 ± 0.01	7.2 ± 0.7	n.d	n.d	n.d	n.d	0.11 ± 0.01
Carvacrole	0.19 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.28 ± 0.02	n.d	n.d	n.d	0.15 ± 0.01
Totale	31.9±1.98	29.8±1.03	241±3.25	157.5±2.57	80.1±1.98	76.3±1.65	17.1±0.68
Composés identifiés	10	8	12	12	8	11	8
Composés identifiés par extrait	16			14			8

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. µg /g PS: poids sec.

Ces constituants appartiennent à trois classes chimiques importantes: les acides phénoliques, les monoterpènes et les flavonoïdes. Vingt-et-un composés ont été détectés dans l'extrait hydroalcoolique obtenu par macération (Figure III.31).

Le plus grand nombre de composés observés a été trouvé dans les deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle avec seize et quatorze composés respectivement, tandis que, dans l'extrait n-butanol, seulement huit composés ont été détectés.

L'extrait chloroforme apparaît l'extrait le plus riche en composés phénoliques. Seize composés ont été détectés avec une teneur importante (241 ± 4.32 µg/g) dans la fraction F₁₃.

Le principal composé présent dans l'extrait chloroforme était l'épicatéchine avec une teneur moyenne de 158 ± 10 mg / g, avec d'autres composés abondants étaient l'acide vanillique (42.2 ± 1.3 µg/g), acide p-coumarique (24.9 µg/g) et la catéchine (9.9 µg/g).

Dans l'industrie alimentaire asiatique, les catéchines du thé vert ont été utilisées dans une large gamme de produits commerciaux en tant qu'ingrédients alimentaires fonctionnels pour prolonger la durée de conservation des produits et offrir des avantages supplémentaires pour la santé des consommateurs [60].

Dans les extraits acétate d'éthyle, quatorze composés étaient présents. L'acide hydroxybenzoïque apparaît le produit principale avec une teneur 115 ± 8 µg/g, avec d'autres composés

moins abondant étaient : la rutine (65.1 $\mu\text{g/g}$), catéchine (34 ± 2.2 $\mu\text{g/g}$) et l'acide p-coumarique (20.3 $\mu\text{g/g}$).

D'autre part, Huit composés seulement ont été détectés dans l'extrait n-butanol avec des composants moins abondant que dans les deux autres extraits. La rutine est le produit majoritaire avec une teneur $12.3 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$.

L'épicatéchine a été identifiés dans tous les extraits, tandis que l'acide vanillique et l'acide benzoïque n'étaient absents que dans l'extrait n-butanol.

Le carvacrole et la naringénine n'ont pas été détectés dans l'extrait acétate d'éthyle, l'acide gallique et la rutine étaient absent dans l'extrait chloroforme.

Tandis que l'acide 2,3-diméthoxybenzoïque et l'acide t-cinnamique ont été détecté seulement dans l'extrait chloroforme, et c'est le même cas pour l'acide chlorogénique qui a été détecté que dans l'extrait n-butanol.

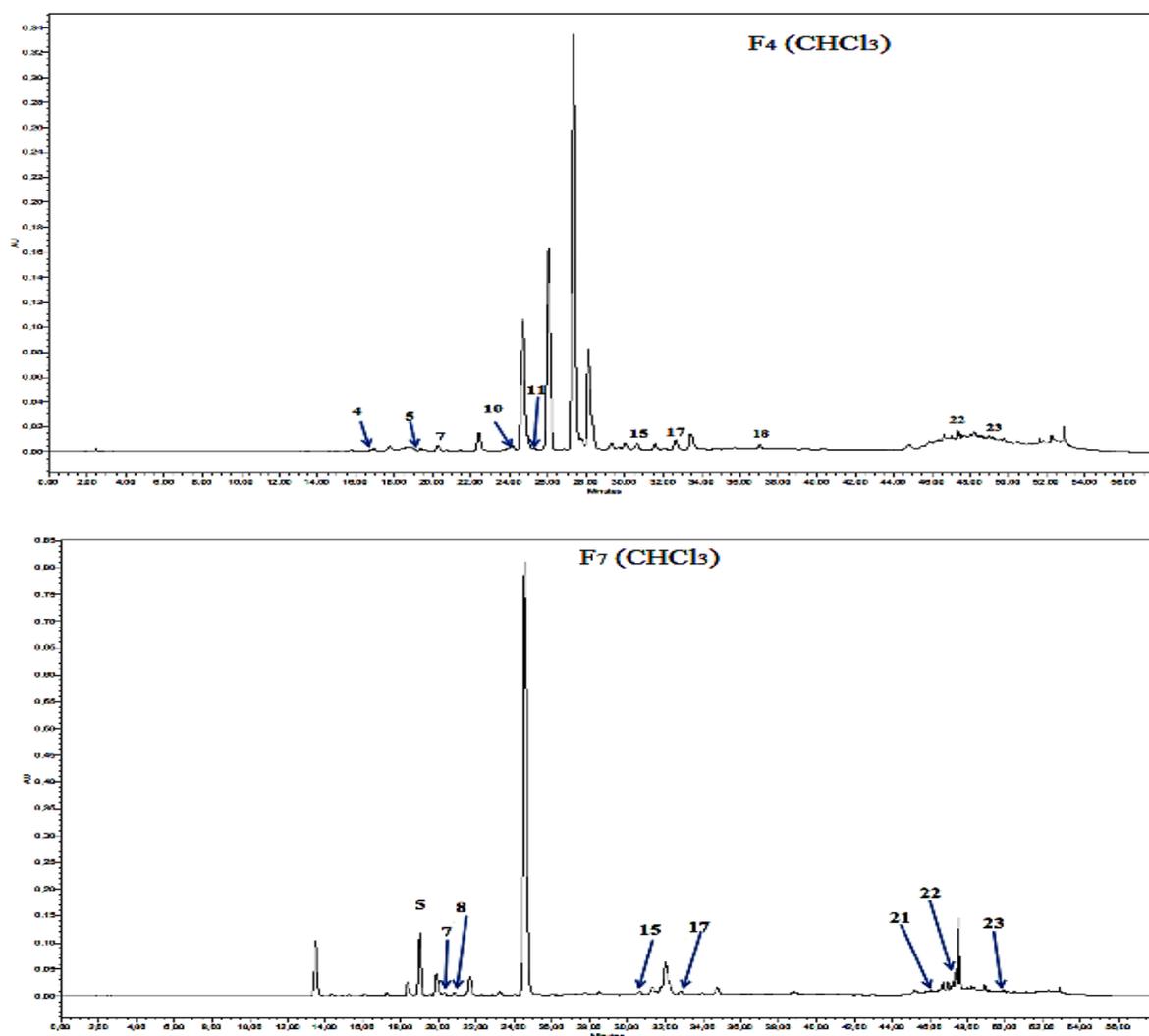


Figure III.31: Les chromatogrammes HPLC-PDA des extraits obtenus par macération à 280 nm pour des raisons de clarté.

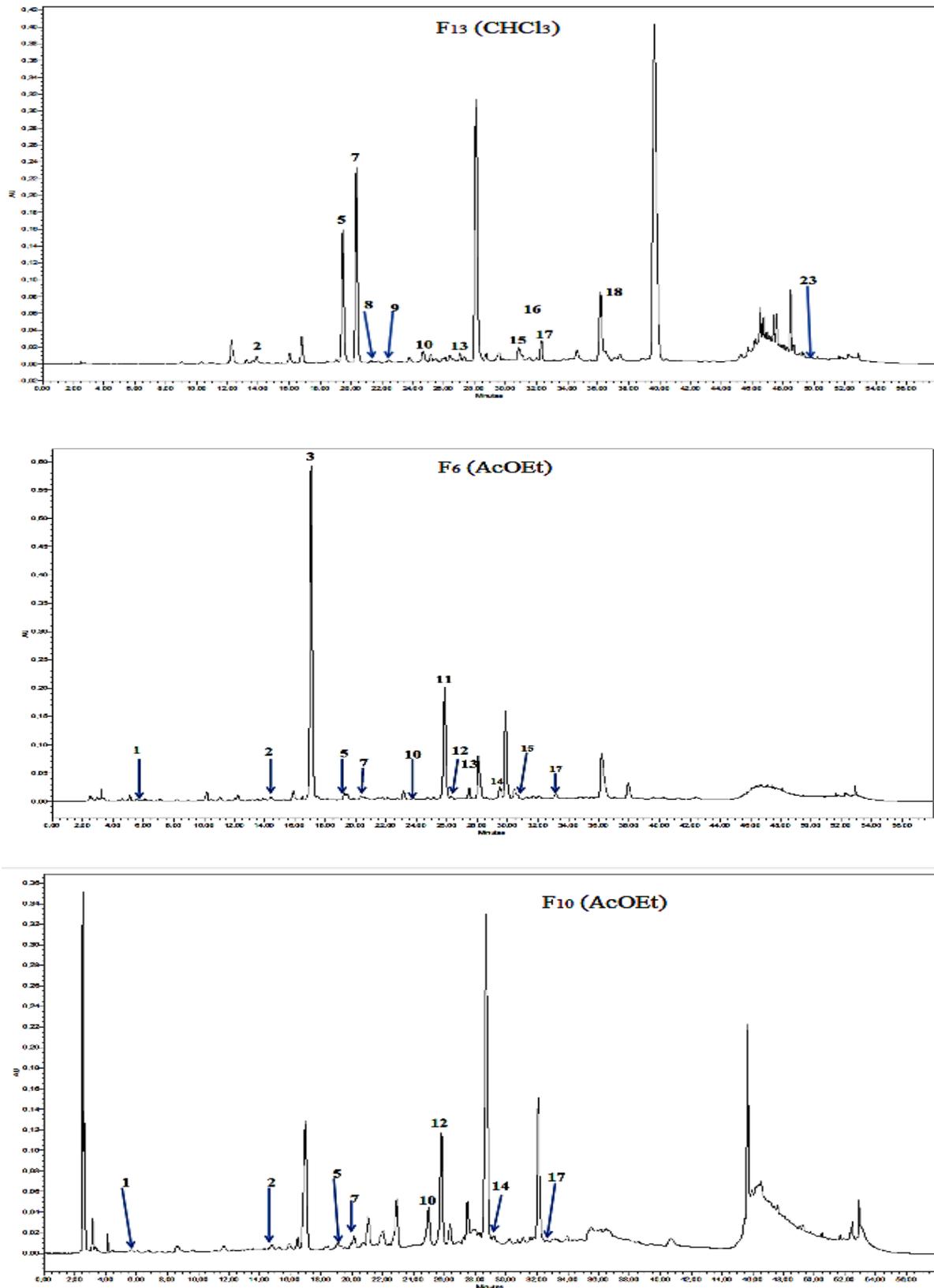


Figure III.31, La suite.

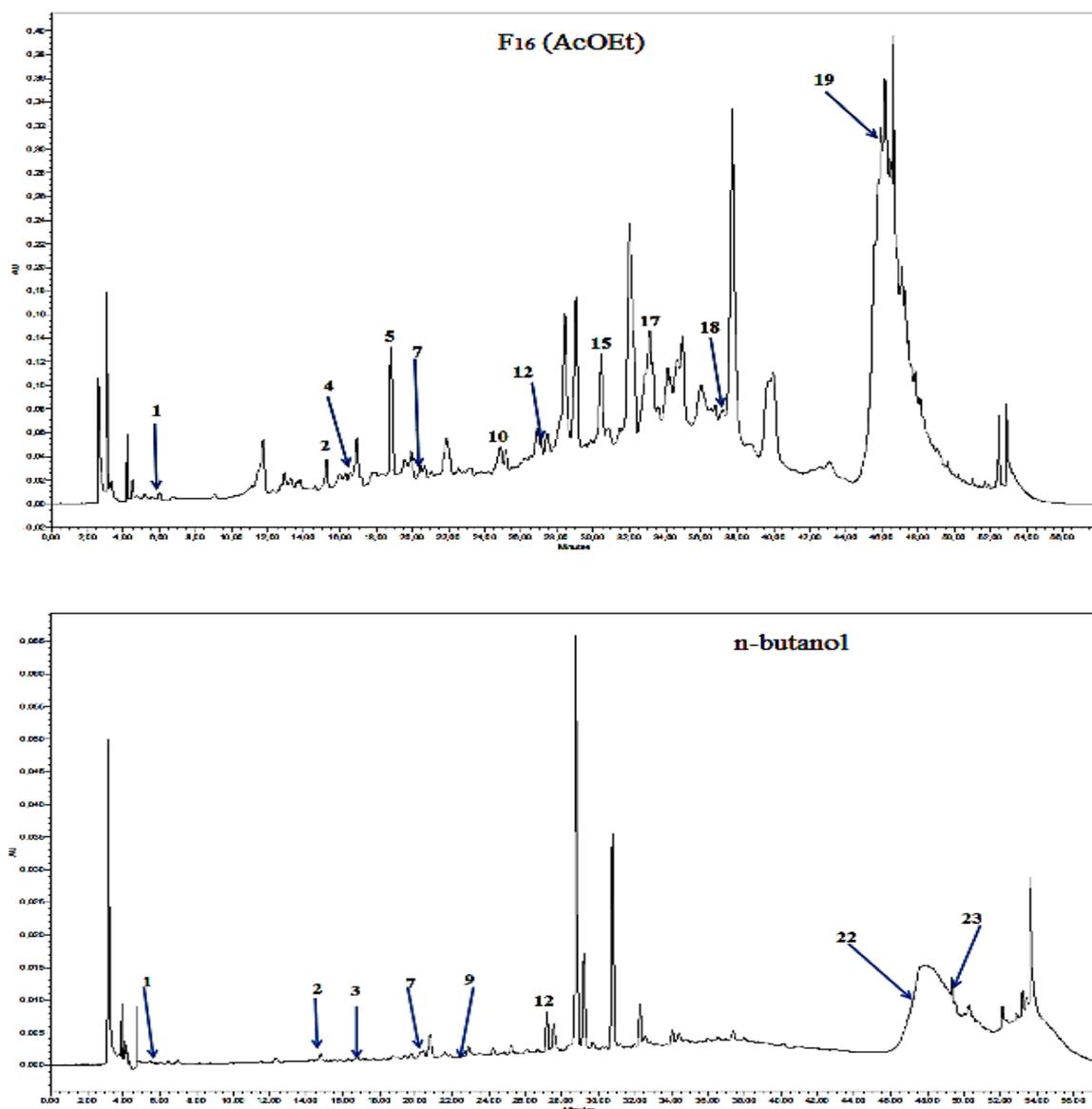


Figure III.31, La suite.

❖ Discussion

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les rendements varient d'une extraction à une autre (Figure III.32).

Cette différence est expliquée par la différence de diffusion du solvant dans la poudre de la plante dans l'étape de la macération et probablement à la nature du solvant utilisés pour l'extraction [61].

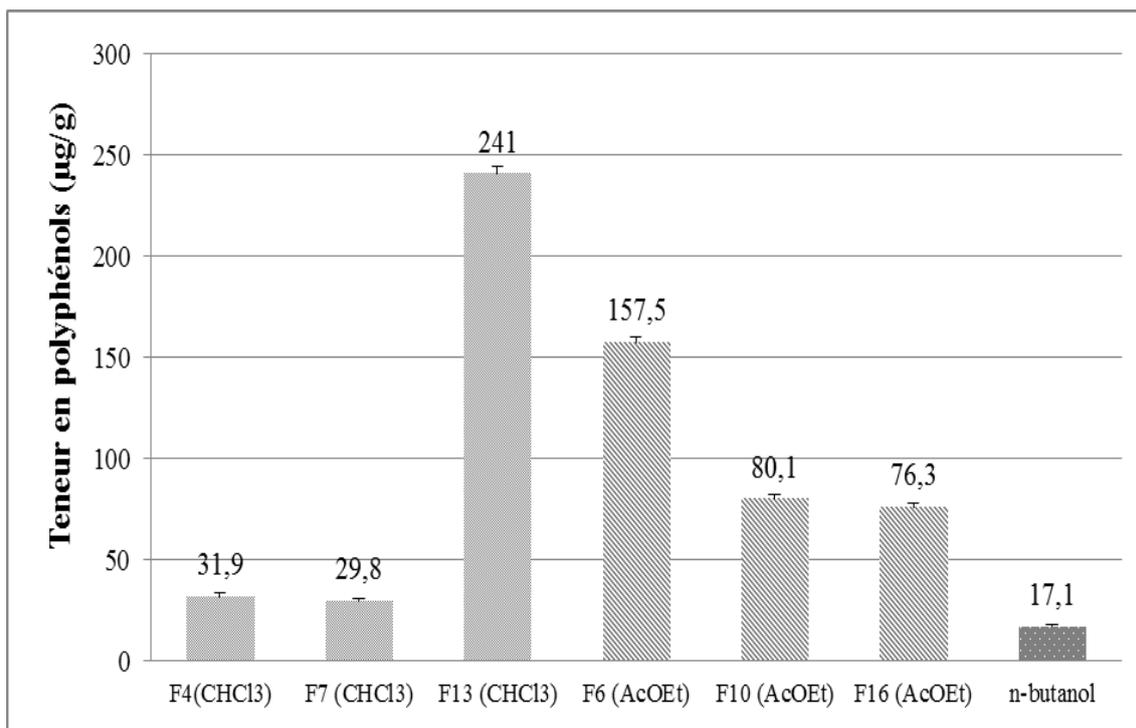


Figure III.32 : Influence du solvant sur la teneur des polyphénols.

L'effet du solvant sur le rendement d'extraction a été signalé dans de nombreuses études [22,23].

La nature du solvant est très importante pour pouvoir extraire les molécules d'intérêt et, si possible, de façon sélective. Le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et posséder une grande capacité de dissolution. Une faible viscosité facilitera la pénétration du solvant dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide [62].

Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer plusieurs jours; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives [63,64].

2.1.2. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction assistée par micro-ondes :

Les résultats de la composition chimique des extraits aqueux et éthanoliques des parties aériennes de l'espèce *A.mollis* obtenus par HPLC-PDA sont présentés dans le tableau III.15 et les chromatogrammes d'HPLC-PDA des extraits sont montrés dans la figure III.32.

Tableau III.15 : Composition chimique des extraits polaires de l'espèce *Atriplex mollis*.

Composés identifiés	Teneur ($\mu\text{g/g PS} \pm \text{ET}$)						
	40 °C, 10 min H ₂ O	60 °C, 10 min H ₂ O	80 °C, 10 min H ₂ O	100 °C, 10 min H ₂ O	120 °C, 10 min H ₂ O	80 °C, 5 min H ₂ O	80 °C, 15 min H ₂ O
Acide gallique	59.6 \pm 1.6	58.7 \pm 1	21.9 \pm 1.5	76.6 \pm 5.2	63.9 \pm 4.2	n.d	n.d
Catéchine	n.d	n.d	55.5 \pm 3.8	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide Chlorogénique	30.8 \pm 2.4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide p-Hydroxy-benzoïque	34.7 \pm 3.5	37.9 \pm 1.8	19.8 \pm 1.3	5.16 \pm 0.09	n.d	n.d	6.18 \pm 0.09
acide Vanillique	115 \pm 12	8.62 \pm 0.9	125 \pm 13	16.4 \pm 0.8	16.8 \pm 0.9	n.d	137 \pm 11
3-OH, 4-MeO benzaldéhyde	n.d	n.d	n.d	n.d	21.8 \pm 1.5	n.d	n.d
Acide p-Coumarique	n.d	15.9 \pm 1.1	12.7 \pm 1.0	14.9 \pm 1.1	16.3 \pm 1.7	5.42 \pm 0.08	6.23 \pm 0.09
Rutine	377 \pm 29	411 \pm 32	486 \pm 39	520 \pm 45	521 \pm 40	440 \pm 34	552 \pm 48
Acide Sinapinique	23.3 \pm 1.6	n.d	15.6 \pm 1.0	19.5 \pm 1.3	26.5 \pm 2.1	18.3 \pm 1.8	18.9 \pm 1.2
acide t-Féruilique	80.8 \pm 5.7	81.6 \pm 4.9	95.5 \pm 8.1	109 \pm 14	112 \pm 10	94.3 \pm 8.3	107 \pm 11
Naringine	41.9 \pm 2.5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acide benzoïque	n.d	n.d	n.d	n.d	27.9 \pm 8.9	n.d	n.d
Total	762.89 \pm 2.36	613.50 \pm 3.82	832.56 \pm 5.16	761.58 \pm 9.21	805.94 \pm 6.02	558.17 \pm 5.32	784.63 \pm 5.39
Composés identifiés	8	6	8	7	8	4	6

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. $\mu\text{g/g PS}$: poids sec

Nous avons effectué une extraction assistée par micro-ondes des parties aériennes de l'espèce *Atriplex mollis* en utilisant l'eau comme solvants polaire et non toxique (volume de solvant = 20 ml, quantité du matériel végétale 1 g, temps d'extraction = 10 min) à des températures allant de 40 à 120 °C pour évaluer la meilleure température d'extraction [65].

Nous avons observé que le meilleur rendement d'extraction a été obtenu à 80 ° C pendant 10 minutes (rendements entre 8,3 et 10,1% PS). Le raccourcissement (5 min) ou la prolongation (15 min) du temps d'extraction à 80 ° C n'améliorait pas le rendement des polyphénols totaux.

Nous avons appliqué ces conditions pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction. Une extraction. Aucun standards n'a été détecté dans l'extrait éthanolique (éthanol/eau : 70/30, v/v)

Douze composés ont été identifiés et sont regroupés dans le tableau III.16. Les composés détectés appartiennent à deux grandes classes des polyphénols : acides phénoliques et flavonoïdes.

Parmi les flavonoïdes détectés, la rutine a été identifiée comme étant la plus abondante avec une teneur 486 µg / g.

La rutine (vitamine P) est un bioflavonoïde (flavonol) naturel appartenant à la classe des polyphénols, ont un intérêt thérapeutique incontestable grâce à leurs propriétés vasculaires.

Ces molécules sont prescrites en effet dans tous les états pathologiques se traduisant par une fragilité vasculaire, car elles renforcent la résistance des capillaires et diminuent leur perméabilité. Une large gamme d'effets biologiques comprenant des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, neuroprotectrices, néphroprotectrices et hépatoprotectrices a été rapportée pour ce flavonoïde [66].

Parmi les acides phénoliques, l'acides p-hydroxybenzoïque, acide sinapinique, acide p-coumarique, acide vanillique et l'acide t-férulique ont été identifiés, avec l'acide vanillique et l'acide t-férulique ayant la concentration la plus élevée (125 µg / g et 95,5 µg / g, respectivement).

L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant dans le monde végétal, y compris les céréales, les fruits, les légumes, les herbes et les épices. L'acide férulique possède des activités antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, antithrombotiques et anticancéreuses (Ou & Kwok, 2004) et est rapidement absorbée par l'estomac ou l'intestin et excrétée dans les urines [67].

L'acide gallique, l'acide t-férulique et la rutine ont été mieux récupérés à des températures plus élevées (100 ° C), tandis que la naringénine et l'acide chlorogénique n'ont été trouvés qu'à basse température (40 ° C), alors que l'acide benzoïque n'a pas été détecté qu'à une température plus élevée (120 ° C).

L'acide gallique, rutine, acide t-férulique, acide vanillique ont été détecté à toute température avec des teneurs considérables.

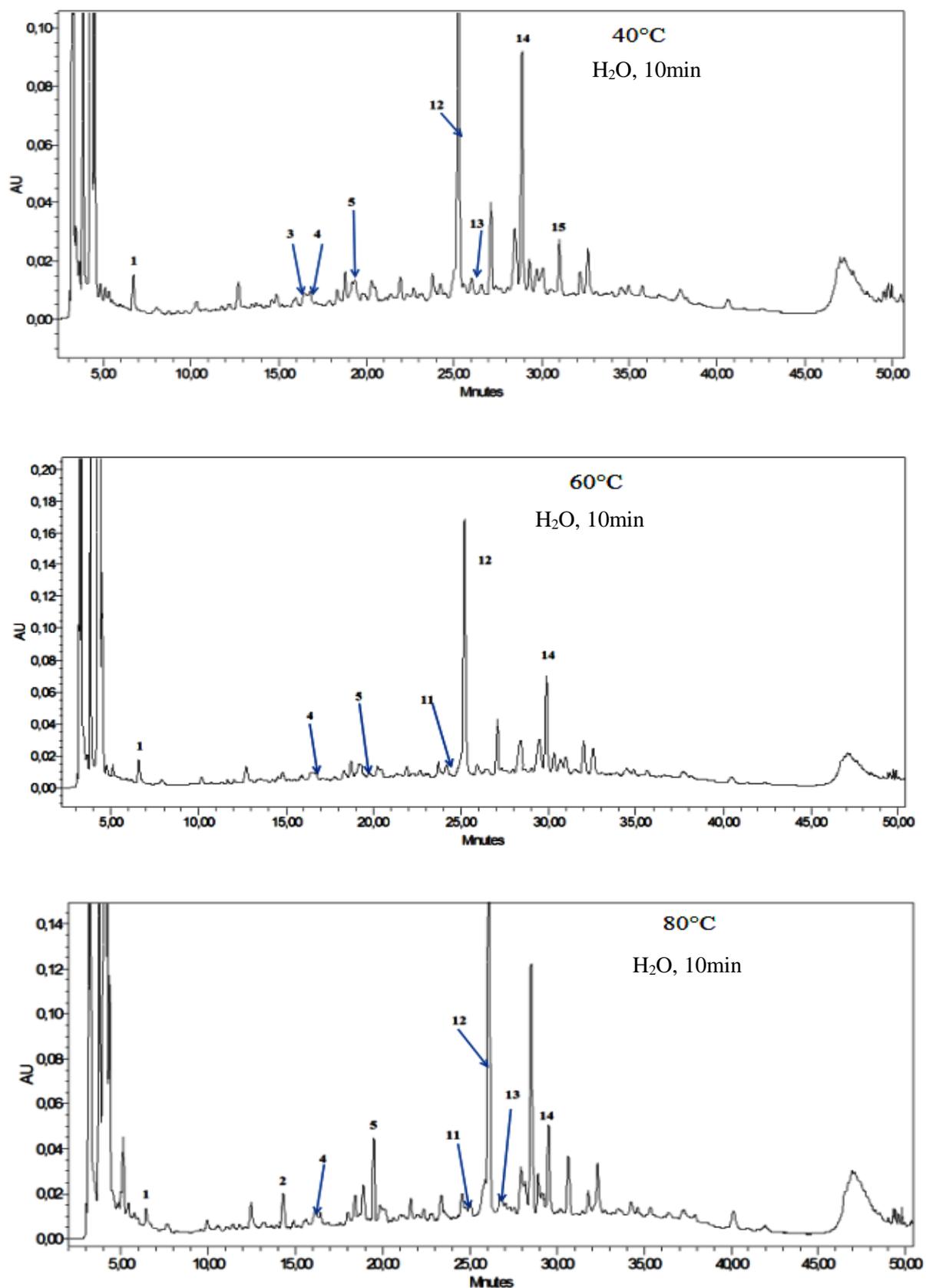


Figure III.33 Les chromatogrammes HPLC-PDA (280 nm) des différents extraits obtenus par extraction assistée par micro-ondes.

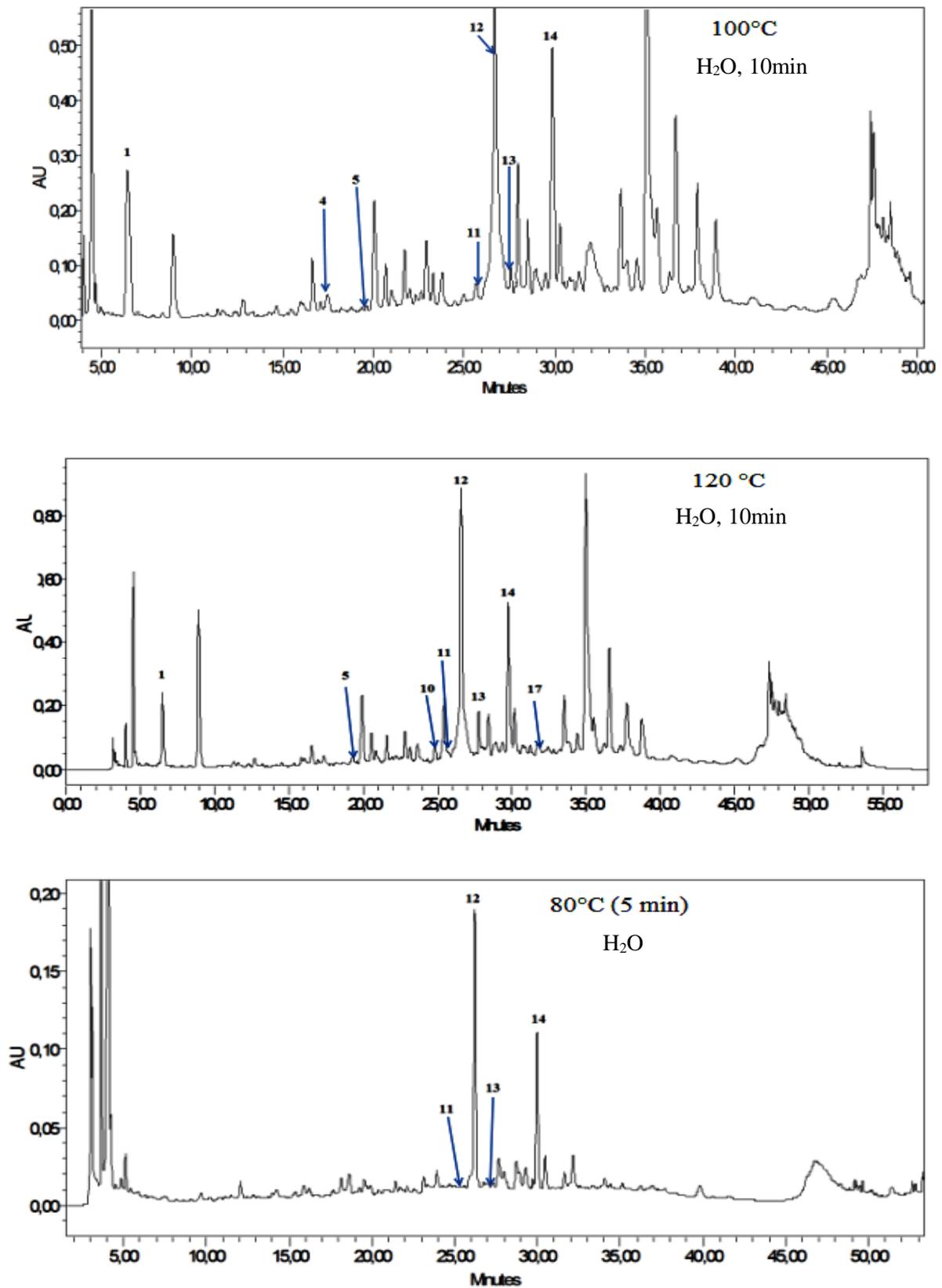


Figure III.33, La suite.

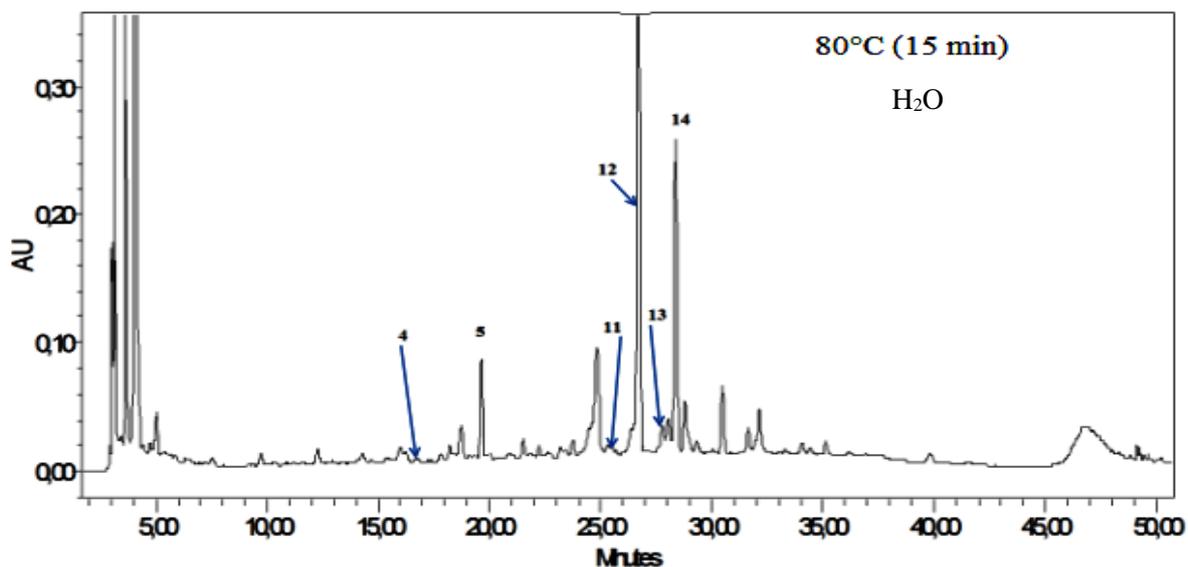


Figure III.33, La suite.

❖ Discussion

Une forte teneur en polyphénols totaux a été détectée au niveau des extraits aqueux (l'eau comme solvant polaire non toxique) obtenus par extraction assistée par micro-ondes, en particulier l'extraction à 80°C pendant 10min (Figure III.34).

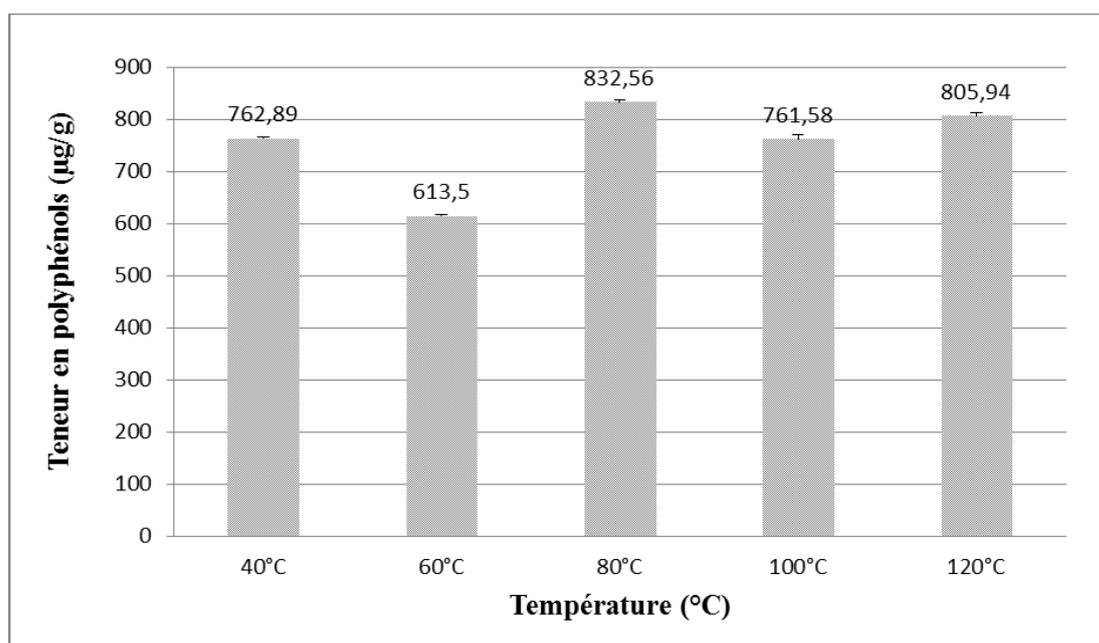


Figure III.34 : Effet de la température sur la teneur des polyphénols.

Le rendement d'extraction est lié aussi à l'élévation de la température. En effet, **Majhenic et al. (2007)** ont démontrés que l'extraction à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extrait sec en comparaison avec ceux obtenus à température ambiante [68].

Dai et Mumper (2010) ont montrés aussi que malgré le risque de la dégradation et l'oxydation des molécules par la température élevée mais elle est nécessaire pour augmenter la solubilité et le taux de transfert de masse [34]. Et c'est le cas de certains composés qui aient leurs teneurs maximales à 120°C tel que la rutine.

Larrauri et al. (1997) ont constaté que la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols [69].

Le temps de contact entre les deux phases est aussi un des paramètres très importants à maîtriser [70]. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au-delà. Ainsi des économies d'énergie et de main d'œuvre seront réalisées (Figure III.35).

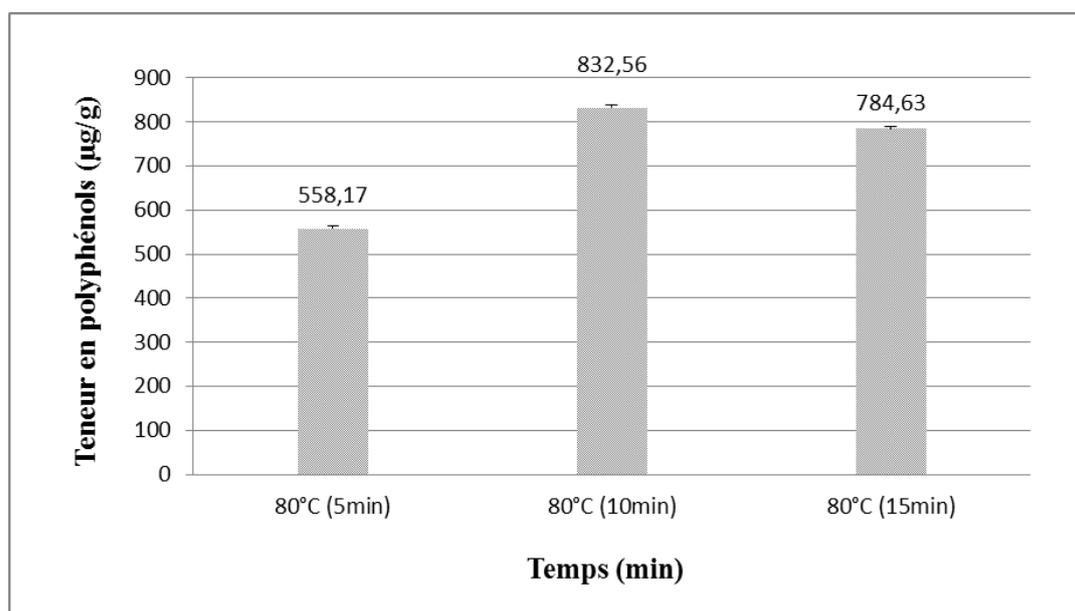


Figure III.35: Influence du temps d'extraction sur la teneur des polyphénols.

Comme le temps d'extraction utilisé dans cette étude n'est pas très long (10 min), ceci réduit le risque de perdre une grande quantité de ces composés.

La prolongation du temps (15min) provoque une perte de certains composés en comparaison avec l'extrait à 10 min tels l'acide gallique et la catéchine. Tandis que le

raccourcissement du temps (5 min) ne suffit pas pour détecter certains composés tels que l'acide gallique, la catéchine, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide vanillique.

Azizah et al. (2009) ont montré qu'à partir de la seizième minute, plus de 53% des composés phénoliques ont perdu par l'effet de la température [71].

La polarité du solvant semble aussi influencer sur le rendement d'extraction. En générale, les rendements les plus élevés sont obtenus avec les solvants polaires tel que : l'eau et l'éthanol ou le mélange des deux [38, 39].

L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales. Sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires. Pour des antioxydants peu polaires ou apolaires des solvants plus hydrophobes sont mieux adaptés [70,72].

Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, ainsi que leurs mélanges avec l'eau sont largement utilisés pour l'extraction des composés phénoliques.

Les mélanges extraient souvent mieux les substances ciblées que les solvants purs Tandis que dans l'extraction étudiée, aucun produit n'a été détecté dans le mélange EtOH/H₂O (70/30 : v/v).

2.1.3. Profil des polyphénols des extraits obtenus par extraction à fluide supercritique :

Les résultats de la composition chimique des extraits obtenus par extraction à fluide supercritique des parties aériennes de l'espèce *Atriplex mollis* analysés par HPLC-PDA sont présentés dans le tableau III.16 et les chromatogrammes d'HPLC-PDA de ces extraits sont montrés dans la figure III.36.

Tableau III.16 : Le profil phénolique des différents extraits de l'espèce *A.mollis* obtenus par SFE analysé par HPLC-PDA.

Composés identifiés	Teneur (µg/g PS ± ET)	
	40 °C, 10 MPa	40 °C, 30 MPa
Acide gallique	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Catéchine	0.21 ± 0.05	0.32 ± 0.03
Acide vanillique	0.29 ± 0.06	1.75 ± 0.09
Epicatechine	n.d	0.76 ± 0.05
Acide sinringique	0.14 ± 0.02	n.d

Tableau III.16, suite.		
3-OH, 4-MeO benzaldéhyde	0.25 ± 0.04	0.82 ± 0.03
Acide p-coumarique	0.24 ± 0.07	0.04 ± 0.01
Rutine	n.d	0.06 ± 0.01
Acide sinapinique	0.07 ± 0.01	2.39 ± 0.08
Acide t-férulique	0.33 ± 0.07	0.34 ± 0.04
naringine	0.38 ± 0.06	n.d
Acide 2,3-diMeO benzoïque	0.04 ± 0.01	0.003 ± 0.001
Acide benzoïque	n.d	0.08 ± 0.01
Harpagoside	n.d	0.20 ± 0.05
Naringénine	0.06 ± 0.01	n.d
Totale	2.05±0.09	6.78±0.1
Composés identifiés	11	12

n.d: non détecté. ET : les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. µg /g PS: poids sec

Afin de comparer les résultats qualitatifs et quantitatifs de différentes méthodes d'extraction, nous avons également effectué une extraction par fluide supercritique.

Les techniques supercritiques d'extraction ont été développées dans le but d'éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques.

Le SFE a été réalisé à température fixe (40 ° C) pour éviter la dégradation et l'oxydation phénolique et à deux valeurs de pression discrètes (10 et 30 MPa).

L'influence de chacun de ces paramètres sur le rendement globale d'extraction est étudiée dans cette partie.

La meilleure extraction a été choisie en fonction de rendement (rendement 0,62% pour 10 MPa et 0,82% pour 30 MPa)

Douze et onze métabolites ont été identifiés et quantifiés dans les extraits à 10 et 30 MPa respectivement.

Ces constituants appartiennent aux trois grandes classes chimiques : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les monoterpènes.

Les acides phénoliques identifiés étaient l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapinique, l'acide t-férulique, l'acide 2,3-

diméthoxybenzoïque et l'acide benzoïque avec l'acide sinapinique ayant la plus forte concentration (2,39 $\mu\text{g/g}$).

L'acide sinapinique (acide 3, 5-diméthoxy-4-hydroxy cinnamique) est largement répandu dans le règne végétal, il est utilisé comme matrice dans la spectrométrie de masse à Désorption-ionisation Laser assistée par matrice (MALDI) [73].

D'autre part, les flavonoïdes identifiés : la catéchine, l'épicatéchine et la rutine, avec l'épicatéchine étant la plus abondante (0,76 $\mu\text{g/g}$).

De plus, l'harpagoside, un glycoside monoterpénique iridoïde a été identifié dans l'extrait à 30 MPa à une concentration de 0,20 $\mu\text{g/g}$.

Plusieurs études ont montré que les extraits contenant de l'harpagoside avaient de bonnes activités anti-inflammatoires et analgésiques dans de nombreux modèles d'inflammation aiguë [74,75].

Collectivement, le SFE a fourni une quantité relativement faible de composés phénoliques en raison de la nature non polaire du solvant.

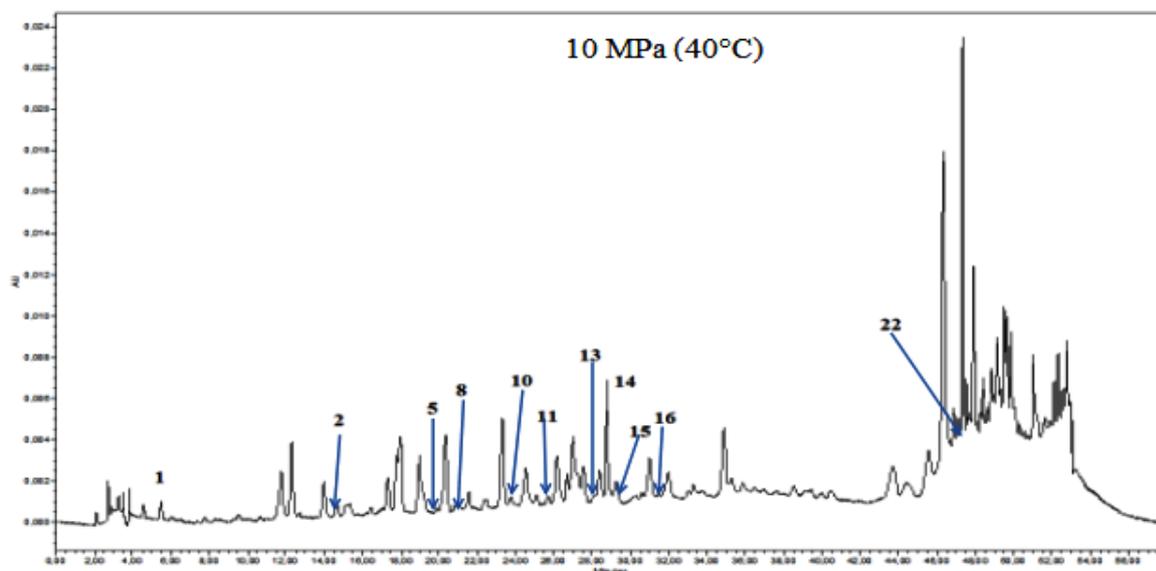


Figure III.36: Chromatogrammes HPLC/PDA des deux extraits obtenus par SFE à 280 nm.

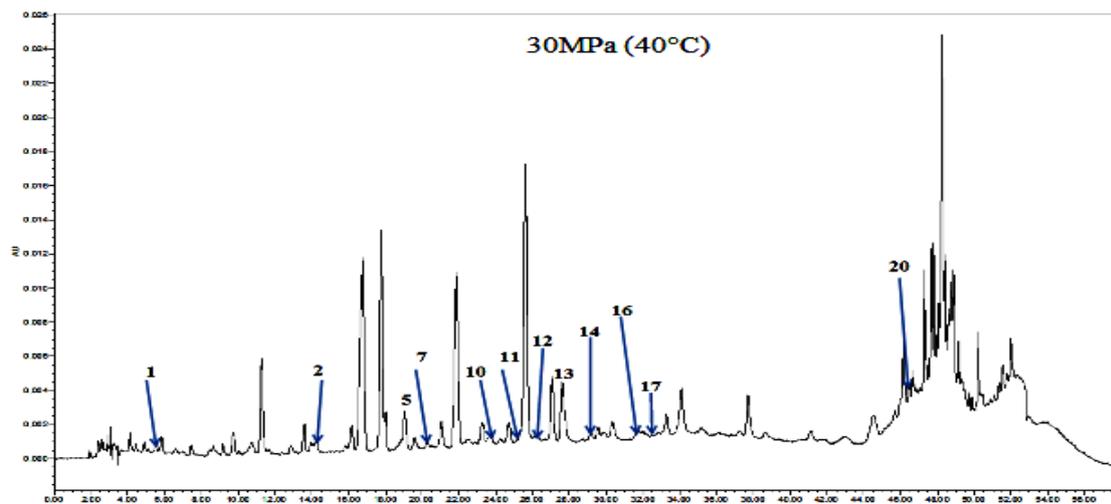


Figure III.36, La suite.

❖ Discussion :

L'extraction par CO₂ supercritique est un exemple de technique simple, rapide, efficace et pratiquement sans solvant ni prétraitement.

L'objectif de cette nouvelle technologie est l'élimination de l'utilisation du solvant organique toxique tout en diminuant la durée d'extraction et la consommation d'énergie.

Le choix des conditions de traitement (température et pression) permet de piéger les composants de façon distinctive et de récupérer un extrait purifié, ce qu'il n'est pas possible d'obtenir avec des solvants liquides [42]. Et c'est le cas pour l'harpagoside qui n'a pas été détecté qu'avec l'extraction à fluide supercritique (Figure III.37).

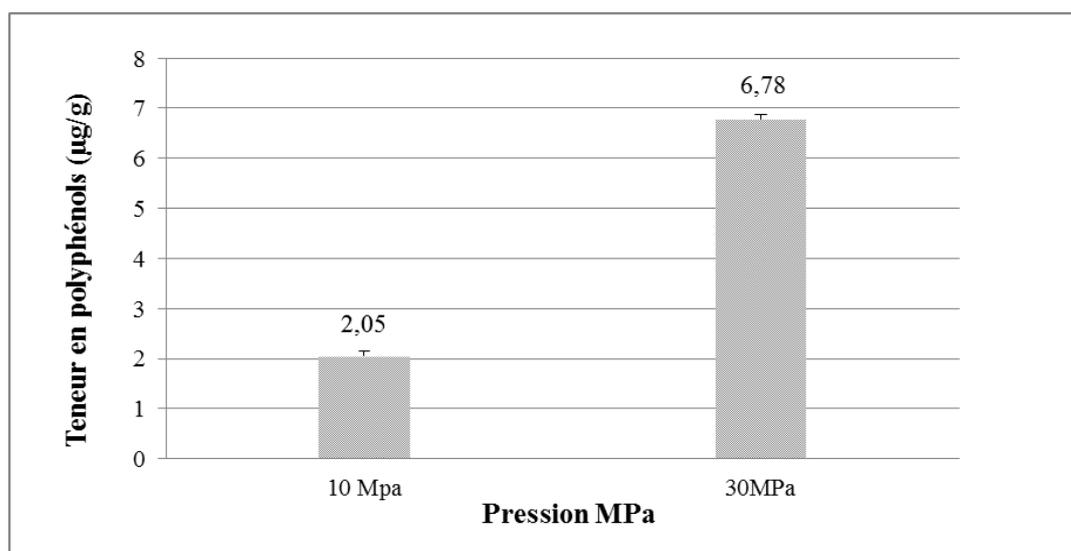


Figure III.37 : Influence de la pression sur la teneur des polyphénols.

Le fluide supercritique le plus utilisé comme solvant est le CO₂ à cause de ses nombreux avantages : abondant, bon marché, inerte, inodore, pas toxique et température et pression critiques relativement basses (31,1 °C et 7,3 MPa) [42]. Le grand inconvénient de l'utilisation du CO₂ comme solvant est qu'il est apolaire et donc non adapté pour l'extraction de composés polaires, ce qui confirme la faible teneur des polyphénols en comparant avec les autres extractions.

Souvent, pour l'extraction de telles substances, l'éthanol est ajouté au CO₂ comme co-solvant. L'eau supercritique a été également utilisée pour extraire des composés polaires [76].

2.2. Analyses des caroténoïdes et des Chlorophylles par spectrophotomètre

Les résultats des concentrations des pigments des parties aériennes de l'espèce *A.mollis* sont présentés dans le tableau III.17.

Les données sont rapportées en tant que moyennes de trois répétitions et exprimées en µg / mg PS (poids sec) ± ET (écart type).

Tableau III.17: Détermination des pigments (Caroténoïdes Totaux, Chlorophylle a et Chlorophylle b)

pigment	Concentration (µg / mg PS ± ET)
Chlorophylle a	0.163 ± 0.0038
Chlorophylle b	0,077 ± 0,0039
Caroténoïdes	0.0261 ± 0.004

Les teneurs en caroténoïdes totaux, chlorophylle **a** (Chl a) et chlorophylle **b** (Chl b) dans la phase organique de l'échantillon des parties aériennes séchées sont indiquées sur la figure III.36. La concentration en **Chl a** était le double de celle de **Chl b**, qui a une importance dans la photosynthèse. Le rapport Chl **a** / **b** était de 2.11, confirmant la teneur élevée en **Chl a** une caractéristique des espèces héliophytes.

Le rapport Chl **a** / **b** est directement lié non seulement à la lumière mais aussi à la disponibilité en azote du sol [77].

Les propriétés biologiques révélées par la chlorophylle et ses dérivés, compatibles avec la prévention du cancer, comprennent une activité antioxydante et antimutagène. De plus, les chlorophylles sont également utilisées dans les industries en tant qu'agents colorants alimentaires et sont connues sous le nom de vert naturel [78].

La teneur totale en caroténoïdes était respectivement un sixième de celle de la chlorophylle **a** (0,0261 à 0,004 $\mu\text{g} / \text{mg}$ et 0,163 à 0,0038 $\mu\text{g} / \text{mg}$, respectivement) (figure III.38).

En général, des teneurs élevées en caroténoïdes sont détectées pour les plantes exposées au soleil, car ces molécules les protègent de la photo-inhibition [79].

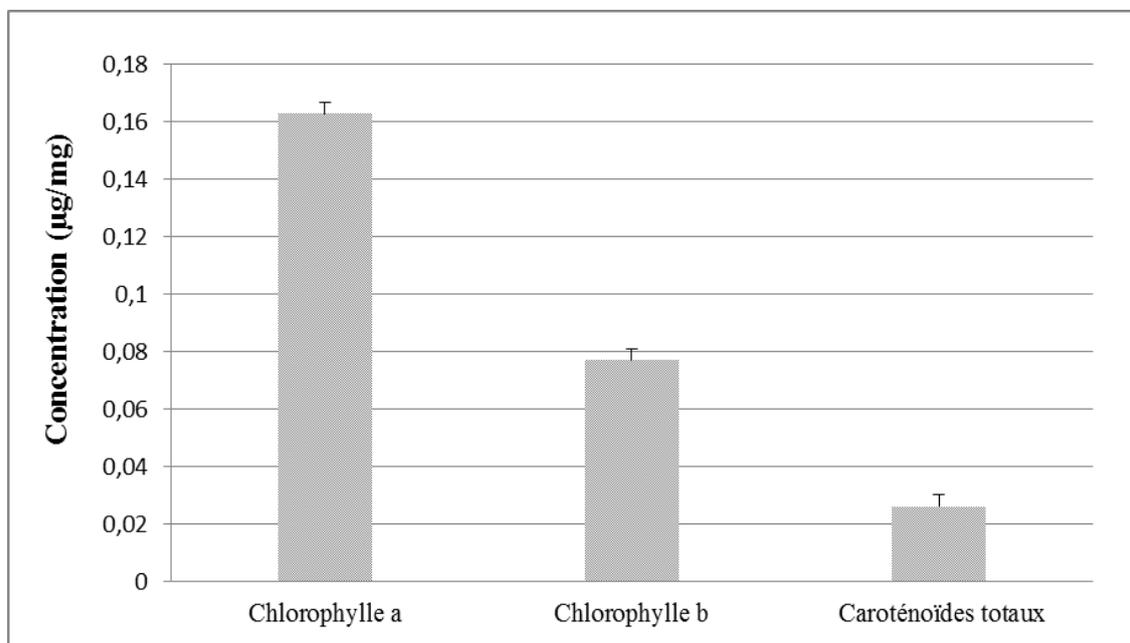


Figure III.38: Teneur en pigments des parties aériennes d'*A. Mollis* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS \pm ET).

Conclusion

Des différentes extractions ont été réalisées sur les parties aériennes de l'espèce *Atriplex mollis* pour le but d'optimiser les paramètres qui peuvent améliorer le rendement de l'extraction.

L'identification et la quantification des composés phénoliques de l'espèce *Atriplex mollis* Desf. a été réalisée par une méthode développée. L'analyse de ces composés a été réalisée par la chromatographie liquide à haute performance couplée avec un détecteur à photodiode.

La plupart des composés identifiés et quantifiés appartenant à trois grandes classes des polyphénols : les flavonoïdes, les monoterpènes et les acides phénoliques, connus pour leurs effets pharmacologiques sur la santé humaine.

Une forte teneur en polyphénols totaux a été détectée au niveau des extraits aqueux (l'eau comme solvant polaire non toxique) obtenus par extraction assistée par micro-ondes, en particulier l'extraction à 80°C pendant 10min. Le principal composé dans cet extrait était la rutine, l'acide vanillique et l'acide t-férulique. Ce qui confirme l'efficacité de la méthode et le bon choix des paramètres.

D'autre part, le rendement en polyphénols de l'extrait obtenu par fluide supercritique est le moins faible. Douze composés ont été qualifiés avec des quantités plus faibles en comparant avec les deux autres méthodes en raison de la nature non polaire du solvant.

L'analyse qualitative et quantitative de cette espèce ainsi que l'analyse des pigments foliaires la rendre une source des composés biologiquement actifs, il serait donc intéressant de mener une enquête détaillée sur les extraits démontrant l'activité pharmacologique, en vue d'identifier l'espèce chimique ou les composés responsables de cette activité.

B. Evaluation de l'activité biologique

1. Etude biologique *in vitro*

1.1. Activité antioxydante

1.1.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des tannins et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de quercétine par g de la matière sèche.

La figure III.39 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes de l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis*.

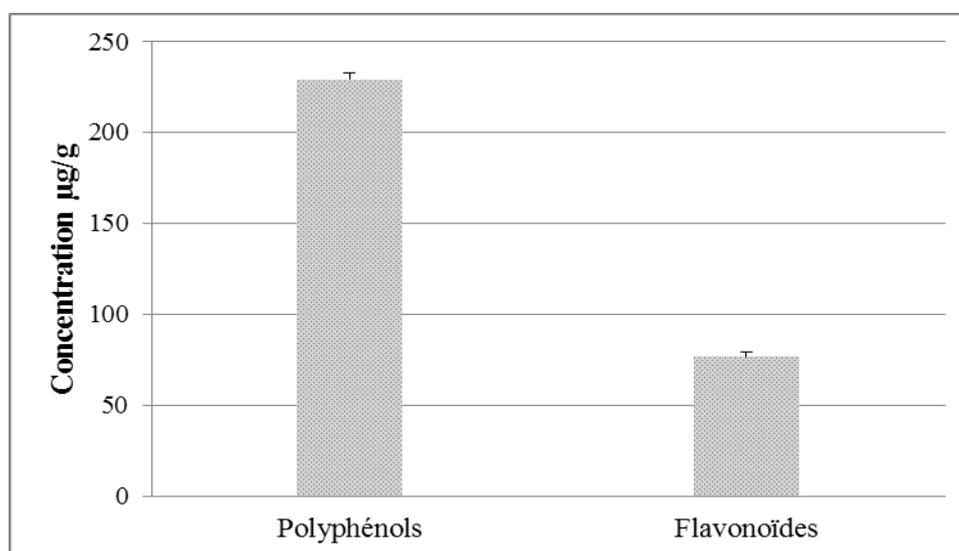


Figure III.39 : Teneur de l'extrait n-BuOH en polyphénols et flavonoïdes totaux.

D'après les résultats, on peut constater que n-BuOH de la plante étudiée, est riche en polyphénols par rapport aux flavonoïdes.

Le dosage de Folin Ciocalteu permet de quantifier globalement les composés phénoliques.

Ce dosage n'est pas spécifique des composés phénoliques. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des substances phénoliques, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Il n'est pas spécifique pour détecter tous les groupes phénoliques présents dans les extraits [80].

Des études récentes ont montrés que plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques, tels que des facteurs géographiques, climatiques, génétiques, ainsi que le degré de maturation de la plante et la durée de stockage [81].

1.1.2. Effet scavenger du radical DPPH

L'extrait butanolique de *Atriplex mollis* (BEAM) a montré une augmentation progressive de l'activité de piégeage des radicaux DPPH d'une manière dépendante de la dose (figure III. 40). Cette augmentation atteint son maximum à 800 µg/ml. Ces résultats ont été comparés avec aux standards de référence à savoir le BHA et le BHT. Selon la valeur IC₅₀, l'effet scavenger des radicaux DPPH était dans l'ordre suivant : BHA: 6.14±0.41µg/ml > BHT: 12.99±0.41 µg/ml > α-Tocopherol : 13.02±5,17 µg/ml > BEAM : 643,41±5,45 µg/ml.

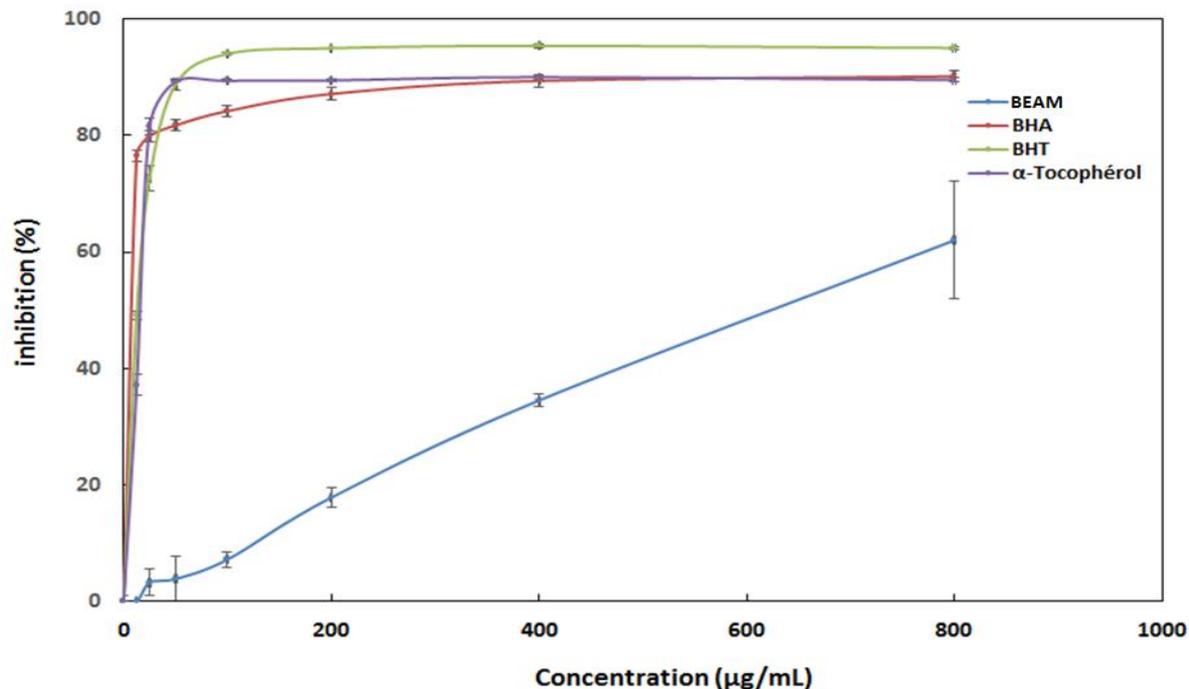


Figure III.40 : Activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Atriplex mollis* (BEAM) et les standards. Les valeurs sont exprimées en en moyenne ± écart type (n=3).

1.1.3. Test de blanchissement du β -carotène

Le test du blanchissement du β -carotène consiste à mesurer la capacité de l'extrait de n-BuOH de l'espèce *Atriplex mollis* (BEAM) à inhiber l'oxydation du β -carotène, qui dépend de l'hydroperoxyde engendré par l'acide linoléique. Le β -carotène est un système modèle qui subit une décoloration rapide en absence d'antioxydant [82].

Les résultats obtenus montrent que l'extrait BEAM a minimisé l'auto-oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes (Figure III.41). Cet effet est prononcé d'une manière claire à 800 $\mu\text{g/ml}$ ($69,86 \pm 0,72 \%$, IC_{50} : $190,81 \pm 3,03$) par rapport aux références standard BHT et BHA ($95,58 \pm 0,19\%$; IC_{50} : $1,05 \pm 0,03$; $99,66 \pm 0,52$; CI_{50} : $0,91 \pm 0,01$ respectivement).

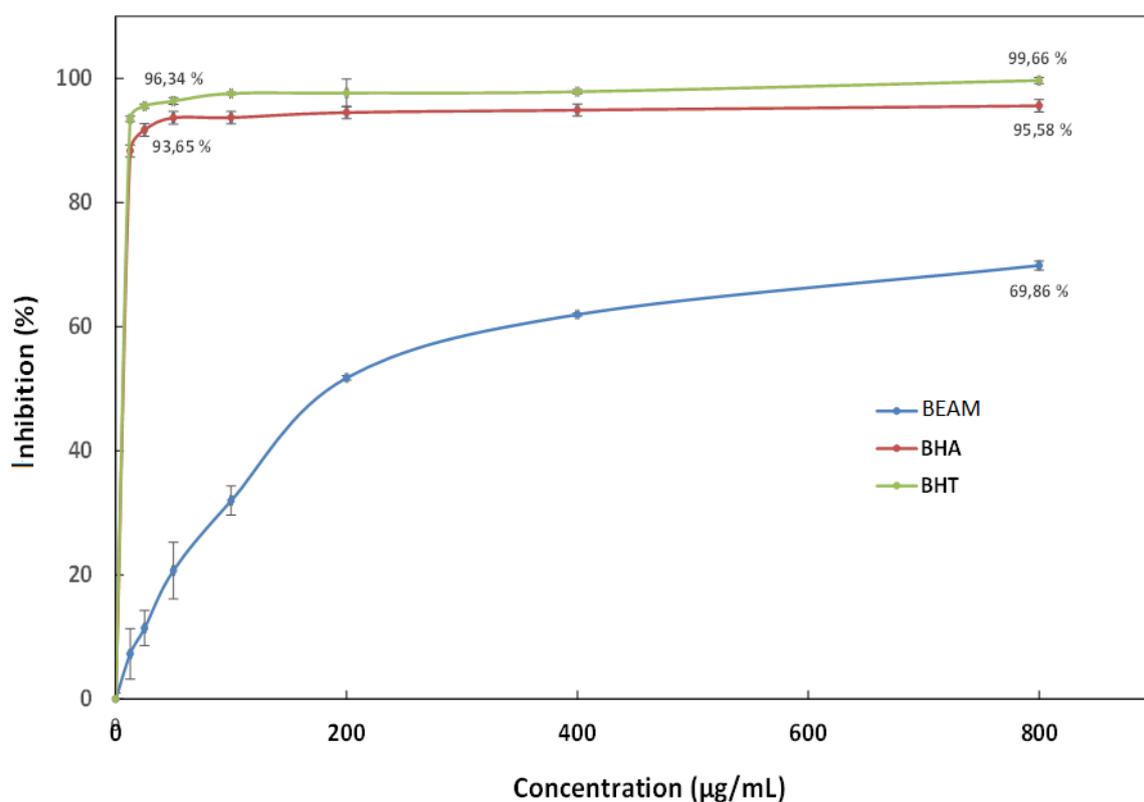


Figure III.41 : l'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait (BEAM). Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

1.2. Activité antibactérienne

Dans cette étude, l'activité antibactérienne de l'extrait n-butanol de *A. mollis* (BEAM) a été évaluée sur la croissance in vitro de quatre souches bactériennes à savoir *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *E. coli*. Le tableau III.18 indique les résultats.

Tableau III.18 : Activité antimicrobienne de l'extrait BEAM à différentes concentrations

Souches bactériennes	0.5 mg/ml	1mg/ml	2 mg/ml	5 mg/ml	10mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8.5	10	12.5	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	11	12	13.5	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	9	9	9.5	11
<i>Escherichia coli</i>	6	6.5	7	7.25	9

Les résultats obtenus permettent de constater que la zone d'inhibition est variée de 6. 5mm à 15mm avec une importante zone d'inhibition.

Par ailleurs on note aussi que l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait corrèle directement avec l'augmentation de la concentration.

Nous avons trouvé que toutes les souches présentent des sensibilités vis-à-vis l'extrait, la souche la plus sensible est *Pseudomonas aeruginosa* qui donnent un diamètre de 15 mm.

D'après l'analyse du profil des polyphénols de l'extrait n-butanol, la rutine est le produit majoritaire détecté avec d'autres flavonoïdes qui possèdent des propriétés antibactériennes, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + [83].

Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité antibactérienne [84,85].

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux : le cycle B jouerait un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques inhibant ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN des microorganismes, ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* [86].

2. Etude biologique *in vivo*

2.1. Activité anti-inflammatoire

Le criblage de l'activité anti-inflammatoire est réalisé par le test à la carragénine. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte du rat un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés [87].

Le choix de l'extrait n-butanol est basé sur la richesse de ce dernier en composants responsables de l'effet anti-inflammatoire tels que les polyphénols et les flavonoïdes.

L'injection de la carragénine 1% au niveau de la patte du rat provoque une inflammation visible (Figure III. 42) dans l'heure qui suit cette injection résulte par la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire [55].

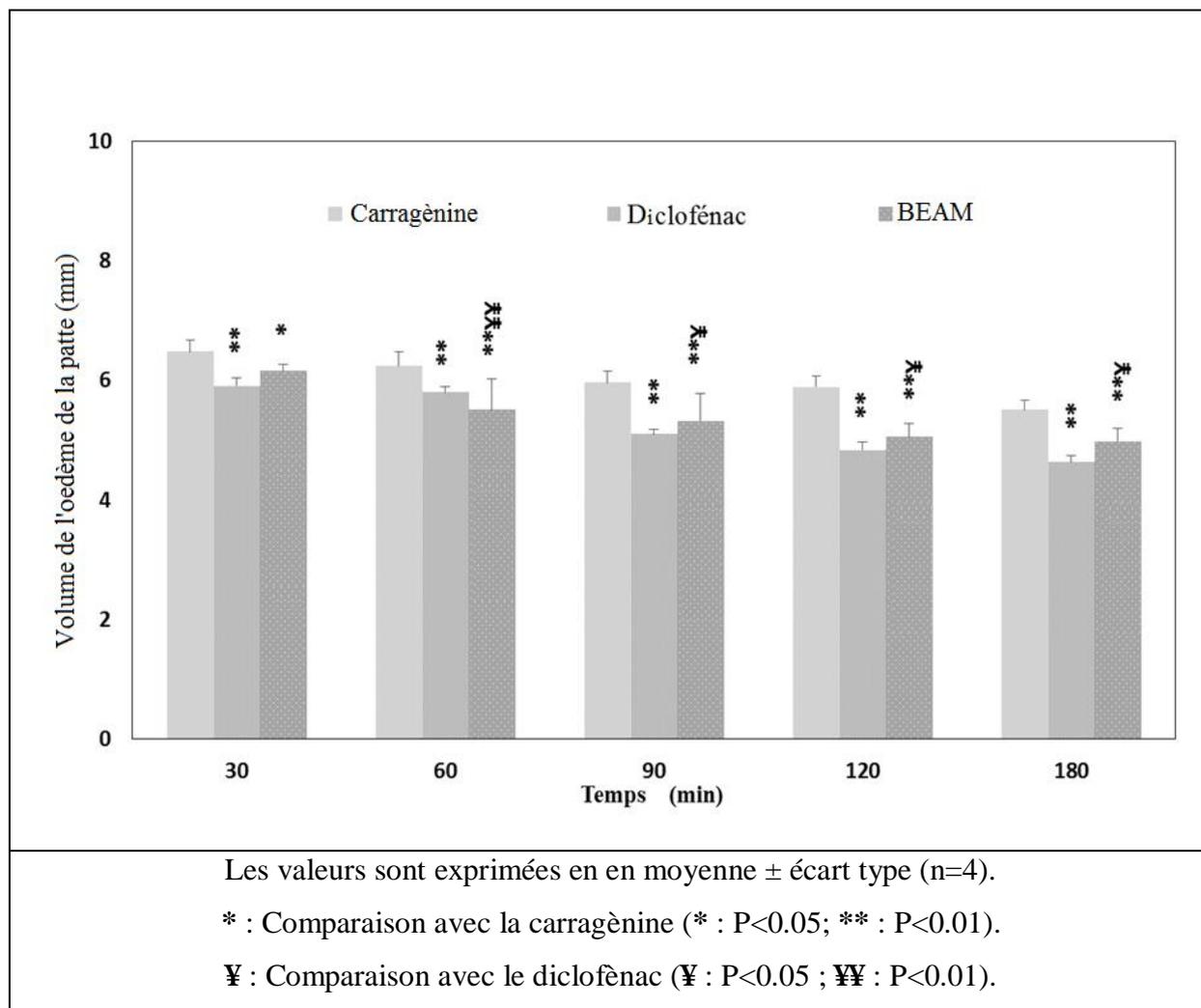


Figure III. 42 : Effets de l'extrait BEAM sur l'œdème de la patte induit par la carragénine 1% chez les rats.

Après une heure d'injection de la carragénine, l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis* s'est révélé plus actif plus précisément à la première heure et a provoqué une diminution de l'œdème de la patte de 6.15 ± 0.11 mm à 5.50 ± 0.52 mm avec un pourcentage d'inhibition égale à 32.76%. Tandis que l'effet du diclofénac est moins important, avec une diminution de l'œdème de 5.90 ± 0.13 mm à 5.80 ± 0.09 mm et un pourcentage d'inhibition égale à 14.41% (Figure III. 43).

De plus, une diminution de l'épaisseur de l'œdème a été observée dans le lot traité avec l'extrait n-butanol après 120 min de l'injection de la carragénine de 5.50 ± 0.52 mm à 4.97 ± 0.21 mm avec un pourcentage d'inhibition maximal égale à 52.83%. De même pour le Diclofénac qui atteint un pourcentage d'inhibition maximal à 180 min égale à 80.99% (Figure III. 43).

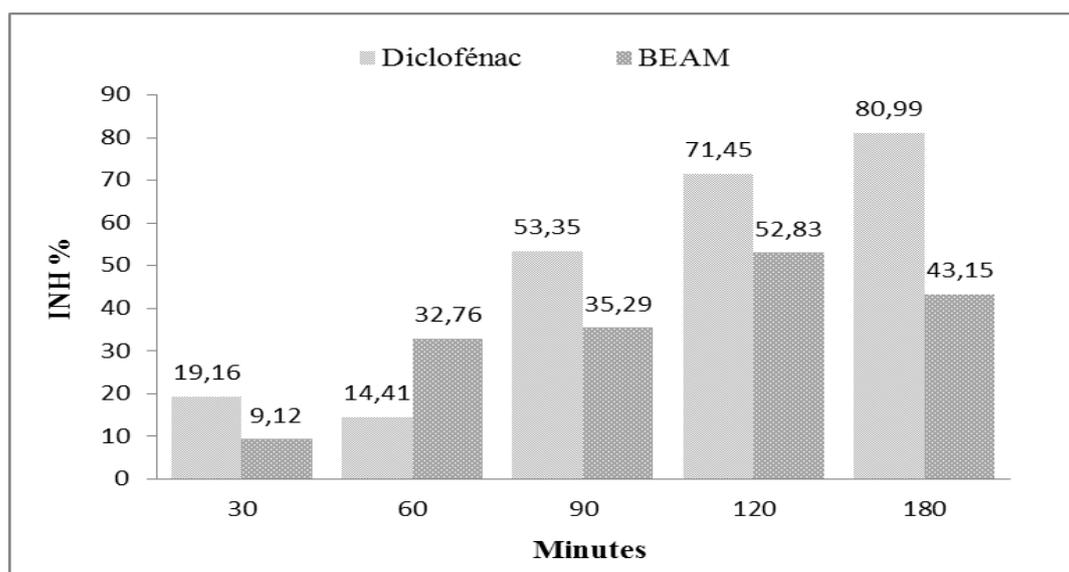


Figure III. 43 : Pourcentage d'inhibition de l'inflammation par l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis* et le Diclofenac.

D'autre part, la pharmacopée concède aux constituants polyphénoliques comme les flavonoïdes et les acides phénoliques une activité anti-inflammatoire [88].

L'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis* pourrait soit :

- ✓ contenir des substances anti inflammatoire non hormonale qui bloquent ou freinent la production des molécules pro-inflammatoire (prostaglandine) ;
- ✓ stimuler les glandes surrénales à produire davantage de cortisone qui exerce un effet anti-inflammatoire ;
- ✓ soit diminuer le taux d'histamines (médiateurs des inflammations) dans le sang (plante antihistaminique).

2.2. Evaluation de l'effet diurétique

2.2.1. Variation de la diurèse en fonction du temps

Les résultats de variations de la diurèse en fonction du temps pour la dose 50 mg/kg par voie d'administrations orale sont représentés sur la figure III. 44 voici quelques remarques générales :

- Les animaux de Témoin 1, qui ne reçoivent aucun produit, ont éliminés un faible volume d'urine soit 6,19 ml/kg pendant quatre heures.
- pour les animaux de témoin 2, recevant 40 ml/kg de l'eau physiologique, le volume d'urine éliminé est relativement considérable 19.44 ml/kg, on peut dire que le maximum de la surcharge sodique administrée est éliminé dès les premières heures.

- comparativement au témoin 2 les animaux du lot traité par HCTZ, le volume d'urine est supérieur à ceux de témoin 2.

-l'administration de l'extrait n-butanol provoque une sécrétion moins faible en comparant à celle du témoin 2 et de l' HCTZ. Dans le cas de notre extrait, l'élimination d'urine par la voie orale s'effectue dans la troisième heure.

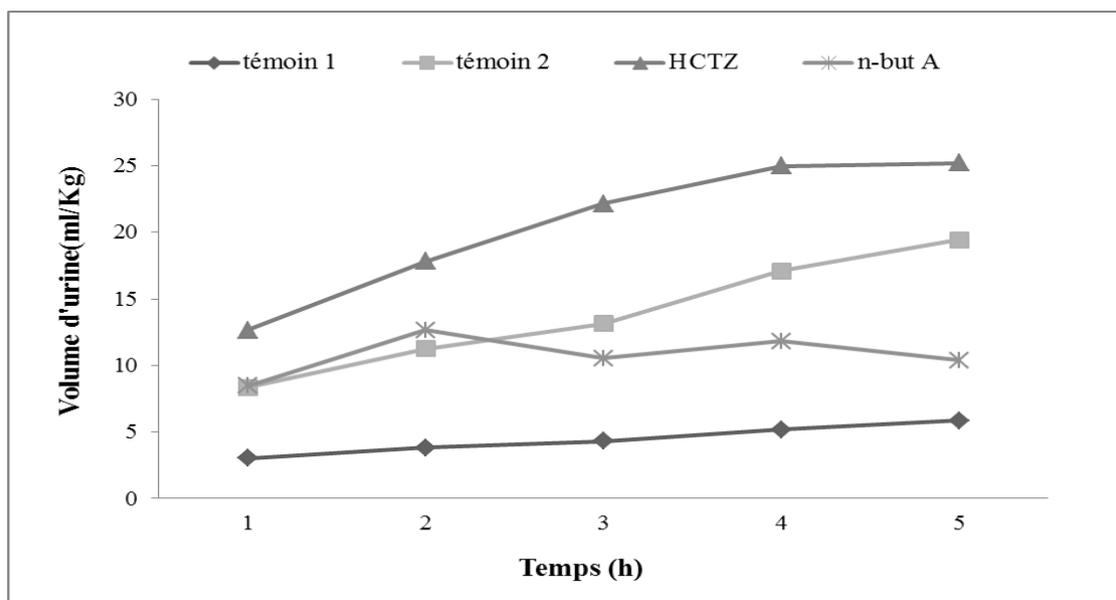


Figure III. 44 : Variation de la diurèse en fonction du temps après administration par voie orale des différents extraits à la dose de 50ml/kg.

2.2.2. Valeurs du pH urinaire

Les valeurs du pH des urines collectées après 5 heures d'administration des différents produits par voie orale sont rapportées sur la figure III.45.

Le pH urinaire pour des témoins ainsi que pour HCTZ est basique, il est compris entre 9.12 et 9.79. Tandis que le pH urinaire de notre extrait est légèrement basique. On remarque seulement une diminution du pH après traitement par l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis*.

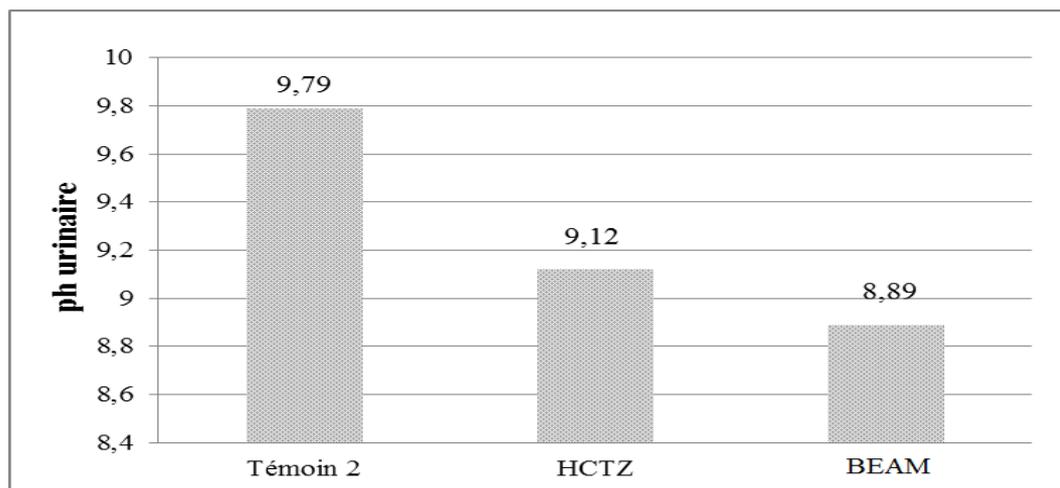


Figure III.45 : Variation du pH urinaire

2.2.3. Variations de la concentration des ions Na^+ urinaires

La figure III. 46 présente les données graphiques de la concentration des ions Na^+ urinaire éliminé en 5 heures après administration des produits par voie orale par la dose 50mg/kg.

La concentration du sodium urinaire éliminée par le témoin 2 qui reçoit 40 mg/kg de l'eau physiologique est de 3.15 mmol/kg pendant 05 heures.

L'effet natriurétique de l' HCTZ avec une concentration de 7.43 mmol/05 heures. Tandis que l'administration de notre extrait a provoqué une élimination de sodium (3.57 mmol/kg pendant 05heures) est similaire de témoin 2 et moins important que celle détecté par l'HCTZ. Ce qui implique que notre extrait ne provoque pas une élimination prononcée du sodium.

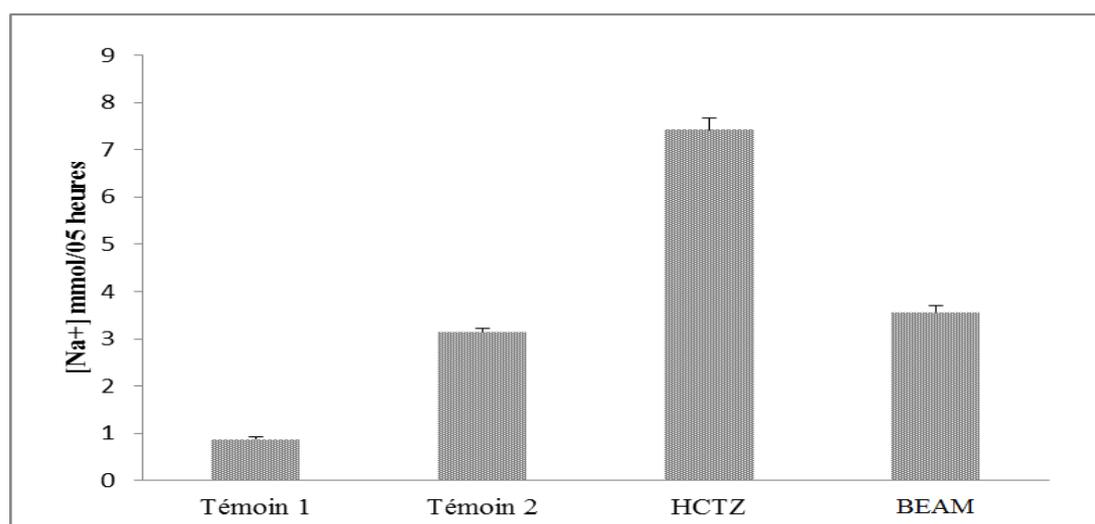


Figure III. 46 : Variations de $[\text{Na}^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

2.2.4. Variations de la concentration des ions K^+ urinaires

La figure III.47 présente les données graphiques de la concentration des ions K^+ urinaire éliminé en 5 heures après administration des produits par voie orale par la dose 50mg/kg.

La concentration de potassium urinaire pour les rats traités par l'hydrochlorothiazide est de 3.41 mmol/kg pendant 05heures.

Concernant notre extrait, l'élimination du potassium est supérieure à celle de l'HCTZ et du témoin 2. Cela présente une hypokaliémie enregistrée lors de l'administration de l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis*.

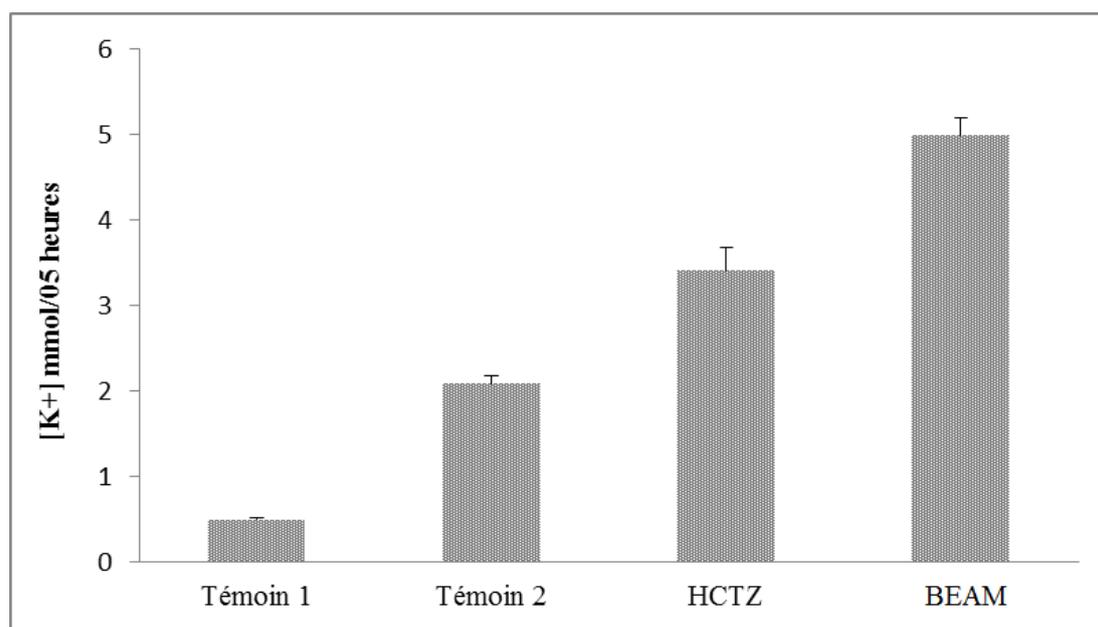


Figure III. 47 : Variations de $[K^+]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en en moyenne \pm écart type (n=3).

2.2.5. Variations de la concentration des ions Ca^{2+} urinaires

Les variations des concentrations du Ca^{2+} urinaire après cinq heures d'un traitement par voie orale des différents produits par la dose 50mg/kg sont rapportées sur la figure III. 48.

L'analyse de ces résultats montre que l'HCTZ ainsi que notre extrait provoquent une élimination calcique semblable à celle observée chez le témoin 2 avec :

- Une augmentation de la concentration urinaire du calcium lors de l'administration de l'HCTZ par la dose de 50mg/kg.
- Une diminution de la concentration urinaire du calcium lors de l'administration de l'extrait n-butanol par la dose de 50mg/kg.

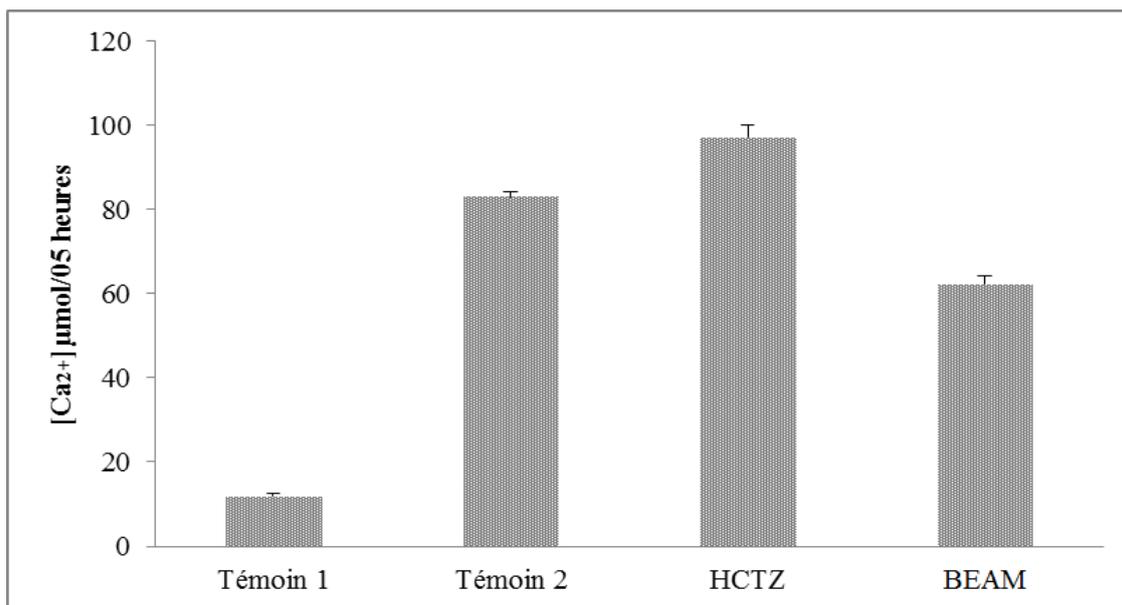


Figure III. 48 : Variations de $[Ca^{+2}]$ urinaire après un traitement par voie orale des différents composés aux doses de 50 mg/kg. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n=3).

Conclusion

Nous avons soumis l'extrait n-BuOH des parties aériennes de l'espèce *A.mollis* à des tests de recherche des activités biologiques : antioxydantes (DPPH, blanchissement du β -carotène), antibactérienne, anti inflammatoire et effet diurétique.

Sur la base des résultats obtenus dans la présente étude, nous concluons que l'extrait n-BuOH d'*A.mollis* possède des propriétés antioxydantes dans tous les modèles d'oxydation (DPPH, blanchissement du β -carotène).

L'activité antibactérienne de l'extrait butanolique a été évaluée sur quatre bactéries par la méthode de diffusion sur disque solide. Quel que soit la souche bactérienne et/ou la nature (origine) des germes utilisées dans ce travail, les présents résultats indiquent la présence d'une légère action antibactérienne.

D'une autre part, l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis* montre une activité anti-inflammatoire considérable après deux heures d'injection de la carragénine, ainsi pour l'effet diurétique qui apparait après deux heures d'administration.

C. Activité anticorrosion

1. Mesure de la perte de masse

Les résultats de la perte de masse de l'acier en milieu HCl 1M en absence et en présence de l'inhibiteur BEAM (l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis*) dans différentes concentrations sont regroupés dans le tableau III.19.

Tableau III.19: L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

Concentration de l'inhibiteur en ppm	La perte de la masse (/cm ²)	IE (%)
0	0.0114
100	0.0091	20.17
200	0.0083	27.19
300	0.0082	28.07
400	0.0080	29.82
500	0.0063	44.73

D'après ces résultats on constate que la concentration de l'inhibiteur influe directement sur l'efficacité inhibitrice (figure III.49).

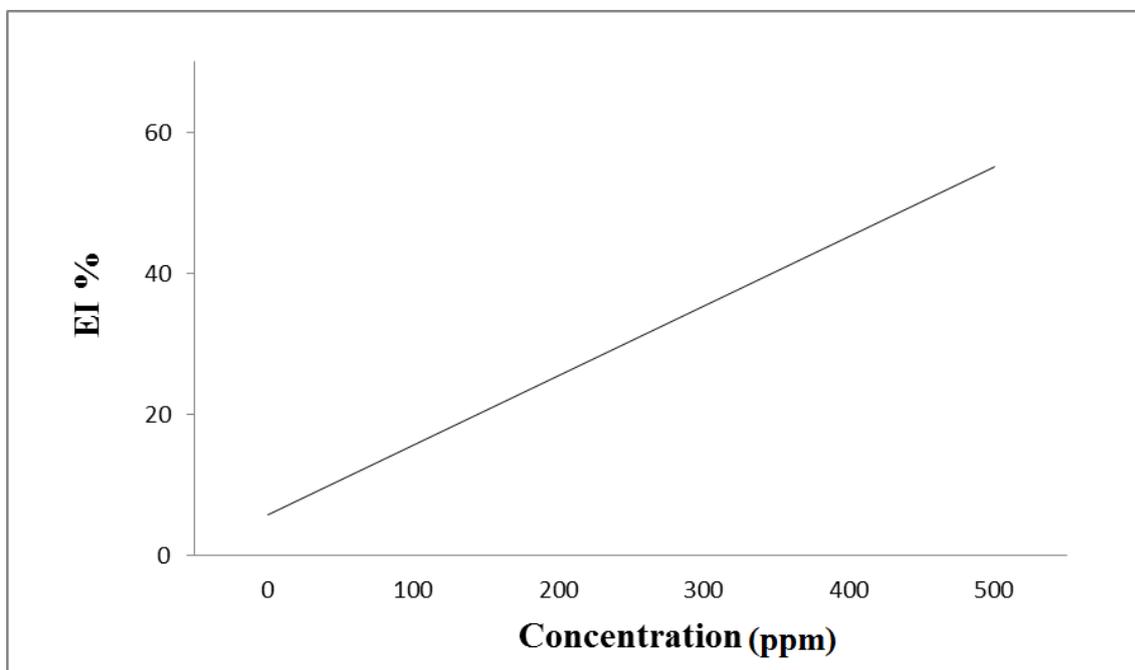


Figure III.49 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentrations de l'inhibiteur (Extrait n-butanol de l'espèce *Atriplex mollis*).

L'évolution de l'efficacité inhibitrice corrèle avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur, elle atteint 44.73% à 500ppm, cela confirme le phénomène d'adsorption sur la surface du métal utilisé [58].

2. Mesures électrochimiques

2.1. La polarisation potentiodynamique

Les courbes de polarisation cathodique et anodique de l'acier en milieu HCl 1M, en absence et en présence de l'extrait n-butanol des parties aériennes de l'espèce *Atriplex mollis* à différentes concentrations sont présentées dans la figure III.50.

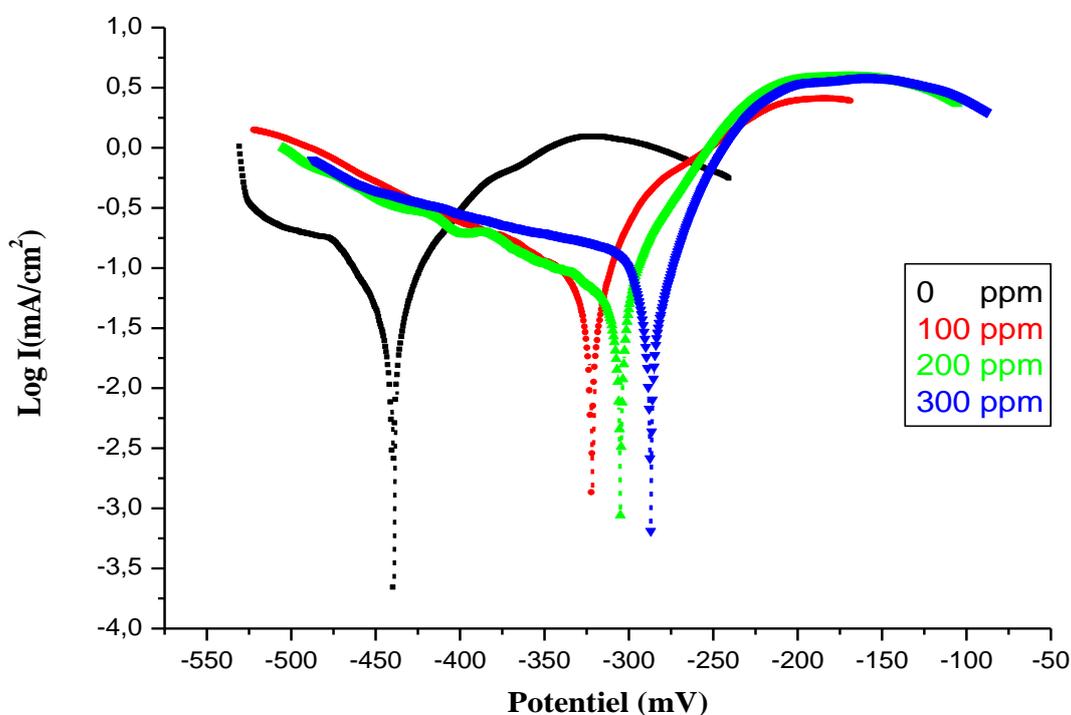


Figure III.50: Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.

Les valeurs associées aux paramètres électrochimiques déterminées à partir de ces courbes ainsi que l'efficacité inhibitrice de la corrosion obtenue sont regroupées dans le tableau III.20.

Tableau III.20 : Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

[conc] ppm	$-E_{\text{corr}}$ (mV)	i_{corr} (mA.cm ²)	β_a (mV)	$-\beta_c$ (mV)	CR (mm.y ⁻¹)	EI (%)
0	438.9	0.1662	123.9	93.4	1.94
100	321.3	0.0618	93.2	138.8	0.723	62.81
200	305	0.0403	50.5	145.6	0.470	75.75
300	287.1	0.0361	42.5	263.6	0.241	78.28

Nous remarquons d'après le tableau III.20 qu'en présence de l'inhibiteur :

-Un déplacement des deux branches anodiques et cathodiques de la courbe de polarisation semble indiquer que cet extrait agit comme un type mixte d'inhibiteur [89, 90].

-L'étude du tableau III.21 a révélé que les valeurs de β_a changeaient en présence d'inhibiteur alors qu'un changement plus prononcé se produisait dans les valeurs de β_c , indiquant que des réactions anodiques et cathodiques étaient effectuées mais que l'effet sur les réactions cathodiques était plus important. Ainsi, l'inhibiteur a agi comme un type mixte, mais principalement un inhibiteur cathodique [91].

-L'addition de l'extrait aqueux au milieu corrosif conduit à une diminution des densités de courant de corrosion au fur et à mesure que la concentration en inhibiteur augmente.

-Les efficacités inhibitrice de cet extrait corrèle avec l'accroissement de la concentration atteint 78.28% à 300ppm.

2.2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Concernant les mesures d'impédance électrochimique, la figure III.51 représente les diagrammes de Nyquist de l'acier doux dans une solution HCl 1M en absence et en présence des molécules inhibitrices de l'extrait n-butanol à différentes concentrations.

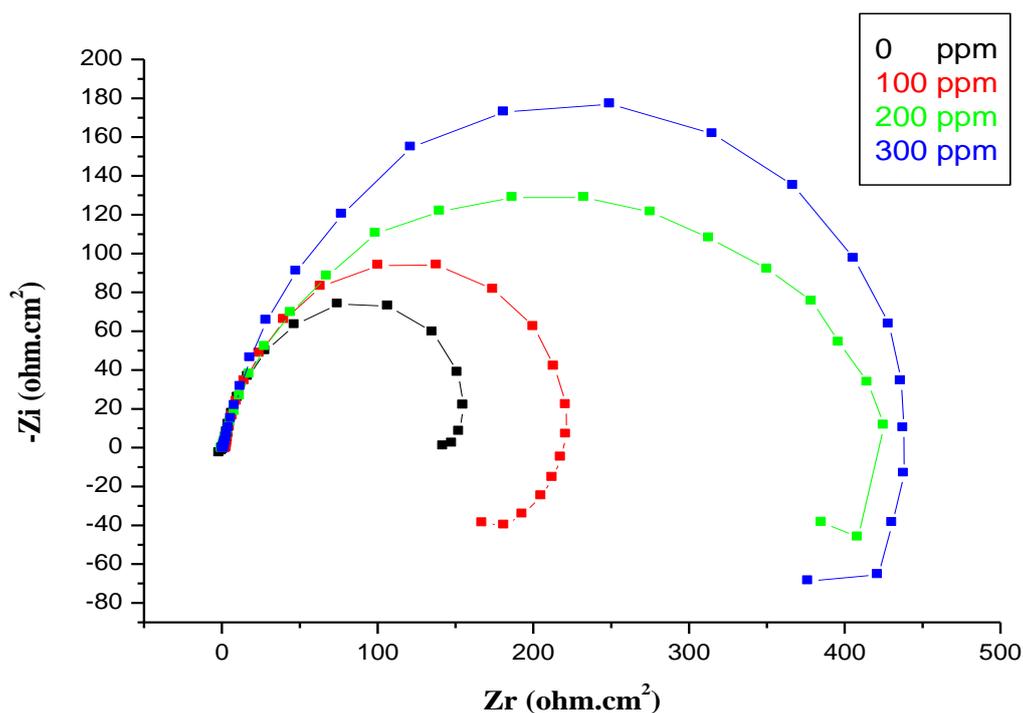


Figure III. 51: Les courbes de Nyquist de l'acier de carbone 316L à différentes concentration de l'inhibiteur.

Le tableau III.21 regroupe les paramètres relatifs aux mesures des impédances électrochimiques de l'acier en milieu HCl 1M avec et sans extrait.

Tableau III.21: Les paramètres d'impédance électrochimique avec l'absence et la présence de l'inhibiteur.

[conc] ppm	C_{dl} ($\mu F.cm^2$)	R_s ($\Omega.cm^2$)	R_{tc} ($\Omega.cm^2$)	EI (%)
0	0.724	156	24.83
100	0.145	15.75	189	86.86
200	3.604	81.53	265.8	90.65
300	3.324	35.83	348.9	92.88

Le comportement à la corrosion de l'acier doux dans une solution de HCl 1,0 M en présence d'inhibiteur a été étudié par EIS après 30 min d'immersion.

Après avoir analysé la forme des diagrammes de Nyquist, on conclut que les courbes approximées par un seul demi-cercle capacitif montrent que le processus de corrosion était

principalement contrôlé par transfert de charge [92]. Le diamètre des courbes de Nyquist (R_{tc}) augmente lorsque la concentration en inhibiteur augmente. Ces résultats suggèrent le comportement d'inhibition de cet extrait sur la corrosion de l'acier 316L dans une solution de HCl 1M.

Le circuit équivalent permettant la bonne description de ces types de spectres d'impédances est donné dans la figure III.52 où l'ensemble constitué d'un élément constant de phase (CPE) en parallèle à une résistante correspondant à une résistance de transfert de charge (R_{tc}), est en série avec une autre résistance de faible valeur correspondant à la résistance d'électrolyte de la solution (R_s).

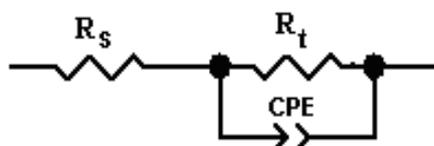


Figure III. 52 : Circuit équivalent utilisé pour déterminer les spectres d'impédance.

Pour cette méthode aussi on constate toujours que l'efficacité inhibitrice augmente avec la concentration de l'inhibiteur et peut atteindre 92.88 % à 300ppm. Ces résultats sont en bon accord avec ceux déterminés à partir des courbes de polarisation.

Conclusion

Le travail réalisé dans cette partie confirme l'attention focalisée sur les propriétés anticorrosives des produits naturels d'origine végétale et l'utilisation d'inhibiteurs verts.

L'étude de l'activité anti-corrosion de l'acier 316L en milieu HCl 1M de l'extrait n-butanol de l'espèce *A.mollis* Desf. a été réalisée par différentes méthodes (perte de masse, courbes de polarisation et mesures de l'impédance électrochimique).

L'efficacité inhibitrice corrèle avec l'accroissement de la concentration et atteint 78.28% à 300ppm.

Les résultats obtenus montrent que cet extrait se comporte comme des inhibiteurs de corrosion mixtes avec une tendance cathodique.

Le pouvoir d'inhibition de la corrosion de cet extrait pourrait être dû à la présence de constituants hétérocycliques notamment les flavonoïdes.

Références bibliographiques

- [1] Juergens U R. Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1.8-cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases. *Drug Res.* 2014; 64: 638–646.
- [2] Chandra G, Murthy S S N. Dielectric and Thermodynamic Study of Camphor and Borneol Enantiomers and their Binary Systems. *Thermochimica Acta.* 2018; 666, 241–252
- [3] Vatanparast J, Andalib-Lari F. Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation. *Neuro Toxicology.* 2017; 60: 299–307.
- [4] Yang H, Woo J, Pae A N, Um M Y, Cho N C, Park K D, Yoon M, Kim J, Lee C J, Cho S. α -Pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABAA-benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.* 2016; 90: 530–539.
- [5] Rivas da Silva P M, Barros de Azevedo D C, Costa C S, Alviano D S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules.* 2012;17: 6305–6316.
- [6] Albuquerque M R J R, Costa S M O, Bandeira P N, Santiago G M P, Andrade- Neto M, Silveira E R, Pessoa O D L. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 2007;79: 209–213.
- [7] Giordani R, Hadeff Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia.* 2008; 79: 199–203.
- [8] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss.et Reut. *The International Journal of Aromatherapy.* 2006; 16: 95–100.
- [9] Bendjabeur S, Benchabane O, Bensouici C, Hazzit M, Baaliouamer A, Bitam A. Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 2018.
- [10] Senatore F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1327-1332.
- [11] Kokkini S et al. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry.*1997;44(5): 883-886.
- [12] Russo M, Galletti G C, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link)): a

preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46:3741-3746.

[13] Thompson J D et al. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *J. Chem. Ecol.* 2003; 29(4): 859-880.

[14] Karousou R, Koureas D N, Kokkini S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry.* 2005; 66: 2668-2673.

[15] Abdel-Moneim A, Abd El-Twab S M, Yousef A I, Abdel Reheim E S, Ashour M B. Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2 diabetes by gallic acid and p-coumaric acid: The role of adipocytokines and PPAR γ . *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018;105:1091–1097

[16] White R. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology.* 1979; 99:410–412.

[17] Dong C Z, Wang W F. Headspace solid-phase micro extraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages. *Anal. Chim. Acta.* 2006; 562: 23-29.

[18] Lino C M, Pena A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chem.* 2010; 121: 503-508.

[19] Pylypiw H M, Grether M T. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *J. Chromatogr. A.* 2000; 883, 299- 304.

[20] Tfouni S A V, Toledo M C F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control.* 2002; 13:117-123.

[21] Wu J G, Wang P J, Chen S C. Antioxidant and antimicrobial effectiveness of catechin-impregnated PVA-starch film on red meat. *Journal of Food Quality.* 2010; 33: 780-801.

[22] Hayouni E A, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry.* 2007; 105(3): 1126-1134.

[23] Ben el Hadj Ali I, Bahri R, Chaouachi M, Boussaïd M, Harzallah-Skhiri F. Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. *Organs. Industrial Crops and Products.* 2014; 62:188-195.

- [24] Clara G, Ana Cristina F, Jesus B, Ana M M, Jose S U, Jose G B, Jose A C, Antonio M F P. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: Comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. 2010; 33:2211-2218.
- [25] Khelifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard J P, Couderc F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. *Molecules*. 2011; 16:10592-10603.
- [26] Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull.* 2017; 42: 226–235.
- [27] Cushnie T P, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2005; 26: 343–356.
- [28] Baranowska M, Suliborska K, Chrzanowski W, Kusznierevicz B, Namieśnik J, Bartoszek A. The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control, *Redox Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.005>.
- [29] Wang Y, Li Z, Li J, Duan Y F, Niu J, Wang J, Huang Z, et al. Effects of dietary chlorogenic acid on growth performance, antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and combined stress of low-salinity and nitrite. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015; 43: 337-345.
- [30] Inoue T, Tsubaki S, Ogawa B, Onishi K, Azuma J I. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. 2010; 123: 542-547.
- [31] Kratchanova M, Pavlova E, Panchev I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrates Polymers*. 2004; 56: 181-185.
- [32] Yeoh, S, Shi J, Langrish T A G. Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination*. 2008; 218: 229-237.
- [33] Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*. 2007; 1: 7-18.
- [34] Dai J, Mumper R J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15: 7313-7352.
- [35] Lucchesi M E, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*. 2007; 79: 1079-1086.

- [36] Ding L, Li Y, Li M J, Liu Z Y, Zhang H Q. A novel microwave-assisted extraction method for extracting flavonoids from Radix and Caulis *Acanthopanax senticosi* [Chinese]. *Chemical Journal of Chinese University*. 2003; 24: 1403-1405.
- [37] Terigar B G, Balasubramanian S, Boldor D, Xu Z, Lima M, Sabliov C M. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 2466-2471.
- [38] Markom M, Hasan M, Daud W, Singh H, Jahim J. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. : Effects of solvents and extraction methods. *Separation Purif. Technol.* 2007; 52: 487-496.
- [39] Iloki-Assanga S B, Lewis-luján L M, Lara-Espinoza C L, Gil-Salido A A, Fernandez-Angulo D, Rubio-Pino J L, Haines D D. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceros* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res. Notes*. 2015; 8: 396.
- [40] Spar Eskilsson S, Bjorklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Torstensson A. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *Journal of Chromatography A*. 1999; 840: 59-70.
- [41] Balachandran V, Parimala K. Vanillin and isovanillin: Comparative vibrational spectroscopic studies, conformational stability and NLO properties by density functional theory calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012; 95:354–368.
- [42] Diaz-Reinoso B, Moure S, Domianguéz H, Parajoa J C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 2441-2469.
- [43] Pereira C G, Meireles M A A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technology*. 2010 ; 3 : 340-372.
- [44] Brack A, Mathis P. La Chimie du vivant : de la protéine à la photosynthèse. *Editions: Le Pommier-Fayard*. 2000; ISBN 2 746 50077 9.
- [45] Ivanov LA, Ivanova L A, Ronzhina D A, Yudina P K. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural. *Russian J. Plant Physiol.* 2013; 60: 812–820.
- [46] Park J Y, Park C M, Kim J J, Noh K H, Cho C W, Song Y S. The protective effect of chlorophyll a against oxidative stress and inflammatory processes in LPS-stimulated macrophages. *Food Sci. Biotechnol.* 2007; 16: 205–211.

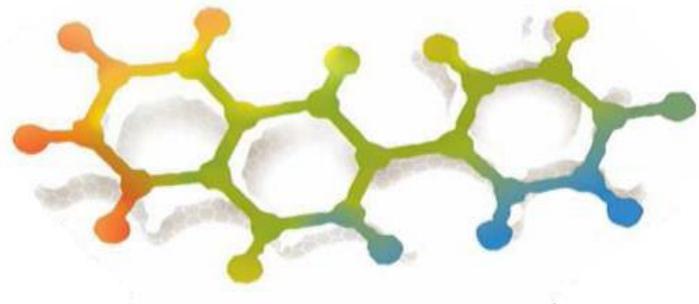
- [47] Atanasov A G, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss E H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products. *Biotechnol. Adv.* 2015; 33: 1582–1614.
- [48] Bammou M, Sellam K, El Rhaffari L , Bouhlali E D T, Daoudi A , Ibjibijen J, Nassiri L. Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss & Dur. Collected from the southeast of Morocco. *European Scientific Journal.* 2015 ;11: 21.
- [49] Tawaha K, Alali F Q, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry.* 2007; 104: 1372-1378.
- [50] Amaroviez R, Pegg R B, Rahimi-Moghaddam P, Bari B, Weile J A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 2004; 84: 551-562.
- [51] Gordon MH. The mechanism of the antioxidant action in vitro. In: *Food antioxidants, Hudson B J F (Ed.). London, Elsevier.* 1990; 1-18.
- [52] Khandelwal KR. Preliminary phytochemical screening in practical pharmacognosy techniques and experiments. 8th ed. *Pune: Nirali Publication.* 2001; 149-156.
- [53] Cushnie T P T, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005; 26: 343–356.
- [54] Winter C A, Risley E A , Nuss G W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Exp Biol Med (Maywood).* 1962; 111: 544.
- [55] Rousselet M C, Vignaud, J M, Hofman P, Chatelet F P. Inflammation et pathologie inflammatoire AFECAP. 2005 ; 1-57.
- [56] Weill B, Batteux F, Dhainaut J. Immunopathologie et réactions inflammatoires. *Eds, De Boeck Université (Paris).* 2003 ; 12-23.
- [57] Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla M V, Sanchez-Campos S. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr.* 2010;104: 15-27.
- [58] Benahmed M, Lafhal M, Djeddi N N, Laouer H, Akkal S. Inhibition of the corrosion of carbon steel in acid solution by the extract of *Limonium thouinii* (Plumbaginaceae). *Advances in Environmental Biology.* 2012; 6(12): 4052-4056.
- [59] Hamdani I, El Ouariachi E, Mokhtari O, Salhi A, Chahboun N, ElMahi B, Bouyanzer A, Zarrouk A, Hammouti B, Costa J. Chemical constituents and corrosion inhibition of mild steel by the essential oil of *Thymus algeriensis* in 1.0 M hydrochloric acid solution. *Der Pharma Chemica,* 2015; 7(8):252-264.

- [60] Chacko S M, Thambi P T, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin Med*; 2010; 5:13–21.
- [61] Naczk M, Amarovicz R, Sullivan A, Shahidi F. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola, a review. *Food Chemistry*. 1998; 62: 489-502.
- [62] Prati S, Baravelli V, Fabbri D , Schwarzinger C, Brandolini V, Maietti A, Tedeschi P, Benvenuti S, Macchia M , Marotti I , Bonetti A , Catizone P, Dinelli G. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *Journal of Separation Science*. 2007 ;30: 491-501.
- [63] Groubert A. Techniques d'extraction végétale: Montpellier, pharmacie. 1984.
- [64] Leybros J, Frémeaux P. Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés. 1990.
- [65] Chemat F, Esveld E. Microwave super-heated boiling of organic liquids: Origin, effect and application. *Chem. Eng. Technol*. 2001; 24:735–744.
- [66] Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 96: 305–312.
- [67] Dulong V, Kouassi M C, Labat B , Le Cerf D , Picton L. Antioxidant properties and bioactivity of Carboxymethyl pullulan grafted with ferulic acid and of their hydrogels obtained by enzymatic reaction. *Food Chemistry*. 2018; 262 : 21–29.
- [68] Majhenic L , Kerget M S, Knez Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 2007; 104: 1258-1268.
- [69] Larrauri J A, Ruperez P, Saura-Calixto F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 44:1390-1393.
- [70] Alessandro L G, Vauchel P, Przybylski R, Chataigné G, Nikov I, Dimitrov K. Integrated process extraction-adsorption for selective recovery of antioxidant phenolics from *Aronia melanocarpa* berries. *Separation and Purification Technology*. 2013; 120: 92-101.
- [71] Azizah A H , Wee K C , Azizah O, Azizah M. Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *International Food Research Journal*. 2009; 16: 45-51.
- [72] Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19:41-44.
- [73] Burton R. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Commun. Mass. Spec*. 1997 ;11 :443–446.

- [74] Ferrante C, Recinella L, Locatelli M, Guglielmi P, Secci D, Leporini L, Chiavaroli A, Leone S, Martinotti S, Brunetti L. Protective effects induced by microwave-assisted aqueous *Harpagophytum* extract on rat cortex synaptosomes challenged with amyloid β -peptide. *Phytother. Res.* 2017; 31 :1257–1264.
- [75] Locatelli M, Ferrante C, Carradori S, Secci D, Leporini L, Chiavaroli A, Leone S, Recinella L, Orlando G, Martinotti S. Optimization of aqueous extraction and biological activity of *Harpagophytum procumbens* root on ex vivo rat colon inflammatory model. *Phytother. Res.* 2017; 31:937–944.
- [76] Henry M C, Yonker C R. Supercritical fluid chromatography, pressurized liquid extraction, and supercritical fluid extraction. *Analytical Chemistry.* 2006; 78: 3909–3916.
- [77] Ivanov L A, Ivanova L A, Ronzhina D A, Yudina P K. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural. *Russ. J. Plant Physiol.* 2013; 60: 812–820.
- [78] Solymosi K, Mysliwa-Kurdziel B. Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2017; 17:1194–1222.
- [79] Sobolev A P, Mannina L, Capitani D, Sanzò G, Ingallina C, Botta B, Fornarini S, Crestoni M E, Chiavarino B, Carradori S, Locatelli M. A multi-methodological approach in the study of Italian PDO “Cornetto di Pontecorvo” red sweet pepper. *Food Chem.* 2018; 255 :120–131.
- [80] Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. *Editions Dunod, Paris.* 1968; 254.
- [81] Aktumsek A, Zengin G, Guler G O, Cakmak Y S, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food and Chemical Toxicology.* 2013; 55:290–296.
- [82] Marco G J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1968; 45:594–598
- [83] Basile A, Giordano S, Lopez-Saez J A, Cobianchi R C. *Phytochemistry.* 1999; 52: 1479-1482.
- [84] Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 673-839.
- [85] Ksouri R , Megdiche W, Debez A, Falleh H , Grignon C , Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidantactivities in leaves of the halophyte *Cakile maritima.* *Plant.Physiol Bioch.* 2007; 45: 244-249.

- [86] Wu T, Zang X, He M, Pan S. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of food chemistry*. 2013; 61(34): 8185-8190.
- [87] Morris C J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biomol.* 2003; 225:115-121.
- [88] Mansour S, Djebli N, Ozkan E E, Mat A. In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7(Suppl 1): 514-520.
- [89] O.L. Riggs, Jr Corrosion inhibitors, 2nd ed. C.C. Nathan, Houston, TX, 1973.
- [90] A.K. Singh, M.A. Quraishi, *Corros. Sci.* 2010; 52, 1529.
- [91] K.F. Khaled, N. Hackerman, *Electrochim Acta* 2003; 48, 2715.
- [92] Rosliza R, Wan Nik W B, Senin H B. *Chem. Phys.* 2008; 107, 281.

CONCLUSION



Conclusion générale

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs, et restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement où environ 40 % des médicaments sont dérivés de la nature.

L'objectif de ce travail consistait à la caractérisation phytochimique, l'évaluation des activités biologiques et détermination de l'activité anticorrosion des extraits n-butanol de deux plantes médicinales algériennes (*Thymus algeriensis* et *Atriplex mollis*).

Ce travail visait ainsi sur le choix d'une source riche en principes actifs, la valorisation des co-produits de cette source, la mise au point et l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction de composés phénoliques en utilisant des différentes techniques.

L'extraction assistée par micro-ondes a montré son efficacité pour l'extraction de composés phénoliques à partir des deux espèces. L'étude des effets des principaux paramètres opératoires a permis d'identifier les paramètres les plus influents sur l'extraction. Les effets positifs de la température, de la nature du solvant et de la durée observée lors de l'extraction à partir des parties aériennes des deux espèces étudiées.

Qualitativement, les analyses effectuées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont montré, la présence d'une multitude de variété de composés. Le polymorphisme des composés des huiles de *T. algeriensis* analysés (caractérisées par le 1,8 cinéol, camphre et α -pinène).

Afin de mieux caractériser les deux espèces nous avons réalisés une chromatographie en phase liquide à haute performance avec un détecteur UV à photodiodes pour les extraits polaires.

Le principal composé présent dans les extraits aqueux de l'espèce *T.algeriensis* était l'acide benzoïque, l'épicatéchine, l'acide chlorogénique, l'acide syringique, la naringine, la catéchine et l'acide o-coumarique qui sont dotés d'importantes activités biologiques.

La rutine était le produit principal détecté dans l'extrait aqueux d'*Atriplex mollis*, avec d'autres composés moins abondants tels que : l'acide p-hydroxybenzoïque, acide sinapinique, acide p-coumarique, acide vanillique et l'acide t-férulique.

Concernant le taux des polyphénols et l'activité antioxydante des différents extraits des deux espèces étudiées, nous avons utilisé les tests de Folin Ciocalteu, le test au DPPH, le test de blanchissement du β -carotène.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur quatre germes à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus ont montré que les extraits n-butanol des deux espèces manifestent une activité antibactérienne contre un certain nombre de bactéries.

Les mécanismes d'action de chaque composé phénolique contre diverses bactéries sont très compliqués, il serait donc nécessaire d'étudier plus loin et de comprendre le rapport entre l'activité antibactérienne et anti-oxydante et la structure chimique du composé phénolique dans les extraits examinés.

Les extraits butanoliques des deux espèces étudiées ont manifesté une bonne activité anti-inflammatoire et un effet diurétique acceptable.

En outre, l'évaluation du pouvoir inhibiteur de corrosion de ces extraits a été réalisée en utilisant trois différentes méthodes : La perte de la masse, La polarisation potentiodynamique et la spectroscopie d'impédance électrochimique.

Les deux extraits de *T.algeriensis* et *A.mollis* ont montré une activité anticorrosion importante.

RESUME

Ce travail vise la valorisation de deux plantes médicinales algériennes (*T.algeriensis* et *A.mollis*) de la famille des Lamiaceae et Chenopodiaceae réputées pour leurs vertus thérapeutiques.

L'objectif de ce travail consistait sur la mise au point et l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction de composés phénoliques en utilisant des différentes techniques.

L'analyse GC-FID et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus algeriensis* a montré que cette huile est majoritairement composée de 1,8-cinéole (25.12%), camphre (18.33%) et le α -pinène (8.29%) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : camphène (5.16%), bornéol (5.07%), acétate de bornyl (3.38%), caryophyllène oxide (3.15%) et le linalol (2.14 %).

L'extraction assistée par micro-ondes a montré son efficacité pour l'extraction de composés phénoliques à partir des deux espèces.

Les extraits aqueux obtenus par cette extraction à partir des parties aériennes des deux espèces ont été analysés. L' HPLC a révélé la richesse des extraits MAE en polyphénols allant de 2508.85 à 11000.12 $\mu\text{g/g}$ PS pour *T.algeriensis* et de 558.17 à 832.56 $\mu\text{g/g}$ PS pour *A.mollis*.

L'analyse de la composition phénolique des extraits n-butanol obtenus à partir des parties aériennes des deux espèces par HPLC, ainsi que la détermination des effets antioxydants, antibactériens par les méthodes DPPH, blanchissement du β -carotène et la diffusion sur gélose respectivement montre une richesse des extraits éthanoliques en composés phénoliques. Ces composés sont les principaux responsables de l'activité antioxydante remarquable observée dans les essais. Les extraits ont révélé une bonne activité antibactérienne.

On outre, ces extraits ont manifesté aussi une excellente activité anti-inflammatoire et un effet diurétique acceptable.

Enfin, l'étude électrochimique en utilisant trois différentes méthodes (La perte de la masse, La polarisation potentiodynamique, La spectroscopie d'impédance électrochimique) a permis de confirmer l'activité anticorrosion des extraits butanoliques des deux espèces étudiées.

Mots clés : *Thymus algeriensis*, *Atriplex mollis*, HPLC-PDA, polyphénols, activité biologique, activité anticorrosion.

Abstract

In order to contribute to the valorisation of local medicinal plants, we were interested in two medicinal plants (*Thymus algeriensis* and *Atriplex mollis*) of the Lamiaceae and Chenopodiaceae family that very common in traditional medicine.

The objective of this work was to develop and optimize the operating conditions for the extraction of phenolic compounds using different techniques.

The GC-FID and GC / MS analysis of the essential oil of the aerial parts of *Thymus algeriensis* showed that this oil is predominantly composed of 1,8-cineole (25.12%), camphor (18.33%) and α -pinene (8.29%) accompanied by other components at relatively low levels: camphene (5.16%), borneol (5.07%), bornyl acetate (3.38%), caryophyllene oxide (3.15%) and linalool (2.14%).

Microwave-assisted extraction has proved effective in extracting phenolic compounds from the species studied.

The aqueous extracts obtained by this extraction from the aerial parts of the two species were analyzed. HPLC revealed the richness of MAE extracts in polyphenols ranging from 2508.85 to 11000.12 $\mu\text{g} / \text{g PS}$ for *T.algeriensis* and from 558.17 to 832.56 $\mu\text{g} / \text{g PS}$ for *A.mollis*.

The analysis of the phenolic composition of the n-butanol extracts obtained from the aerial parts of the two species by HPLC, as well as the determination of the antioxidant, antibacterial effects by the DPPH methods, β -carotene bleaching and the agar diffusion respectively, shows a wealth of ethanolic extracts of phenolic compounds. These compounds are primarily responsible for the remarkable antioxidant activity observed in the tests. The extracts revealed good antibacterial activity.

These extracts also showed excellent anti-inflammatory activity and an acceptable diuretic effect.

Finally, the electrochemical study using three different methods (mass loss, potentiodynamic polarization, electrochemical impedance spectroscopy) has confirmed the anticorrosion activity of the butanolic extracts of the two studied species.

Key words: *Thymus algeriensis*, *Atriplex mollis*, HPLC-PDA, polyphenols, biological activity, anticorrosion activity.

ملخص

في إطار المساهمة قصد تهمين النباتات الطبية المحلية والمعروفة بخصائصها العلاجية، انصب اهتمامنا باثنان من النباتات من عائلتين مختلفتين (*Lamiaceae, Chenopodiaceae*)، نظرا لسعة انتشارها في الجزائر وكثرة تداولها في الطب الشعبي.

الهدف من هذا العمل هو تطوير وتحسين شروط و ظروف استخراج المركبات الفينولية باستخدام تقنيات مختلفة. كما قمنا في هذا العمل، بتحليل التراكيب الكيميائية للزيوت الاروماتية، التي تم الحصول عليها من الأزهار والأجزاء الهوائية لنبات *Thymus algeriensis* باستعمال تقنية كروماتوغرافية الطور الغازي GC-FID المدمج بالمطيافية الكتلية GC/MS. هذا الزيت يتكون اساسا من : α -pinène (8.29%) ، 1.8- cinéol (25.12%) ، camphre (18.33%) ، مصحوبة بمكونات أخرى منخفضة نسبياً: acétate de bornyl (3.38%) ، bornéol (5.07%) ، camphéne (5.16%) ، linanol (2.14%) ، caryophylléne oxide (3.15%) ،

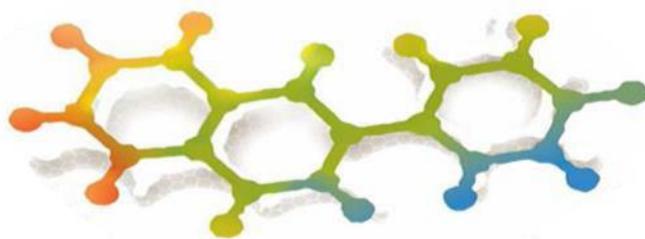
ثبتت عملية الاستخراج بتقنية المايكرووفيف فعالية في استخراج واستخلاص المركبات الفينولية لكلا النباتين المدروستين. تم تحليل المستخلصات المائية التي تم استخلاصها بتقنية HPLC-PDA. كشفت هذه التحاليل عن ثراء المستخلصات بالمركبات الفينولية المعروفة بخصائصها الطبية والتي تتراوح بين 2508.85 الى 11000.12 ميكروغرام/غرام من المادة الصلبة بالنسبة للنبته *Thymus algeriensis* ومن 558.17 الى 832.56 ميكروغرام/غرام من المادة الصلبة بالنسبة للنبته *Atriplex mollis*.

لقد انجزنا في هذا العمل ايضا وللمرة الاولى تحليل كمي وكيفي باستعمال تقنية كروماتوغرافية السائلة ذات الضغط العالي HPLC للمستخلصات الفينولية لمختلف الاجزاء الهوائية لكلا النباتين. كما قمنا بدراسة الفعالية ضد الاكسدة وضد الميكروبات باستخدام اختبارات : DPPH و تبييض الكاروتين والانتشار على الاجار على التوالي لمستخلصات البوتانول. حيث اظهرت التحاليل ان هذه المستخلصات تعد مصدر غني بالمركبات الفينولية المسؤولة عن النشاط المضاد للاكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا المتحصل عليه.

كما أظهرت هذه المستخلصات نشاطاً ممتازاً مضاداً للالتهابات وتأثيراً مقبولاً لادرار البول. وأخيراً ، أكدت الدراسة الكهروكيميائية باستخدام ثلاث طرق مختلفة (فقدان الكتلة ، الاستقطاب الفعال ، التحليل الطيفي الكهروكيميائي للمقاومة الكهروكيميائية) النشاط المضاد للفعال للتآكل لمستخلصات البوتانول للنبتين المدروستين.

الكلمات المفتاحية : *Thymus algeriensis, Atriplex mollis, HPLC-PDA* , البوليفينولات, النشاط البيولوجي, النشاط المقاوم للتآكل.

Articles



Article

Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Different Extracts from *Thymus algeriensis* Aerial Parts

Nassima Boutaoui ¹, Lahcene Zaiter ¹, Fadila Benayache ¹, Samir Benayache ¹, Simone Carradori ^{2,*}, Stefania Cesa ³, Anna Maria Giusti ⁴, Cristina Campestre ², Luigi Menghini ², Denise Innosa ⁵ and Marcello Locatelli ²

¹ Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie; boutaoui.nassima@gmail.com (N.B.); lahcene.zaiter@yahoo.fr (L.Z.); fbenayache@yahoo.fr (F.B.); sbenayache@yahoo.com (S.B.)

² Department of Pharmacy, University "G. d'Annunzio" of Chieti-Pescara, Via dei Vestini 31, 66100 Chieti, Italy; cristina.campestre@unich.it (C.C.); luigi.menghini@unich.it (L.M.); marcello.locatelli@unich.it (M.L.)

³ Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy; stefania.cesa@uniroma1.it (S.C.)

⁴ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy; annamaria.giusti@uniroma1.it (A.M.G.)

⁵ Facoltà di Bioscienze e tecnologie agro-alimentari e ambientali, Università di Teramo, Via Renato Balzarini 1, 64100 Teramo, Italy; dinnosa@unite.it

* Correspondence: simone.carradori@unich.it; Tel./Fax: +39-0871-3554-583

Received: 15 January 2018; Accepted: 17 February 2018; Published: 20 February 2018

Abstract: This study was performed to evaluate the metabolite recovery from different extraction methods applied to *Thymus algeriensis* aerial parts. A high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detector with gradient elution has been developed and validated for the simultaneous estimation of different phenolic compounds in the extracts and in their corresponding purified fractions. The experimental results show that microwave-assisted aqueous extraction for 15 min at 100 °C gave the most phenolics-enriched extract, reducing extraction time without degradation effects on bioactives. Sixteen compounds were identified in this extract, 11 phenolic compounds and five flavonoids, all known for their biological activities. Color analysis and determination of chlorophylls and carotenoids implemented the knowledge of the chemical profile of this plant.

Keywords: color analysis; pigments; MAE; HPLC-PDA; SFE; *Thymus algeriensis*

1. Introduction

The genus *Thymus* belongs to the Lamiaceae family, which comprises about 400 genera. They are mainly herbaceous, perennials, small shrubs occurring within the Mediterranean region, which is the center of the entire genus, and are also characteristic in Asia, Southern Europe and North Africa [1]. Historically, the aerial parts of *Thymus* species, rich in volatile constituents, have been commonly used as herbal teas, condiments and spices. In addition, they have shown many ethnomedicinal properties such as tonic, carminative, digestive, antispasmodic, antimicrobial, antioxidant, antiviral, and anti-inflammatory activities [2]. *Thymus* leaves extracts, despite their frequent use as spice and infusions, are used in traditional medicine as astringent, expectorant, antiseptic, anti-rheumatic, diuretic, analgesic and cicatrizing agents. Thyme can also be used as a phytotherapy agent in

veterinary (antispasmodic, antiseptic and digestive); it is applied as feed additives and for treating diseases of pets and farm animals [3,4].

Thymus algeriensis Boiss. & Reut. (*Thymus hirtus* Willd. ssp. *algeriensis*) is the most widespread North African species. It is endemic in Libya, Tunisia, Algeria and Morocco. *T. algeriensis* is largely used, fresh or dried, mainly as a culinary herb. On the other hand, the species is used in traditional medicine in respiratory disorders, against illnesses of the digestive tube and as anti-abortive [5–8]. The chemical composition of its essential oil has been previously studied with an exclusive attention to the volatile components, although results of its biological activity are limited [9–12].

Due to the growing interest in the characterization of endemic plants in pharmaceutical, cosmetic and food industry and as a part of our continuing investigation seeking new ways to enhance the recovery of bioactive substances, different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts were obtained by classical maceration, microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction, and compared by means of their phenolic content by a validated quantitative and analytical high performance liquid chromatography (HPLC-PDA) method. To the best of our knowledge this is the first attempt to characterize this plant species for the presence of these compounds which are well known to exert modulatory effects on biological systems.

To approach this issue, we decided to study the ability of three different extraction techniques on the recovery of the most abundant phenolic secondary metabolites according to an HPLC-PDA method validated in our laboratory [13]. After each extraction, some parameters were optimized in order to improve the phenolic pattern profile in terms of recovery and amount of each constituent. Hydroalcoholic extraction was then performed and compared with supercritical fluid (SFE) and microwave-assisted (MAE) extractions in terms of yield and recovery. In particular, the application of microwaves for heating the solvents and plant tissues in extraction process is known to increase the kinetic of extraction, to reduce extraction time and solvent waste, to promote higher extraction rate and to save costs compared to classical methods [14].

Moreover, SFE furnishes some operational advantages since it works with supercritical solvents with different physicochemical properties such as graduable density, relatively high diffusivity and low viscosity, thereby providing enhanced transport properties and faster extraction rates by means of an easy diffusion through solid materials [15].

To gain an efficient and adequate metabolite recovery, a crucial control and successive optimization of each parameter is necessary. Initially, in our experiments (MAE and SFE) we aimed at limiting thermal degradation phenomena setting the temperature at 40 °C. Then, we modified pressure for SFE, in order to modify the density of the supercritical fluid, and temperature for MAE, to study the impact on phenolic recovery.

Successively, in order to improve the chemical composition knowledge of this plant, the aerial parts were further characterized by color analysis using a device-independent color space (CIELAB parameters) as defined by the "Commission Internationale de l'Eclairage" and specific pigments (carotenoids and chlorophylls) pattern. This comprehensive phytochemical profile could be used to better corroborate the traditional use of this plant.

2. Experimental Section

2.1. Materials

Chemical standards: gallic acid, catechin, caffeic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxy-benzoic acid, vanillic acid, epicatechin, syringic acid, 3-hydroxy-benzoic acid, isovanillin, *p*-coumaric acid, rutin, sinapinic acid, *t*-ferulic acid, naringin, 2,3-dimethoxy-benzoic acid, benzoic acid, *o*-coumaric acid, quercetin, *t*-cinnamic acid, naringenin, carvacrol, harpagoside (all purity >98%) were purchased by Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Methanol, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol (HPLC-grade), acetic acid (99%), acetonitrile (HPLC-grade) were obtained from Carlo Erba Reagenti (Milan, Italy). Double-distilled water was obtained using a Millipore Milli-Q Plus water treatment system (Millipore Bedford Corp., Bedford, MA, USA). All extractions were monitored by thin layer chromatography (TLC) performed on 0.2 mm thick silica gel plates (60 F254 Merck) and the spots were detected under

an ultraviolet (UV) lamp (at 254 and 365 nm). Column chromatography was carried out using Sigma-Aldrich silica gel (high purity grade, pore size 60 Å, 200–425 mesh particle size).

2.2. Plant Material

Samples of full bloom plants were collected from wild population in M'Sila region (Coordinates: 35°42'N 4°33'E), Algeria, in May 2016 and identified by Professor Mohamed Kaabeche (Biology Department, University of Setif 1, Algeria). A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University Frères Mentouri Constantine 1. Aerial parts were manually separated, dried at controlled temperature (40 ± 1 °C) in the dark until constant weight. Then plant material was powdered to a uniform granulometry and stored in the dark at -20 °C, in vacuum bags, until extractions and further phytochemical analyses.

3. Extraction Procedures

3.1. Hydroalcoholic Extraction and Fractionation

The air-dried aerial parts (leaves and flowers, 2.0 kg) of *T. algeriensis* were powdered (slight grinding at controlled temperature, up to 35 °C) and macerated at room temperature with EtOH–H₂O 70:30, (*v/v*) (15 L) for 24 h, four times with fresh solvent. After a filtration step, the extracts were combined, concentrated under reduced pressure, diluted in H₂O (800 mL) under magnetic stirring and maintained at 4 °C overnight to precipitate chlorophylls. After a second filtration step, the resulting solution was extracted with solvents with increasing polarities (chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol). Each extract was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered over Chromafil® PET 20/25 (0.2 µm pore size, Machery-Nagel AG, Oensingen, Switzerland) into brown glass vials and concentrated under vacuum (up to 35 °C) to yield the following extracts: CHCl₃ (7.42 g), EtOAc (4.19 g), *n*-BuOH (33.15 g).

The chloroform extract was further fractionated by column chromatography (on silica gel; cyclohexane/diethyl ether, step gradients) to yield 31 fractions (F1–F31), combined according to their TLC profiles. The ethyl acetate extract was also further fractionated by column chromatography (on silica gel; CHCl₃/MeOH, step gradients) to yield 23 fractions (F1–F23), combined according to their TLC profiles. The extracts/subfractions were collected in a vial at room temperature, the extraction solvent was dried under a gentle N₂ flow at room temperature and the residue stored at -20 °C until chromatographic analysis (Figure 1).

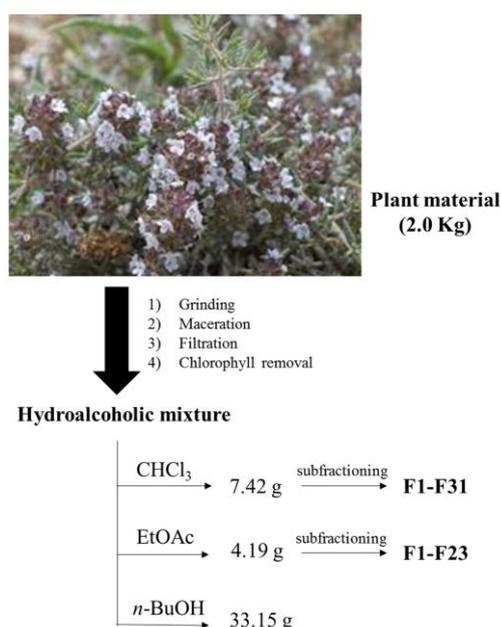


Figure 1. Schematic flowchart performed on *Thymus algeriensis* aerial parts.

3.2. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

The SFE extractor consists of a CO₂ delivery pump (PU-2080-CO₂, Jasco, Tokyo, Japan), a thermostatic chamber with a 50 mL extraction column, an UV-Vis detector equipped with high-pressure cell (875-UV, Jasco) and an automatic back pressure regulator (BP-2080 plus, Jasco). A sample of triturated aerial parts (20 g) was packed in a 50 mL SFE extraction bulk. The plant material was exposed to a dynamic extraction at 40 °C for 60 min with a CO₂ flow-rate of 3 mL/min. Two different pressure values (10 and 30 MPa) were applied in order to modulate supercritical fluid density as also reported in the literature regarding *Thymus*-related species [16]. After filtration over Chromafil® PET 20/25 (0.2 µm pore size, Machery-Nagel AG, Oensingen, Switzerland) into brown glass vials, the extracts (yield 0.73% for 10 MPa and 0.65% for 30 MPa) were collected at room temperature and stored at −20 °C until chromatographic analysis.

3.3. Microwave-Assisted Extraction (MAE)

MAE was performed using an automatic Biotage Initiator™ 2.0 (Uppsala, Sweden) characterized by 2.45 GHz high-frequency microwaves and power range 0–300 W. The internal vial temperature was strictly controlled by an infrared (IR) sensor probe. Ground samples were added with water (20:1 *v:w*, liquid-to-solid ratio). Then, the suspension was transferred in a 10 mL sealed vessel suitable for an automatic single-mode microwave reactor. MAE was carried out heating by microwave irradiation at 40, 60, 80, 100 or 120 °C for 5, 10 or 15 min and then cooling with pressurized air. After filtration over Chromafil® PET 20/25 (0.2 µm pore size, Machery-Nagel AG, Oensingen, Switzerland) into brown glass vials, the extraction solvent was dried under a gentle N₂ flow at room temperature. The dried mixtures (yields between 8.3–10.1%) were stored at −20 °C until further chromatographic analysis [17].

3.4. HPLC Analysis

HPLC-PDA phenolic pattern was evaluated by the validated method reported in the literature [18], using an HPLC Waters liquid chromatography (model 600 solvent pump, 2996 PDA) and a Phenomenex prodigy ODS(3) 100A 250 mm × 4.6 mm, 5 µm as column. Mobile phase was directly *on-line* degassed by using a Biotech 4CH DEGASI Compact (Onsala, Sweden). Empower v.2 Software (Waters Spa, Milford, MA, USA) was used to collect and analyze data. All extracts were weighted, dissolved in mobile phase and then 20 µL were directly injected into HPLC-PDA system. For over range samples, 1:10 dilution factor was applied. Data are reported as mean ± standard deviation of three independent measurements. The identification of individual compounds was carefully performed on the basis of their retention time (verified also by UV-Vis spectra) by comparison with those of pure standard compounds, without difficulties in peak tracking when multiple substances co-elute (see supplementary Materials, section S1).

4. Color Analysis

CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} and h_{ab}), as defined by the "Commission Internationale de l'Eclairage", were determined on the powdered aerial parts of *T. algeriensis* using a colorimeter X-Rite SP-62 (X-Rite Europe GmbH, Regensdorf, Switzerland), equipped with a D65 illuminant and an observer angle of 10°. Color description was based on three parameters: L^* that defines the lightness and varies between 0 (absolute black) and 100 (absolute white), a^* that measures the greenness ($-a^*$) or the redness ($+a^*$) and b^* that measures the blueness ($-b^*$) and the yellowness ($+b^*$). C^*_{ab} (chroma, saturation) expresses a measure of color intensity and h_{ab} (hue, color angle) is the attribute of appearance by which a color is identified according to its resemblance to red, yellow, green, or blue, or a combination of two of these attributes in sequence. Cylindrical coordinates C^*_{ab} and h_{ab} are calculated from the parameters a^* and b^* using the equations $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ [19]. Three different powdered *T. algeriensis* aerial parts samples were analyzed. The results are expressed as the mean value ± standard deviation (SD).

5. Carotenoids and Chlorophylls Analysis

The total carotenoids and chlorophylls a and b analysis in *Thymus* sample was performed according to Solovchenko with some modifications [20]. The sample was homogenized with mortar and pestle in 5 mL of chloroform-methanol (2:1, v/v) containing 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) to inhibit peroxidation process. Moreover, homogenization was carried out with 50 mg of MgO to prevent chlorophyll pheophytinization. The homogenate was passed through a paper filter and after, distilled water was added to the amount of 0.2 of the extract volume. Finally, the mixture was centrifuged in glass tube test for 18 min at 3000 g at 10 °C to complete separation of chloroform fraction from methanol/aqueous one. The chloroform phase (lower phase) contained the hydrophobic molecules (chlorophylls, carotenoids, lipids, etc.), while the methanol-water phase (upper phase) contained the hydrophilic molecules. Absorption spectrum of the chloroform phase was recorded with a Beckman Coulter DU 800 instrument in the range of 350–800 nm with a spectral resolution of 0.5 nm at a temperature of 20 °C. Both chlorophylls and the total carotenoid contents were determined using absorption coefficient according to Wellburn (1994) [21]. Equations to determine the concentrations of chlorophyll a (C_a) and b (C_b), as well as total carotenoid (C_{tot}) contents are reported below:

$$C_a = 11.47 A_{665.6} - 2A_{647.6};$$

$$C_b = 21.85 A_{647.6} - 4.53 A_{665.6};$$

$$C_{tot} = (1000 A_{480} - 1.33C_a - 23.93 C_b)/202.$$

The data are reported as means of three replications and expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW (dry weight) \pm SD (standard deviation).

6. Results and Discussion

6.1. Hydroalcoholic Extracts and Subfractions

The aim of this analysis was to carry out a qualitative and quantitative study of the different extracts or subfractions of *T. algeriensis* aerial parts, and also to compare the extractive procedures in order to develop extraction methods with better yields (Table 1). The use of different solvents with increasing polarity led to a preliminary but metabolite-oriented purification. Successive subfractioning of CHCl_3 and EtOAc extracts highlighted better the presence of specific secondary metabolites based on the results obtained by means of our validated high performance liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-PDA) procedure.

Ethyl acetate extract was the richest of phenolic constituents reaching *p*-coumaric acid and benzoic acid the highest concentration in some isolated fractions (40.62 $\mu\text{g}/\text{g}$ and 5.71 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectively), and catechin having the highest concentration in a successive isolated one (6.23 $\mu\text{g}/\text{g}$).

Finally, eleven compounds were identified in chloroform extract, among which naringenin and benzoic acid resulted with the highest concentrations in the fractions F16 and F24 (8.97 $\mu\text{g}/\text{g}$ and 10.92 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectively), and only epicatechin was identified in the fraction F30 with the concentration of 6.78 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Nine compounds were identified in the *n*-butanol fraction, including three flavonoids among which epicatechin had the highest concentration (48.03 $\mu\text{g}/\text{g}$), while of the six phenolic acids present in this fraction, *o*-coumaric acid resulted in the highest concentration (9.83 $\mu\text{g}/\text{g}$).

Table 1. Phenolic profile of main subfractions of *Thymus algeriensis* aerial part extracts obtained by maceration.

Identified Compound	Content ($\mu\text{g}/\text{g} \pm \text{SD}$, DW)						
	F16 (CHCl_3)	F24 (CHCl_3)	F30 (CHCl_3)	F13 (EtOAc)	F22 (EtOAc)	F27 (EtOAc)	<i>n</i> -BuOH
Catechin	1.12 \pm 0.01					6.23 \pm 0.05	
4-Hydroxybenzoic acid					16.31 \pm 0.91	3.61 \pm 0.30	0.66 \pm 0.02
Vanillic acid	5.17 \pm 0.11	0.23 \pm 0.01			0.22 \pm 0.01		
Epicatechin			6.78 \pm 0.12	0.55 \pm 0.01			48.03 \pm 2.98
Syringic acid							1.93 \pm 0.11

<i>p</i> -Coumaric acid			1.26 ± 0.81	40.62 ± 3.01	1.63 ± 0.88	1.70 ± 0.58
Rutin	0.57 ± 0.02					4.52 ± 0.41
<i>t</i> -Ferulic acid	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.01		1.46 ± 0.13	0.84 ± 0.01	0.55 ± 0.01
Naringin		0.16 ± 0.01	4.02 ± 0.39	0.46 ± 0.01		
2,3-Dimethoxybenzoic acid	6.51 ± 0.59			7.51 ± 0.47		3.52 ± 0.20
Benzoic acid		10.92 ± 1.21	5.71 ± 0.47			
<i>o</i> -Coumaric acid					1.03 ± 0.09	9.83 ± 0.87
Naringenin	8.97 ± 0.74	0.90 ± 0.03				0.47 ± 0.01
Carvacrol	0.43 ± 0.01					
Total	22.97 ± 1.01	12.44 ± 1.03	6.78 ± 0.12	11.54 ± 0.99	66.58 ± 2.70	13.34 ± 1.12

DW: dry weight.

6.2. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

The aim of this experiment was to study the influence of the operating pressure parameter on the kinetics of the supercritical extraction process, in order to optimize the operative conditions and to compare the performance with the other extraction methods, using the secondary metabolites profile as discriminant marker.

We carried out two separate plant sample extractions at a fixed temperature of 40 °C, operating with different pressure values (10 MPa and 30 MPa) in order to find the leading coordinates towards the best extraction yield. We found that the increasing pressure did not improve either yield or the phenolic recovery, with only slight effects on the vanillic acid amount. According to the quality and the quantity of metabolites, the more interesting results were obtained under the following operating conditions: 40 °C for the temperature and 30 MPa for the pressure (Table 2). Collectively, this method afforded low amounts for phenolic compounds from *T. algeriensis* aerial parts.

Table 2. Phenolic profile of *T. algeriensis* aerial part extracts obtained by supercritical fluid extraction obtained at two discrete pressure values.

Identified Compound	Content (µg/g ± SD, DW)	
	40 °C, 10 MPa	40 °C, 30 MPa
Gallic acid	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Catechin	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Vanillic acid		0.18 ± 0.02
Epicatechin	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Isovanillin	1.49 ± 0.09	1.48 ± 0.06
<i>p</i> -Coumaric acid	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Naringin	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Harpagoside	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Total	2.12 ± 0.10	2.26 ± 0.10

DW: dry weight.

6.3. Microwave-Assisted Extraction (MAE)

Design and optimization of the microwave-assisted extraction of this plant were performed keeping in mind the impact of different parameters (temperature, time, and solvent volume) on the recovery of main metabolites profile used as discriminant marker.

The choice of the solvent, to afford the best extraction yield, is one of the most important steps for the development of an extraction method. In order to obtain good results, a preliminary microwave-assisted extraction based on water as a polar solvent (solvent volume: 20 mL; plant material: 1 g; extraction time: 10 min) was applied and the best extraction temperature ranging from

40 to 120 °C was evaluated by means of the results provided by HPLC method (see supplementary Materials, section S2). Once selected the best temperature condition (100 °C), to obtain the most diversified extract in phenolics, we tried extraction times of 5 and 15 min, obtaining the best extraction yield with an extraction time of 15 min in the same solvent (water). Finally, we have applied these conditions to select the best extraction solvent. The aqueous extract resulted richer in plant secondary phenolic metabolites than the EtOH/H₂O (70/30, v/v) extract, obtained in the same conditions (Table 3).

The richest phenolic pattern was obtained in the previously selected conditions (temperature: 100 °C, time: 15 min) using water as the solvent. Several compounds were identified in this extract, whose composition is reported in Table 3, which contained a complex mixture of plant secondary metabolites belonging to the chemical classes of phenolic acids and flavonoids, both known for their pharmacological activities.

The phenolic acids were identified as gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, syringic acid, 3-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, sinapinic acid, *t*-ferulic acid, benzoic acid, *o*-coumaric acid. Benzoic acid displayed the highest concentration (4145.75 µg/g) followed by epicatechin (246.752 µg/g), chlorogenic acid (1745.98 µg/g), syringic acid (615.20 µg/g), naringin (376.60 µg/g), catechin (359.80 µg/g), and *o*-coumaric acid (341.55 µg/g). Flavonoids and phenolic compounds are the most important groups of secondary metabolites and bioactive compounds in plants [22,23]. Two important trends could be also extrapolated from the impact of the increasing temperature on the recovery: first, some compounds (chlorogenic acid, *t*-ferulic acid, quercetin, isovanillin, epicatechin, syringic acid, catechin and *p*-coumaric acid) reached the highest amount until 100 °C and then their concentrations tended to diminish at higher temperatures. Secondly, other compounds (vanillic acid, gallic acid, sinapinic acid, naringin, 2,3-dimethoxybenzoic acid, and *o*-coumaric acid) had their maximum recovery at lower temperature and extraction time.

Table 3. High performance liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-PDA) analysis of the phenolic profile of *Thymus algeriensis* microwave-assisted extracts.

Identified Compound	Content (µg/g ± SD, DW)							
	40 °C, 10 min, water	60 °C, 10 min, water	80 °C, 10 min, water	100 °C, 10 min, water	120 °C, 10 min, water	100 °C, 5 min, water	100 °C, 15 min, water	100 °C, 15 min, EtOH/H ₂ O 50:50
Gallic acid	36.51 ± 0.23	72.84 ± 0.36	24.57 ± 0.21	28.05 ± 0.19	20.31 ± 0.20	9.70 ± 0.09	37.97 ± 0.25	
Catechin				46.69 ± 0.33	238.91 ± 1.66	45.23 ± 0.18	359.80 ± 1.98	
Chlorogenic acid	118.34 ± 1.01	1203.98 ± 5.29	1090.00 ± 4.77	1766.64 ± 5.13	930.04 ± 3.99	1570.40 ± 4.33	1745.98 ± 5.65	
4-Hydroxybenzoic acid			18.38 ± 0.20					37.38 ± 0.66
Vanillic acid		37.56 ± 0.71	50.17 ± 0.98	9.73 ± 0.12		176.74 ± 1.02	23.92 ± 0.66	
Epicatechin			813.21 ± 2.29	1675.51 ± 3.95	821.40 ± 3.02	200.62 ± 1.15	2462.75 ± 2.00	66.11 ± 0.99
Syringic acid		17.86 ± 0.99	52.22 ± 1.39	315.18 ± 3.00		747.63 ± 3.23	615.20 ± 4.03	
3-Hydroxybenzoic acid		243.31 ± 2.21	57.94 ± 0.98	212.38 ± 1.75	70.62 ± 0.67	75.06 ± 0.60	166.73 ± 1.02	19.82 ± 0.51
Isovanillin		223.75 ± 1.97	248.12 ± 1.88	271.11 ± 2.04	59.05 ± 0.77	68.21 ± 0.67	40.42 ± 0.78	200.37 ± 1.09
<i>p</i> -Coumaric acid	15.78 ± 0.13	14.07 ± 0.29	21.65 ± 0.28	40.00 ± 0.32	23.05 ± 0.27	18.82 ± 0.23	106.99 ± 0.77	62.02 ± 0.19
Rutin	39.70 ± 0.23	375.42 ± 1.01	37.63 ± 0.65	89.45 ± 0.69		16.22 ± 0.09	196.89 ± 1.00	55.32 ± 0.55
Sinapinic acid	4.96 ± 0.13	31.58 ± 0.60	5.37 ± 0.17	5.53 ± 0.17	5.26 ± 0.18	29.64 ± 0.60	46.20 ± 0.63	8.48 ± 0.10

<i>t</i>-Ferulic acid	19.89 ± 0.99	14.22 ± 0.50	27.56 ± 0.52	21.72 ± 0.54	1869.72 ± 2.01	140.64 ± 0.73	
Naringin	89.63 ± 0.98	385.92 ± 2.12	179.46 ± 2.03	29.64 ± 0.23	31.31 ± 0.24	132.37 ± 1.00	376.60 ± 2.77
2,3-dimethoxy-benzoic acid	520.37 ± 2.02	1212.75 ± 5.84	222.84 ± 1.95				1611.91 ± 2.49
Benzoic acid	1455.82 ± 3.39	4896.51 ± 5.77	2425.66 ± 4.23	2393.82 ± 4.78	2697.97 ± 5.00	3889.74 ± 4.77	4157.75 ± 4.67
<i>o</i>-Coumaric acid	227.74 ± 1.04	348.86 ± 2.20	37.66 ± 0.45	23.51 ± 0.29	30.27 ± 0.28	812.41 ± 2.00	341.55 ± 1.17
Quercetin			63.04 ± 0.20	74.71 ± 0.23	59.52 ± 0.20	68.60 ± 0.28	180.72 ± 0.77
Total	2508.85 ± 5.36	9084.30 ± 8.12	5362.13 ± 4.99	7009.51 ± 8.54	5009.41 ± 4.12	9731.14 ± 7.98	11000.12 ± 9.96

DW: dry weight.

The experimental results show that aqueous extraction, assisted by microwave at temperature 100 °C and for a time of 15 min, produced a phenolic-enriched extract of *Thymus algeriensis* aerial parts.

6.4. Color Analysis

Dry samples of *Thymus algeriensis* aerial parts were blended in a mixer and further homogenized in a mortar. The samples of blended powdered dry leaves of *Thymus* showed a nonhomogeneous color in which three different shades could be evidenced, a pale beige, a pale pink and a pale green. Conversely, the mortar homogenized samples displayed a more homogeneous light brown color characterized by two only pale nuances, a pale green and an undefined pale shade among beige, pink and orange. The tristimulus colorimetry was employed in this study to evaluate the color properties: the colorimetric data and the mean value, completed by the standard deviation, of three different samples, are reported in Table 4.

It is not possible to give an interpretation for comparison of this CIELAB colorimetric analyses, because only few data are available in literature about colorimetric studies on aerial parts in general, and no data are disposable for this plant in particular. Moreover, as known, the colorimetric parameters are deeply influenced by several different factors [24,25], among which storage temperature, humidity, light exposition, besides the standard conditions applied, according to the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). In this work a D65 illuminant, sunlight simulating, with an observer angle of 10°, was used. Reflectance curve is reported in Figure 2. Only a weak yellow parameter (light positive b*) can be shown, in line with the phenolic profile denoted by the HPLC analysis.

Table 4. Color analysis using a device-independent color space (CIELAB parameters), as defined by the "Commission Internationale de l'Éclairage", data of *Thymus algeriensis* aerial parts.

CIELAB Parameters	Mean Value	SD
L*	51.25	1.91
a*	1.09	0.36
b*	5.53	0.69
C* _{ab}	5.64	0.72
h _{ab}	78.90	3.28

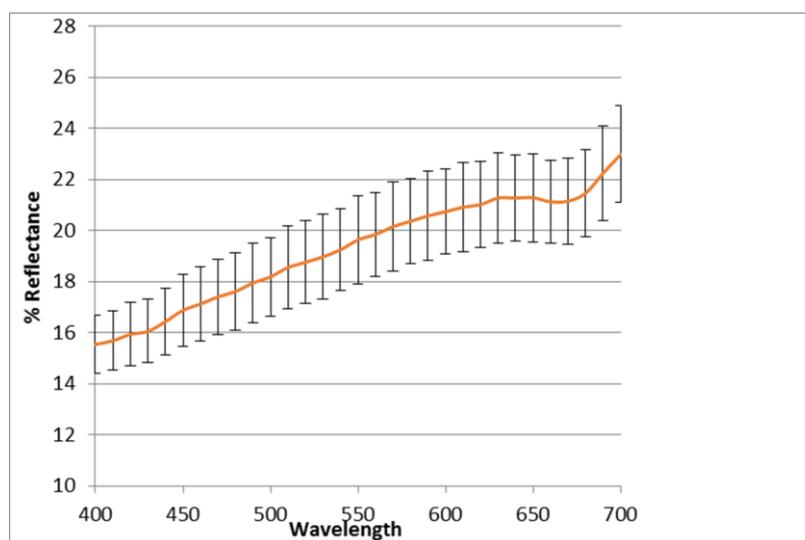


Figure 2. Reflectance analysis of *Thymus algeriensis* aerial parts.

6.5. Pigments Determination (Total Carotenoids, Chlorophyll a and Chlorophyll b)

T. algeriensis aerial parts plant displayed significant differences in analyzed pigments concentration. It is possible to notice that chlorophyll a content ($0.0529 \pm 0.0072 \mu\text{g}/\text{mg}$) is higher compared with the other pigments (chlorophyll b = $0.0452 \pm 0.0069 \mu\text{g}/\text{mg}$ and carotenoids $0.0165 \pm 0.007 \mu\text{g}/\text{mg}$) ($p < 0.002$) (Figure 3), but chlorophyll b was present in good proportion, as expected in shade plants. Generally, the concentration of chlorophyll a (Chl a) is two to three times the concentration of chlorophyll b (Chl b) due to the importance of chlorophyll a as the primary pigment in photosynthesis. However, a greater proportion of Chl b improved light-collection ability of the leaf in the region of far-red light. In this plant, the value of the Chl a/b ratio was 1.17, indicating a high chlorophyll a content. Chl a/b ratio can be a useful indicator of nitrogen partitioning within a leaf and this ratio is predicted to respond to light and nitrogen availability. In particular, Chl a/b ratio should increase with increasing irradiance at a given nitrogen availability [26]. Regarding total carotenoid concentration, our finding showed an amount about three times lower than chlorophyll a ($0.0165 \pm 0.007 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $0.0529 \pm 0.0072 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively) (Figure 3). High carotenoid contents are revealed under high insolation level, because in this case they act as protectors from photoinhibition [26]. The quali-quantitative evaluation of these ubiquitous bulk substances is of crucial interest not only due to their role in the protection against oxidative stress [27], but also for their interference with biological assays generating false positive and negative results [28].

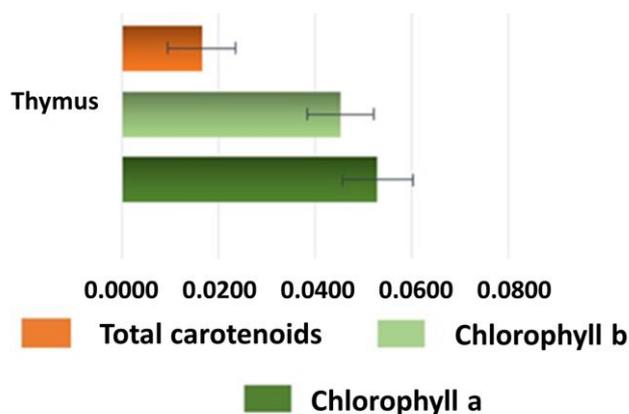


Figure 3. Pigments concentration in *T. algeriensis* aerial parts ($\mu\text{g}/\text{mg} \pm \text{SD}$).

7. Conclusion

The study of endemic plants could support their ethnobotanical use by means of a wide comprehension of the qualitative and quantitative phytochemical profile. After the evaluation of color parameters and pigment content of the aerial parts of *T. algeriensis*, we developed an HPLC method with diode array detection for the quantitative and qualitative estimation of phenolic compounds obtained by different extraction methods. Three extraction methods have been carried out in this work for the purpose of developing extractions under the best conditions. The results of the present study revealed important data regarding the phenolic composition of *Thymus algeriensis* aerial parts up to now; several phenolic compounds known for their pharmacological properties were identified and quantified in different extracts of this plant. MAE was shown to be the best-performing procedure. The presence of a significant amount of respective bioactive components in this plant and the variation of quantity based on the polarity of the solvent used for the extraction process ensured its unequivocal recommendation for use in the pharmaceutical and nutraceutical sector.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/link, Section S1: Chemical standards resolution in HPLC-PDA method and gradient elution profile, Section S2: HPLC-PDA chromatograms obtained for MAE optimization.

Acknowledgments: This work was supported by University “G. d’Annunzio” of Chieti–Pescara, Chieti, Italy.

Author Contributions: F.B. and S.C. conceived and designed the experiments; S.B. collected the material and prepared it for the analysis, N.B., L.M., and L.Z. performed the extractions; M.L. and D.I. performed the HPLC analyses. S.Ce. carried out the color analysis, A.M.G. performed the pigment analyses. C.C. analyzed the data and contributed reagents and materials; M.L. and S.C. wrote the paper.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Volatiles from *Thymbra* and *Thymus* species of the western Mediterranean basin, Portugal and Macaronesia. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1465–1476.
2. Nabavi, S.M.; Marchese, A.; Izadi, M.; Curti, V.; Daglia, M.; Nabavi, S.F. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem.* **2015**, *173*, 339–347.
3. Maksimović, Z.; Stojanović, D.; Sostarić, I.; Dajić, Z.; Ristić, M. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 2036–2041.
4. Jarić, S.; Mitrović, M.; Pavlović, P. Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 101978.
5. Guesmi, F.; Ben, F.M.; Mejri, M.; Landoulsi, A. In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp. *algeriensis*. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 114–125.
6. Guesmi, F.; Ali, M.B.; Barkaoui, T.; Tahri, W.; Mejri, M.; Ben-Attia, M.; Bellamine, H.; Landoulsi, A. Effects of *Thymus hirtus* sp. *algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae) essential oil on healing gastric ulcers according to sex. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 138–150.
7. Espina, L.; García-Gonzalo, D.; Laglaoui, A.; Mackey, B.M.; Pagán, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *161*, 23–30.
8. Guesmi, F.; Beghalem, H.; Tyagi, A.K.; Ali, M.B.; Mouhoub, R.B.; Bellamine, H.; Landoulsi, A. Prevention of H₂O₂ induced oxidative damage of rat testis by *Thymus algeriensis*. *Biomed. Environ. Sci.* **2016**, *29*, 275–285.
9. Giordiani, R.; Hadeif, Y.; Kaloustina, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 199–203.
10. Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Verissimo, A.R.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* **2009**, *116*, 714–721.
11. Chemat, S.; Cherfouh, R.; Meklati, B.Y.; Belanteur, K. Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *J. Essent. Oil Res.* **2012**, *24*, 5–11.
12. Nikolic, M.; Glamoclija, J.; Ferreira, I.C.F.R.; Calhelha, R.C.; Fernandes, A.; Markovic, T.; Marković, D.; Giweli, A.; Soković, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus*

- serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 183–190.
13. Diuzheva, A.; Carradori, S.; Andruch, V.; Locatelli, M.; De Luca, E.; Tiecco, M.; Germani, R.; Menghini, L.; Nocentini, A.; Gratteri, P.; et al. Use of innovative (micro)extraction techniques to characterize *Harpagophytum procumbens* root and its commercial food supplements. *Phytochem. Anal.* **2018**, doi:10.1002/pca.2737.
 14. Delazar, A.; Nahar, L.; Hamedeyazdan, S.; Sarker, S.D. Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *864*, 89–115.
 15. da Silva, R.P.F.F.; Rocha-Santos, T.A.P.; Duarte, A.C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends Analyt. Chem.* **2016**, *76*, 40–51.
 16. Petrović, N.V.; Petrović, S.S.; Džamić, A.M.; Ćirić, A.D.; Ristić, M.S.; Milovanović, S.L.; Petrović, S.D. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus praecox* supercritical extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *110*, 117–125.
 17. Mollica, A.; Locatelli, M.; Macedonio, G.; Carradori, S.; Sobolev, A.P.; De Salvador, R.F.; Monti, S.M.; Buonanno, M.; Zengin, G.; Angeli, A.; et al. Microwave-assisted extraction, HPLC analysis, and inhibitory effects on carbonic anhydrase I, II, VA, and VII isoforms of 14 blueberry Italian cultivars. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 1–6.
 18. Zengin, G.; Menghini, L.; Malatesta, L.; De Luca, E.; Bellagamba, G.; Uysal, S.; Aktumsek, A.; Locatelli, M. Comparative study of biological activities and chemical fingerprint of two wild Turkish species: *Asphodeline anatolica* and *Potentilla speciosa*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 203–208.
 19. Clydesdale, F.M.; Ahmed, E.M. Colorimetry-methodology and applications. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, *10*, 243–301.
 20. Solovchenko, A.E.; Chivkunova, O.B.; Merzlyak, M.N.; Reshetnikova, I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Russian J. Plant. Physiol.* **2001**, *48*, 693–700.
 21. Wellburn, A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 307–313.
 22. Williamson, G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull.* **2017**, *42*, 226–235.
 23. Cushnie, T.P.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2005**, *26*, 343–356.
 24. Cesa, S.; Carradori, S.; Bellagamba, G.; Locatelli, M.; Casadei, M.A.; Masci, A.; Paolicelli, P. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chem.* **2017**, *232*, 114–123.
 25. Cesa, S.; Casadei, M.A.; Cerreto, F.; Paolicelli, P. Infant milk formulas: effect of storage conditions on the stability of powdered products towards autoxidation. *Foods* **2015**, *4*, 487–500.
 26. Ivanov, L.A.; Ivanova, L.A.; Ronzhina, D.A.; Yudina, P.K. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural. *Russian J. Plant Physiol.* **2013**, *60*, 812–820.
 27. Park, J.-Y.; Park, C.-M.; Kim, J.-J.; Noh, K.-H.; Cho, C.-W.; Song, Y.-S. The protective effect of chlorophyll a against oxidative stress and inflammatory processes in LPS-stimulated macrophages. *Food Sci. Biotechnol.* **2007**, *16*, 205–211.
 28. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1582–1614.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors of the Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d’Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Atriplex mollis Desf. Aerial Parts: Extraction Procedures, Secondary Metabolites and Color Analysis

Nassima Boutaoui ¹, Lahcene Zaiter ¹, Fadila Benayache ¹, Samir Benayache ¹ ,
Francesco Cacciagrano ², Stefania Cesa ³, Daniela Secci ³, Simone Carradori ² ,
Anna Maria Giusti ⁴, Cristina Campestre ² , Luigi Menghini ²  and Marcello Locatelli ^{2,*} 

¹ Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria; boutaoui.nassima@gmail.com (N.B.); lahcene.zaiter@yahoo.fr (L.Z.); fbenayache@yahoo.fr (F.B.); sbenayache@yahoo.com (S.B.)

² Department of Pharmacy, University "G. d'Annunzio" of Chieti-Pescara, Via dei Vestini 31, 66100 Chieti, Italy; francesco.cacciagrano@studenti.unich.it (F.C.); simone.carradori@unich.it (S.C.); cristina.campestre@unich.it (C.C.); luigi.menghini@unich.it (L.M.)

³ Department of Drug Chemistry and Technologies, Sapienza University of Rome, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy; stefania.cesa@uniroma1.it (S.C.); daniela.secci@uniroma1.it (D.S.)

⁴ Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy; annamaria.giusti@uniroma1.it

* Correspondence: m.locatelli@unich.it; Tel.: +39-0871-355-4590; Fax: +39-0871-355-4911

Received: 26 July 2018; Accepted: 5 August 2018; Published: 6 August 2018



Abstract: A method using high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector was proposed for the rapid characterization of different phenolic constituents from the extracts of *Atriplex mollis* aerial parts. *Atriplex* species are known for their multiple biological activities, but no information is available in the literature about *A. mollis*. With the aim to firstly characterize the main secondary metabolites of this plant, so as to orient better the biological evaluation, we applied three different extraction procedures and compared the chromatographic results. Microwave-assisted extraction gave the best yield and recovery of important compounds such as gallic acid, catechin, chlorogenic acid, *p*-OH benzoic acid, rutin, sinapinic acid, *t*-ferulic acid, naringenin and benzoic acid. These constituents belong to three important chemical classes: phenolic acids, flavonoids and monoterpenes. Color evaluation and analysis of chlorophylls (a and b) and carotenoids complete the preliminary profile of this plant. From these analyses, *Atriplex mollis* is a source of bioactive compounds (especially rutin, *t*-ferulic acid and gallic acid) and could be recommended as a plant of phyto-pharmaceutical relevance, opening new perspectives on this salt-tolerant plant.

Keywords: *Atriplex mollis*; SFE; MAE; HPLC-PDA; color analysis; pigments

1. Introduction

Chenopodiaceae are widespread throughout the world, but have a strong preference for saline clay soils, living mainly in arid and semi-arid climates as xero-halophyte saltbushes [1]. Over 400 species of *Atriplex* have been identified. The Mediterranean basin has 40–50 *Atriplex* species with 15 growing in Algeria [2,3]. Chenopodiaceae are dicotyledonous flowering plants with no petals, the leaves are often covered by trichomes, pedicellate glands with heads formed by a large cell filled with salty water. The stem cross section shows vascular bundles widely scattered on stele or distributed in multiple

concentric rings, as adaptive arrangement to salty and sandy environment [4,5]. Unlike other vascular plants, salt-tolerant species, endowed with high physiological plasticity, are able to survive under stressful conditions. Indeed, as halophytic adaptation to the salinity of soils, these species raise their osmotic concentration to high values as they consequently accumulate a large quantity of salts [6–8].

The previous phytochemical analyses of some *Atriplex* spp. reported the presence of several classes of secondary metabolites such as saponins, glycosides, flavonoids, tannins, terpenoids, alkaloids, and proteins as well as amino acids and long-chain alcohols. Additionally, no essential oils were found in these species, but they were characterized by high amounts of sulfur-derived compounds and minerals. Particularly, the content of proteins and amino acids changed during plant growth [9,10]. Compared with other species, and as far as our literature survey could reveal, no phytochemical investigations on *Atriplex mollis* Desf. aerial parts were previously reported. This prompted us to choose this species (widespread and endemic in Algeria) for an extensive phytochemical study with the aim of determining the main bioactive secondary metabolites (phenolics, carotenoids, and chlorophylls). Indeed, halophytes are well known for their ability to react with toxic reactive oxygen species, since they evolved an over-expressed antioxidant system and, as a response to abiotic stress, provide high levels of phenolic compounds [9]. Additionally, it was demonstrated that specific responses to salt stress adaptation in halophytic plants could be related to flavonoids, sulfolipids, and polyphenols over-production [11,12].

In order to contrast the salt-induced damage, halophytes also increase the chlorophyll and carotenoid content for the maintenance of cellular and physiological homeostasis, thus confirming the important role (and, consequently, the determination) of these small non-enzymatic molecules.

Natural polyphenols (anthocyanins, tannins, flavanones, isoflavones, resveratrol and ellagic acid) are currently used in the industry as nutraceuticals and/or functional foods. Among them, halophytes could be valuable sources for economical applications not only for their phenolics pattern, but also for their carotenoids and pigments content. They are important in plants for normal growth development and defense. Furthermore, due to the presence of these compounds, this plant could be popularized for food and medicinal purposes as antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, anti-thrombotic, cardio-protective and vasodilatory agent.

Ethnobotanists have not suggested any traditional use of this species, although some biological activities have already been described for various species of Chenopodiaceae [9]. The majority of studies on *Atriplex* spp. investigated adaptive morphological and physiological responses under salinity stress [13] and the potential use as a fodder for livestock [14], without considering this native Algerian species as a suitable candidate to be used as a cash crop (edible and ornamental plant, fodder, bio-fuel, folk medicine, and source of chemicals) or investigating the chemical composition. In recent years, the polyphenol market has increased attention on nutraceutical and functional foods for human consumption, and prompted research towards the development of extractive technologies to accomplish the requirements of food industry.

In the framework of green chemistry, the present study was aimed at screening and identifying for the first time the main components from different extracts (maceration, supercritical carbon dioxide extraction, and microwave-assisted extraction) of *A. mollis* aerial parts monitored by a validated multi-component analysis with high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector (HPLC-PDA). As recently highlighted in the literature, due to the huge differences in terms of polarity, solubility, stability, and concentration of these metabolites, a single solvent or extraction procedure may not furnish a comprehensive total metabolite pattern. The precise knowledge of the specific metabolite content should guide a rational biological evaluation according to the concept of a “hypothesis-driven approach”, thus preserving the limited biodiversity of this endemic species.

2. Experimental Section

2.1. Chemicals

Standard chemicals for the wide chromatographic analyses (caffeic acid, gallic acid, naringenin, carvacrol, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, 4-hydroxy-benzoic acid, *t*-ferulic acid, naringin, vanillic acid, *p*-coumaric acid, rutin, syringic acid, benzoic acid, *o*-coumaric acid, 3-hydroxy-benzoic acid, sinapinic acid, 2,3-dimethoxy-benzoic acid, quercetin, harpagoside, *t*-cinnamic acid (all purity > 98%)) as well as HPLC-grade methanol, chloroform, *n*-butanol, ethyl acetate, acetonitrile and glacial acetic acid were purchased by Sigma-Aldrich (Milan, Italy) and required no further purification. Double distilled water was produced by a Millipore Milli-Q Plus device (Millipore Bedford Corp., Bedford, MA, USA). All extractions were preliminarily monitored by thin layer chromatography on 0.2 mm thick silica gel plates (60 F₂₅₄ Merck, Kenilworth, NJ, USA) and the spots were visualized at 254 and 365 nm under an ultraviolet (UV) lamp. Flash column chromatography was performed using Biotage Isolera™ system with cartridges packed with Biotage® HP-Sphere™ spherical silica (Biotage AB, Uppsala, Sweden).

2.2. Plant Material

The plant material was collected from Bershka region (Coordinates: 34°48'N 5°41'E), Algeria, in May 2016. The plant was identified by Prof. M. Kaabeche (Biology Department, University of Setif 1, Algeria). A relative specimen voucher has been registered in the Herbarium of Frères Mentouri University, Algeria.

3. Extraction Techniques

3.1. Maceration and Further Fractionation

A proper quantity (2 kg) of aerial parts of *A. mollis* was dried at room temperature (until constant weight, 842 g of dry weight), cut and powdered (50 mesh), and macerated three times (24 h for each time with fresh solvent mixture) with ethanol:water (80:20, *v:v*, 15 L). After filtration and evaporation at $T < 40$ °C, the crude extract was partitioned between water and solvents at increasing polarity (following a liquid–liquid extraction) in order to obtain more metabolite-oriented subfractions: chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Each extract was dried with anhydrous Na₂SO₄, then filtered and evaporated under reduced pressure at $T < 40$ °C to give CHCl₃ extract (2.57 g), EtOAc extract (2.67 g) and *n*-BuOH extract (20.31 g).

The chloroform extract was further fractionated by flash chromatography (MeOH/CHCl₃, step gradients) to provide 17 fractions. Successively, the EtOAc extract was fractionated by flash chromatography (MeOH/CHCl₃, step gradients) to provide 18 fractions (Figure 1). Each sample was stored in a sealed bag in the dark at -20 °C.

3.2. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

The extractor for Supercritical fluid extraction (SFE) was equipped with a carbon dioxide delivery pump (PU-2080-CO₂, Jasco, Tokyo, Japan) connected to a thermostatic chamber with a 50 mL extraction column, an UV-Vis detector with high pressure cell (875-UV, Jasco) and an automatic back pressure regulator (BP-2080 plus, Jasco). 20 g of powdered plant material (50 mesh) were packed in a 50 mL SFE extraction bulk and then exposed to a dynamic extraction with a CO₂ flow-rate of 3 mL/min (40 °C, 60 min). Two discrete pressure conditions, namely 10 and 30 MPa (carbon dioxide density: from 628.7 to 910 kg/m³), were chosen in order to tune supercritical fluid density. After vacuum filtration over Chromafil® PET 20/25 (0.2 µm pore size, Machery-Nagel AG, Oensingen, Switzerland) into dark glass vials, the extracts were pooled at room temperature and kept under refrigerated condition until chromatographic analyses.

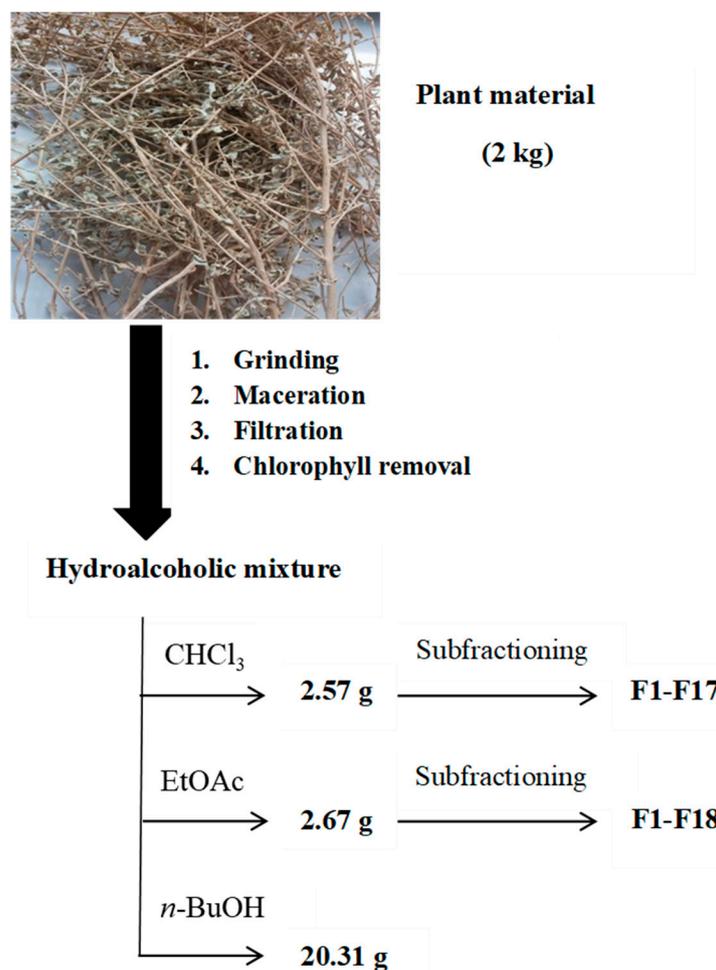


Figure 1. Experimental maceration and subfractioning flowchart performed on *A. mollis* aerial parts.

3.3. Microwave-Assisted Extraction (MAE)

Microwave-assisted extraction (MAE) was carried out by means of a single-mode microwave reactor automatic Biotage Initiator™ 2.0 (Biotage AB, Uppsala, Sweden) characterized by power range 0–300 W and 2.45 GHz microwaves. The internal vessel temperature was monitored by an infrared (IR) sensor probe. Powdered samples (50 mesh) were suspended in water to obtain a liquid-to-solid ratio of 20:1 (*v:w*) and transferred into a sealed vial. MAE was performed at discrete temperatures (40, 60, 80, 100 or 120 °C) for 5, 10 or 15 min and then cooling by pressurized air. For many solvents, the superboiling temperature under microwave irradiation, in a closed vessel, can be 10–40 °C higher than their classical boiling points [15]. Then, the suspension was vacuum filtered over Chromafil® PET 20/25 (0.2 µm pore size, Machery-Nagel AG, Oensingen, Switzerland) into dark glass vials and the extraction solvent (water) was freeze-dried by lyophilisation (VirTis, Gardiner, NY, USA). The dried samples were carefully packed in an airtight polyethylene bag at –20 °C until further chromatographic analyses.

3.4. HPLC-PDA Method for the Analysis of Phenolic Compounds

HPLC-PDA phenolic determination followed a published and validated method [16]. All dried extracts were weighted, dissolved in mobile phase and injected (20 µL) into the HPLC-PDA system. Data are displayed as mean ± standard deviation (SD) of three independent measurements. The identification of each phenolic compound was assessed considering UV-Vis spectra and retention time compared to pure standard compounds. The quantification was carried out using an external

standard method with commercially available and high purity phenolics. Analytical figures of merit on the validation of this method were corroborated after evaluation of matrix interferences. Thus, this method was reasonably sensitive to detect the compounds in real matrices.

4. Color Evaluation

Colorimetric CIELAB parameters, namely L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} and h_{ab} , are defined by the “Commission Internationale de l’Eclairage” and determined on the ground *A. mollis* aerial parts using a colorimeter X-Rite SP-62 (X-Rite Europe GmbH, Regensdorf, Switzerland), characterized by a D65 illuminant and an observer angle of 10° . Three color parameters were assessed: L^* (lightness), a^* , greenness ($-a^*$) or redness ($+a^*$) and b^* , blueness ($-b^*$) or yellowness ($+b^*$). Cylindrical coordinates C^*_{ab} and h_{ab} were extrapolated from a^* and b^* following the equations $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ [17]. The dried aerial parts of the plant were firstly powdered (50 mesh) in a commercial blender (MJ-220BP01A, Guangdong Co., Ltd., Guangdong, China) for homogeneity. The obtained powders were divided into four aliquots with a little different apparent granulometry and analyzed. The results are given as mean value \pm standard deviation (SD).

5. Pigment Determination

The total carotenoids and chlorophylls a and b determination for the *Atriplex* sample was carried out according to Solovchenko and co-workers (2001) with slight modifications [18,19]. The sample was powdered (50 mesh) with mortar and pestle in 5 mL of chloroform-methanol (2:1, *v/v*) mixture containing 0.01% BHT to limit peroxidation. In addition, homogenization was performed with MgO (50 mg) to inhibit chlorophyll pheophytinization. After filtration, distilled water was added in order to reach the 20% of the total extract volume. Lastly, the suspension was centrifuged for 18 min at $3000 \times g$ at 10°C to achieve the phase separation. Absorption spectrum of the chloroform phase was registered in the range of 350–800 nm with a Beckman Coulter DU 800 instrument with a spectral resolution of 0.5 nm at 20°C . Both chlorophyll and the total carotenoid amounts were evaluated according to Wellburn (1994) [20]. Data are displayed as mg/g dry weight (DW) \pm SD ($n = 3$).

6. Results and Discussion

6.1. HPLC Analysis of Hydroalcoholic Extract and Subfractions

In order to improve the extraction methods and the yield of the different secondary metabolites extracted by medicinal plants, we have carried out this analysis in which the polyphenols of the different hydroalcoholic extracts and their isolated fractions could be qualified and quantified ($\mu\text{g/g}$ DW \pm SD). In Table 1, we reported only the subfractions containing at least one of the phenolic compounds detectable by our chromatographic procedure.

Extracts at increasing polarity (chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol) were obtained from the ground aerial parts of *A. mollis* and analyzed by our simple, accurate (precise and true) HPLC-PDA method. These constituents belong to three important chemical classes: phenolic acids, monoterpenes and flavonoids. The ethyl acetate extract was the most characterized in phenolic compounds by comparison with the other two extracts. It was characterized by high amounts of *p*-hydroxy benzoic acid, rutin and catechin with the highest concentration in some isolated fractions (115 $\mu\text{g/g}$, 65 $\mu\text{g/g}$, and 34 $\mu\text{g/g}$, respectively). It is also worth noting that epicatechin, 3-OH,4-MeO benzoic acid and benzoic acid were identified in three subfractions of ethyl acetate extract at a lower extent. Sixteen compounds were detected in the fractions isolated in the chloroform extract, with epicatechin, *p*-coumaric acid and vanillic acid at the highest concentration (158 $\mu\text{g/g}$, 24.9 $\mu\text{g/g}$, and 42.2 $\mu\text{g/g}$, respectively). Carvacrol was also identified in the chloroform extract with the concentration of 0.44 $\mu\text{g/g}$ in the fraction F7. Finally, eight compounds were assessed in the *n*-butanol (*n*-BuOH) extract, which proved to be the less enriched in phenolic compounds, among them, the flavonoid rutin (12.3 $\mu\text{g/g}$), the phenolic acid 3-hydroxy benzoic acid (1.5 $\mu\text{g/g}$)

and the monoterpene carvacrol (0.15 µg/g). Collectively, a specific phenolic profile with predominant amounts of rutin, 3-hydroxy benzoic acid and chlorogenic acid was evidenced by these analyses.

Table 1. Qualitative and quantitative phenolics profile of the main subfractions of *Atriplex mollis* aerial parts extract by maceration. In the table, the mean values and standard deviations of three independent measures are reported.

Identified Compound	Phenolics Content (µg/g DW ± SD)						
	F4 (CHCl ₃)	F7 (CHCl ₃)	F13 (CHCl ₃)	F6 (EtOAc)	F10 (EtOAc)	F16 (EtOAc)	<i>n</i> -BuOH
Gallic acid				0.23 ± 0.02	0.70 ± 0.07	1.5 ± 0.1	0.84 ± 0.07
Catechin			9.9 ± 0.9	0.94 ± 0.08	2.7 ± 0.1	34.0 ± 2.2	0.80 ± 0.06
Chlorogenic acid							1.0 ± 0.1
<i>p</i> -Hydroxy-benzoic acid	0.36 ± 0.04			115 ± 8		0.49 ± 0.05	
Vanillic acid	0.46 ± 0.06	7.9 ± 0.7	42.2 ± 1.3	1.3 ± 0.1	0.48 ± 0.05	7.7 ± 0.7	
Epicatechin	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.2	158 ± 10	2.2 ± 0.3	4.0 ± 0.3	8.6 ± 0.8	0.31 ± 0.02
Syringic acid		2.2 ± 0.1	0.37 ± 0.03				
3-Hydroxy benzoic acid			0.19 ± 0.02				1.5 ± 0.1
3-OH,4-MeO benzoic acid	0.53 ± 0.05		1.9 ± 0.2	0.23 ± 0.02	6.0 ± 0.5	4.1 ± 0.4	
<i>p</i> -Coumaric acid	24.9 ± 1.2			20.3 ± 2.3			
Rutin				9.1 ± 0.8	65.1 ± 5.3	1.0 ± 0.1	12.3 ± 0.2
Sinapinic acid			8.6 ± 0.8	1.8 ± 0.1			
<i>t</i> -Ferulic acid				1.8 ± 0.2	0.93 ± 0.08		
Naringin	0.17 ± 0.02	5.8 ± 0.3	6.3 ± 0.2	0.17 ± 0.01		9.6 ± 0.8	
2,3-Dimethoxy-benzoic acid			0.28 ± 0.02				
Benzoic acid	2.3 ± 0.1	2.6 ± 0.3	12.6 ± 1.5	3.8 ± 0.4	0.25 ± 0.02	7.4 ± 0.5	
<i>o</i> -Coumaric acid	0.28 ± 0.02		0.17 ± 0.01			0.84 ± 0.07	
Quercetin						0.96 ± 0.08	
<i>t</i> -Cinnamic acid		0.51 ± 0.04					
Naringenin	0.16 ± 0.01	7.2 ± 0.7					0.11 ± 0.01
Carvacrol	0.19 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.28 ± 0.02				0.15 ± 0.01
Total	31.9	29.8	241	157.5	80.1	76.3	17.1

DW: dry weight.

6.2. HPLC Analysis of Supercritical Carbon Dioxide Extracts

In order to compare qualitative and quantitative results from different extraction methods, we also performed supercritical fluid extraction. The SFE-derived extract quality was evaluated in terms of dry extract yield and recovery of secondary metabolites from aerial parts of *A. mollis*. The SFE was carried out at fixed temperature (40 °C) to avoid phenolic degradation/oxidation and at two discrete pressure values (10 and 30 MPa). The better extraction, expressed as yield (yield 0.62% for 10 MPa and 0.82% for 30 MPa) and quantity of secondary metabolites, resulted at higher pressure (Table 2). Twelve and eleven metabolites were identified and quantified in the extracts at 10 and 30 MPa, respectively. These constituents belong to the chemical classes of phenolic acids, flavonoids and monoterpenes. Phenolic acids identified were gallic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, sinapinic acid, *t*-ferulic acid, 2,3-diMeO benzoic acid, and benzoic acid, with sinapinic acid resulting in the highest concentration (2.39 µg/g). Conversely, flavonoids were identified as catechin, epicatechin, rutin with epicatechin resulting the most abundant (0.76 µg/g). Additionally, in the 30 MPa extract an iridoid glycoside was identified—harpagoside—at concentration of 0.20 µg/g. Several investigations have found that harpagoside-containing extracts have good anti-inflammatory and analgesic activities in multiple models of acute inflammation [21,22]. Collectively, SFE provided a relatively small amount of phenolic compounds due to the non-polar nature of the solvent.

Table 2. Qualitative and quantitative phenolics profile of *Atriplex mollis* aerial part extracts by supercritical fluid extraction.

Identified Compound	Phenolics Content ($\mu\text{g/g DW} \pm \text{SD}$)	
	40 °C, 10 MPa	40 °C, 30 MPa
Gallic acid	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Catechin	0.21 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03
Vanillic acid	0.29 \pm 0.06	1.75 \pm 0.09
Epicatechin		0.76 \pm 0.05
Syringic acid	0.14 \pm 0.02	
3-OH,4-MeO benzaldehyde	0.25 \pm 0.04	0.82 \pm 0.03
<i>p</i> -Coumaric acid	0.24 \pm 0.07	0.04 \pm 0.01
Rutin		0.06 \pm 0.01
Sinapinic acid	0.07 \pm 0.01	2.39 \pm 0.08
<i>t</i> -Ferulic acid	0.33 \pm 0.07	0.34 \pm 0.04
Naringin	0.38 \pm 0.06	
2,3-diMeO benzoic acid	0.04 \pm 0.01	0.003 \pm 0.001
Benzoic acid		0.08 \pm 0.01
Harpagoside		0.20 \pm 0.05
Naringenin	0.06 \pm 0.01	
Total	2.05	6.78

DW: dry weight.

6.3. HPLC Analysis of Microwave-Assisted Extracts

Lastly, keeping constant the use of a non-toxic solvent, we performed MAE to study the recovery of selected metabolites from *A. mollis* aerial parts. We carried out the extraction with water as polar solvent (solvent volume = 20 mL, material amount 1 g, extraction time = 10 min) to evaluate the best extraction temperature ranging from 40–120 °C [15]. We observed that the best extraction yield was obtained at 80 °C for 10 min (yields between 8.3–10.1% of DW). Shortening (5 min) or prolonging (15 min) the extraction time at 80 °C did not significantly improve the total phenolic yield.

Twelve compounds were identified and are listed in Table 3. As can be seen, the analyzed extract comprehended a large number of compounds belonging to phenolic acid and flavonoid classes. Among these flavonoids, rutin was identified to be the most abundant (486 $\mu\text{g/g}$, as expected using water as the solvent), while among phenolic acids *p*-OH benzoic, vanillic, *p*-coumaric, sinapinic, and *t*-ferulic acids were identified, with vanillic acid and *t*-ferulic acid having the highest concentration (125 $\mu\text{g/g}$ and 95.5 $\mu\text{g/g}$, respectively).

Despite the fact that gallic acid, *t*-ferulic acid and rutin could be also recovered better at higher temperature (100 °C), up to 80 °C other compounds were detected in a considerable quantity such as catechin, *p*-OH benzoic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid and sinapinic acid. Naringenin and catechin were found only at lower temperature (40 °C), whereas benzoic acid could be extracted only at higher temperature (120 °C) [15]. Collectively, most of these phenolic compounds were detected in other *Atriplex* spp. (e.g., aerial parts of *A. halimus*), but a direct qualitative comparison is difficult because of the different extraction conditions reported in the literature [23–26].

The role of secondary plant metabolites such as phenolic acids and flavonoids in the prevention of human diseases has been widely investigated. In detail, vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) was shown to display an interesting pharmacological activity. Experimental studies have provided evidence of effectiveness on cardiovascular [27], gastrointestinal [28] and liver diseases [29] by means of inhibition of inflammation markers synthesis and release. Among flavonoids, rutin was also shown to exert antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, nephroprotective, and neuroprotective activities [30–33].

Table 3. Qualitative and quantitative analysis of the phenolics profile of *Atriplex mollis* microwave-assisted extracts.

Identified Compound	Phenolics Content ($\mu\text{g/g DW} \pm \text{SD}$)						
	40 °C, 10 min, Water	60 °C, 10 min, Water	80 °C, 10 min, Water	100 °C, 10 min, Water	120 °C, 10 min, Water	80 °C, 5 min, Water	80 °C, 15 min, Water
Gallic acid	59.6 \pm 1.6	58.7 \pm 1.8	21.9 \pm 1.5	76.6 \pm 5.2	63.9 \pm 4.2		
Catechin			55.5 \pm 3.8				
Chlorogenic acid	30.8 \pm 2.4						
<i>p</i> -Hydroxy-benzoic acid	34.7 \pm 3.5	37.9 \pm 1.8	19.8 \pm 1.3	5.16 \pm 0.09			6.18 \pm 0.09
Vanillic acid	115 \pm 12	8.62 \pm 0.9	125 \pm 13	16.4 \pm 0.8	16.8 \pm 0.9		137 \pm 11
3-OH,4-MeOH benzaldehyde					21.8 \pm 1.5		
<i>p</i> -Coumaric acid		15.9 \pm 1.1	12.7 \pm 1.0	14.9 \pm 1.1	16.3 \pm 1.7	5.42 \pm 0.08	6.23 \pm 0.09
Rutin	377 \pm 29	411 \pm 32	486 \pm 39	520 \pm 45	521 \pm 40	440 \pm 34	552 \pm 48
Sinapinic acid	23.3 \pm 1.6		15.6 \pm 1.0	19.5 \pm 1.3	26.5 \pm 2.1	18.3 \pm 1.8	18.9 \pm 1.2
<i>t</i> -Ferulic acid	80.8 \pm 5.7	81.6 \pm 4.9	95.5 \pm 8.1	109 \pm 14	112 \pm 10	94.3 \pm 8.3	107 \pm 11
Naringin	41.9 \pm 2.5						
Benzoic acid					27.9 \pm 8.9		
Total	762.89	613.50	832.56	761.58	805.94	558.17	784.63

DW: dry weight.

6.4. Color Analysis

Dried aerial parts of *A. mollis* were submitted to colorimetric evaluation adopting CIELAB coordinates, which are directly useful for color evaluation by human vision. In this work, the aim of the reflectance colorimetry was limited to giving a first characterization of a new matrix. For this reason, the aerial parts of the plant, only powdered, were submitted to this fast and cheap analysis. The samples showed non-homogeneous coloring, in which at least three different color shadings could be observed. There was a light brown color typical of ligneous material, a clear gray-green or beige in larger parts and a lighter green in thinner parts. The mortar-homogenized samples did not show the brown color anymore, but a more brilliant green color was accompanied by orange shades corresponding to slightly higher L^* values (66 vs. 62) and to a slight increase of the reflectance curves. The mean value \pm standard deviation is reported in Table 4. The relatively high value of b^* is probably related to the carotenoid content (see paragraph below), which entirely accounts for the color purity expressed by the chroma parameter. It is well known that color of natural matrices could be influenced by different factors, and that drying and storage conditions could determine loss of chlorophylls and/or other pigments [34,35].

In fact, although chlorophylls were detected in the fresh samples, they were not yet visible in the dried ones, in term of green color. However, the total lack of information about color quality of aerial parts of plants in general, and of this matrix in particular, only allows us to give this preliminary information about colorimetric parameters and the relative reflectance curve (Figure 2).

Table 4. Colorimetric data of *A. mollis* aerial parts using an independent color-space device.

Color Parameters	Mean Value \pm SD
L^*	64.1 \pm 2.2
a^*	1.0 \pm 0.4
b^*	14.2 \pm 0.5
C^*_{ab}	14.2 \pm 0.5
h_{ab}	85.9 \pm 1.5

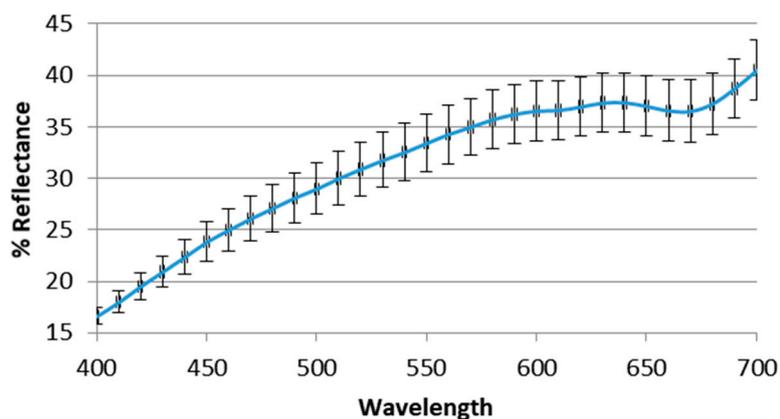


Figure 2. Reflectance graph of *A. mollis* aerial parts.

6.5. Pigments Determination (Total Carotenoids, Chlorophyll a and Chlorophyll b)

The amounts of total carotenoids, chlorophyll a (Chl a) and chlorophyll b (Chl b) in the organic phase of the sample from dried aerial parts are reported in Figure 3 and expressed as μg per gram of DW. The Chl a concentration proved to be double that of Chl b, as was to be expected given the importance of chlorophyll a in photosynthesis. The Chl a/b ratio value was 2.11, confirming the high content of Chl a characteristic of heliophytic species. The Chl a/b ratio is directly related not only to light but also to soil nitrogen availability [36]. Biological properties shown by chlorophylls and their derivatives consistent with cancer prevention include antioxidant and antimutagenic activity. Moreover, chlorophylls are also used in industries as food-coloring agents and are known as natural green 3 [37].

Total carotenoid content was one-sixth of that of chlorophyll a ($0.0261 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $0.163 \pm 0.0038 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively) (Figure 3). In general, high carotenoid contents are detected for sun-exposed plants, because these molecules protect them from photo-inhibition [38].

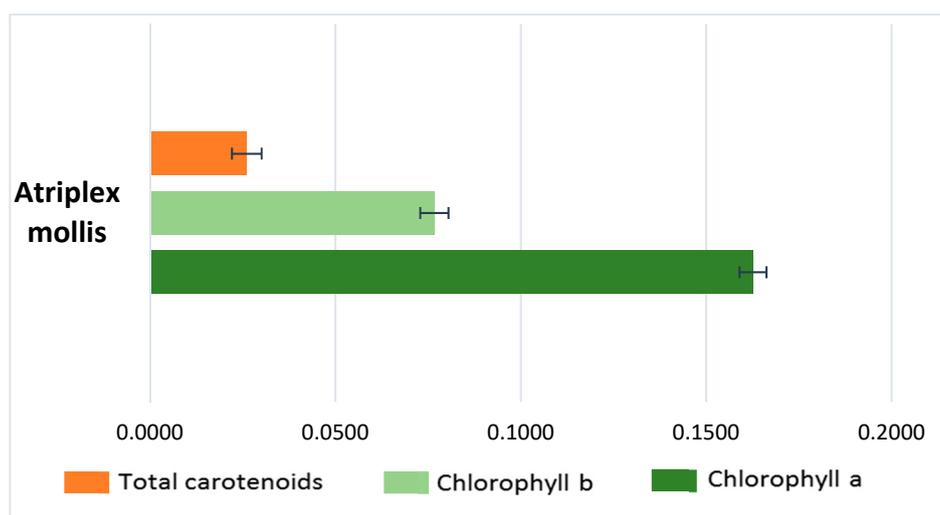


Figure 3. Pigment content in *A. mollis* aerial parts extract ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW \pm SD).

7. Conclusions

This research attempted to predict for the first time the phenolics multicomponent pattern of *Atriplex mollis* aerial parts subjected to different extraction techniques and monitored by HPLC-PDA. Most of the identified and quantified compounds, including flavonoids, monoterpenes and phenolic

acids, are known for their pharmacological effects on human health. Microwave-assisted extraction was shown to recover a huge number of compounds, especially rutin, *t*-ferulic acid and gallic acid, within a shorter time and without degrading the matrix up to 80 °C. Pigment analysis explored the quantitative ratios among chlorophylls (both a and b) and carotenoids. In addition, color evaluation, based on CIELAB parameters, was applied for the first time to this endemic and spontaneous Algerian plant. Further investigations may lead to isolation of other bioactive compounds followed by a rational screening of their pharmacological activity helpful for the assessment of a real nutraceutical potential.

Author Contributions: F.B. and D.S. conceived and designed the experiment part, writing the final manuscript; S.B. collected the material and prepared it for the analyses, N.B., L.M., and L.Z. carried out the different extractions; M.L. and F.C. carried out the HPLC analyses. S.C. (Stefania Cesa) and S.C. (Simone Carradori) performed the color determination. A.M.G. and S.C. (Simone Carradori) evaluated the pigment content. C.C. contributed with reagents and materials.

Funding: This research was funded by FAR-MIUR grant, University “G. d’Annunzio” of Chieti-Pescara, Chieti, Italy.

Conflicts of Interest: Authors declare no competing financial interests.

References

1. Glenn, E.; Brown, J. Effects of soil salt levels on the growth and water use efficiency of *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) varieties in drying soil. *Am. J. Bot.* **1998**, *85*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Smail-Saadoun, N. Anatomical adaptation of Algerian Sahara Chenopodiaceae to severe drought conditions. *Sécheresse* **2005**, *16*, 121–124.
3. Ortíz-Dorda, J.; Martínez-Mora, C.; Correal, E.; Simón, B.; Cenis, J.L. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean basin. *Ann. Bot.* **2005**, *95*, 827–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Goldhirs, A.G.; Hankamer, B.; Lirs, S.H. Hydroxyproline and proline content and cell wall of sunflower, peanut and cotton under salt stress. *Plant Sci.* **1990**, *69*, 27–32. [[CrossRef](#)]
5. Belkheiri, O.; Mulas, M. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *86*, 17–28. [[CrossRef](#)]
6. Hassine, A.B.; Lutts, S. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J. Plant Physiol.* **2010**, *167*, 1448–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Glenn, E.P.; Nelson, S.G.; Ambrose, B.; Martinez, R.; Soliz, D.; Pabendinskas, V.; Hultine, K. Comparison of salinity tolerance of three *Atriplex* spp. in well-watered and drying soils. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *83*, 62–72. [[CrossRef](#)]
8. Katembe, W.J.; Ungar, I.A.; Mitchell, J.P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). *Ann. Bot.* **1998**, *82*, 167–175. [[CrossRef](#)]
9. Ksouri, R.; Ksouri, W.M.; Jallali, I.; Debez, A.; Magné, C.; Hiroko, I.; Abdelly, C. Medicinal halophytes: Potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 289–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Krishchenko, V.P.; Rotar, A.I.; Zadnipyryanyi, Yu.F.; Kosorukov, M.L.; Pratov, U.; Anofrina, N.D. Chemical composition and nutritive value of plants of the family Chenopodiaceae of a Libyan rangeland massif. *Izv. Timiryazevskoi Sel'skokhozyaistvennoi Akad.* **1984**, *4*, 38–45.
11. Ramani, B.; Zorn, H.; Papenbrock, J. Quantification and fatty acid profiles of sulfolipids in two halophytes and a glycophyte grown under different salt concentrations. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59*, 835–842. [[CrossRef](#)]
12. Agati, G.; Biricolli, S.; Guidi, L.; Ferrini, F.; Fini, A.; Tattini, M. The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 204–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sun, X.; Gao, Y.; Wang, D.; Chen, J.; Zhang, F.; Zhou, J.; Yan, X.; Li, Y. Stoichiometric variation of halophytes in response to changes in soil salinity. *Plant Biol.* **2017**, *19*, 360–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mellado, M.; Rodriguez, A.; Lozano, E.A.; Duenez, J.; Aguilar, C.N.; Arevalo, J.R. The food habits of goats on rangelands with different amounts of four wing saltbush (*Atriplex canescens*) cover. *J. Arid Environ.* **2012**, *84*, 91–96. [[CrossRef](#)]

15. Chemat, F.; Esveld, E. Microwave super-heated boiling of organic liquids: Origin, effect and application. *Chem. Eng. Technol.* **2001**, *24*, 735–744. [[CrossRef](#)]
16. Mollica, A.; Locatelli, M.; Macedonio, G.; Carradori, S.; Sobolev, A.P.; De Salvador, R.F.; Monti, S.M.; Buonanno, M.; Zengin, G.; Angeli, A.; et al. Microwave-assisted extraction, HPLC analysis, and inhibitory effects on carbonic anhydrase I, II, VA, and VII isoforms of 14 blueberry Italian cultivars. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31* (Suppl. 4), 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Clydesdale, F.M.; Ahmed, E.M. Colorimetry-methodology and applications. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, *10*, 243–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Solovchenko, A.E.; Chivkunova, O.B.; Merzlyak, M.N.; Reshetnikova, I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Russ. J. Plant Physiol.* **2001**, *48*, 693–700. [[CrossRef](#)]
19. Boutaoui, N.; Zaiter, L.; Benayache, F.; Benayache, S.; Carradori, S.; Cesa, S.; Giusti, A.M.; Campestre, C.; Menghini, L.; Innosa, D.; et al. Qualitative and quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules* **2018**, *23*, 463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wellburn, A. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 307–313. [[CrossRef](#)]
21. Ferrante, C.; Recinella, L.; Locatelli, M.; Guglielmi, P.; Secci, D.; Leporini, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Martinotti, S.; Brunetti, L.; et al. Protective effects induced by microwave-assisted aqueous *Harpagophytum* extract on rat cortex synaptosomes challenged with amyloid β -peptide. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 1257–1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Locatelli, M.; Ferrante, C.; Carradori, S.; Secci, D.; Leporini, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Recinella, L.; Orlando, G.; Martinotti, S.; et al. Optimization of aqueous extraction and biological activity of *Harpagophytum procumbens* root on ex vivo rat colon inflammatory model. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 937–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Godevac, D.; Stanković, J.; Novaković, M.; Anđelković, B.; Dajić-Stevanović, Z.; Petrović, M.; Stanković, M. Phenolic compounds from *Atriplex littoralis* and their radiation-mitigating activity. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2198–2204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ben Nejma, A.; Znati, M.; Nguir, A.; Daich, A.; Othman, M.; Lawson, A.M.; Ben Jannet, H. Phytochemical and biological studies of *Atriplex inflata* f. Muell.: Isolation of secondary bioactive metabolites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1064–1074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kamal, Z.; Ullah, F.; Ayaz, M.; Sadiq, A.; Ahmad, S.; Zeb, A.; Hussain, A.; Imran, M. Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata* L.: Potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biol. Res.* **2015**, *48*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Clauser, M.; Dall'Acqua, S.; Loi, M.C.; Innocenti, G. Phytochemical investigation on *Atriplex halimus* L. from Sardinia. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 1940–1944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Stanely Mainzen Prince, P.; Rajakumar, S.; Dhanasekar, K. Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *688*, 233–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kim, S.J.; Kim, M.C.; Um, J.Y.; Hong, S.H. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules* **2010**, *15*, 7208–7217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Kobayashi, M.; Tamesada, M.; Yagi, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1215–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Selloum, L.; Bouriche, H.; Tigrine, C.; Boudoukha, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2003**, *54*, 313–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Alinejad, B.; Ghorbani, A.; Sadeghnia, H.R. Effects of combinations of curcumin, linalool, rutin, safranal, and thymoquinone on glucose/serum deprivation-induced cell death. *Avicenna J. Phytomed.* **2013**, *3*, 321–328. [[PubMed](#)]
32. Sadeghnia, H.R.; Yousefsani, B.S.; Rashidfar, M.; Boroushaki, M.T.; Asadpour, E.; Ghorbani, A. Protective effect of rutin on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity. *Renal Fail.* **2013**, *35*, 1151–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Janbaz, K.H.; Saeed, S.A.; Gilani, A.H. Protective effect of rutin on paracetamol-and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 557–563. [[CrossRef](#)]
34. Cesa, S.; Carradori, S.; Bellagamba, G.; Locatelli, M.; Casadei, M.A.; Masci, A.; Paolicelli, P. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chem.* **2017**, *232*, 114–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cesa, S.; Casadei, M.A.; Cerreto, F.; Paolicelli, P. Infant milk formulas: Effect of storage conditions on the stability of powdered products towards autoxidation. *Foods* **2015**, *4*, 487–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ivanov, L.A.; Ivanova, L.A.; Ronzhina, D.A.; Yudina, P.K. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural. *Russ. J. Plant Physiol.* **2013**, *60*, 812–820. [[CrossRef](#)]
37. Solymosi, K.; Mysliwa-Kurdziel, B. Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1194–1222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sobolev, A.P.; Mannina, L.; Capitani, D.; Sanzò, G.; Ingallina, C.; Botta, B.; Fornarini, S.; Crestoni, M.E.; Chiavarino, B.; Carradori, S.; Locatelli, M.; et al. A multi-methodological approach in the study of Italian PDO “Cornetto di Pontecorvo” red sweet pepper. *Food Chem.* **2018**, *255*, 120–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Limited *Atriplex mollis* Desf. aerial parts samples are available from the authors of the Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d’Aïn El Bey, 25000 Constantine, Algérie.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).