



**HAL**  
open science

# Eco-extraction et valorisation des métabolites primaires et secondaires des différentes parties de *Pistacia lentiscus*.

Emna Chaabani

## ► To cite this version:

Emna Chaabani. Eco-extraction et valorisation des métabolites primaires et secondaires des différentes parties de *Pistacia lentiscus*.. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon; Université de Carthage (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019AVIG0714 . tel-02519270

**HAL Id: tel-02519270**

**<https://theses.hal.science/tel-02519270v1>**

Submitted on 25 Mar 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# REPUBLIQUE TUNISIENNE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE

UNIVERSITE DE CARTHAGE

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

FACULTE DES SCIENCES DE BIZERTE

ED536 - Sciences et Agrosociences

Ecole Doctorale Sciences Biologiques



## Thèse de doctorat en cotutelle

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et de l'Université de Carthage

Spécialité : Sciences Biologiques

**Eco-extraction et valorisation des métabolites primaires et secondaires des différentes parties de *Pistacia lentiscus***

Par

**Emna CHAABANI**

Thèse présentée et soutenue à la Faculté des Sciences de Bizerte, le 29 Octobre 2019 :

Composition du jury :

Mme/M. Prénom NOM, Titre, Etablissement

Mme. Naziha BOUGHANMI, Professeur, Faculté des sciences de Bizerte

M. Christian MAGNE, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Mme/M. Prénom NOM, Titre, Etablissement

Mme/M. Prénom NOM, Titre, Etablissement

M. Riadh KSOURI, Professeur, Laboratoire LPAM

Mme. Maryline ABERT VIAN, MC. HDR, Laboratoire GREEN

Président(e)

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse



# Dédicaces

*À mes parents et mon mari,*

*Pour avoir vécu avec moi,*

*Les bons et les durs moments de la thèse,*

*À Mes deux sœurs Nawel et Wided,*

*À Mon frère Mohamed,*

*Pour votre présence et votre soutien,*

*À mon petit trésor Zakareya.*

## *Remerciements*

*Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales du centre de Biotechnologie de Borj Cédria et le laboratoire GREEN de l'Université d'Avignon.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Christian Magné** et la **Pr. Naziha Boughanmi** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*J'adresse ma grande gratitude et toute ma considération à **Pr. Farid Chemat**, Directeur du laboratoire GREEN de m'avoir accueilli au sein de son équipe et qui a mis à ma disposition tous les moyens pour mener à bien mes travaux de recherche. Je voulais également le remercier pour ses conseils pertinents, ses critiques, son exigence, sa grande patience et ses impatiences qui ont largement contribué à l'amélioration de ce travail.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à mes deux directeurs de thèse :*

***Pr. Riadh Ksouri** qui m'a donnée l'opportunité de faire cette thèse et me faciliter la procédure d'accès au laboratoire GREEN de l'Université d'Avignon. Je vous remercie également pour votre aide, vos conseils, votre confiance et votre support durant mon parcours.*

*De même, j'adresse mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse **Dr HDR Maryline Abert Vian** qui a été toujours présente durant mon travail. Sa gentillesse, sa rigueur scientifique et ses conseils ont toujours été très constructifs et m'ont permis de bien avancer dans la thèse. Je vous remercie également pour votre accompagnement et votre suivi durant mon travail en Tunisie.*

*Je tiens à dire un grand merci à l'**Ing. Christian Ginies** et à la **MCF. Catherine Defoort** pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la partie métabolomique.*

*Je remercie également, l'**Ing Romain Bott** de l'INRA d'Avignon pour les analyses de spectrométrie de masse en phase gazeuse.*

*Je remercie tous les membres et collègues de l'équipe Green, en particulier la **Dr. Anne Gaëlle Sicaire** et la **Dr. Cassandra Breil** pour leurs aides et leurs disponibilités au quotidien.*

*Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire LPAM : **Dr. Soumaya Bourgou** et **Sarra Dakhlaoui** pour leurs aides dans l'analyse de l'activité anti-inflammatoire.*

*Un « Merci » à mon amie **Boutheina Khadraoui** pour les bons moments qu'on a partagé ensemble à Avignon.*

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

*Je ne pouvais finir sans remercier mon mari **Seif Houissa** pour m'avoir aidé à surmonter tous les obstacles et les moments difficiles. Merci pour l'amour inconditionnel, l'encouragement continu, la patience qui m'ont soutenu tout au long de mon chemin.*

*Du simple lecteur aux personnes qui ont consacré de leur temps et de leur énergie, pour m'aider dans ce travail, à tous je voudrais adresser mes remerciements.*

## Résumé

Le développement de la chimie verte, l'épuisement des ressources pétrolières et la prise de conscience des risques liée à l'utilisation des solvants pétroliers ont conduit à la recherche de nouvelles alternatives pour réduire l'utilisation des solvants nocifs non renouvelables tels que l'hexane. L'objectif de cette thèse a donc consisté en la recherche de solvants alternatifs plus respectueux de la santé et de l'environnement pour l'éco-extraction des composés phénoliques et des acides gras à partir des graines de *Pistacia lentiscus* et des arômes à partir de ces feuilles. Pour ce faire, une première approche *in silico* basée sur des outils de prédictions tels que COSMO-RS a été complétée par une approche expérimentale associée à des traitements chimiométriques. Cette démarche a conduit à la sélection de quatre solvants verts, le MeTHF pour l'extraction des acides gras, l'EtOAc pour l'extraction des arômes, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) pour l'extraction des anthocyanes. Par la suite, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait lipidique obtenu par le MeTHF et l'activité antioxydante des extraits aromatiques et des extraits phénoliques de *P. lentiscus* ont été évaluées *in vitro*. Ces travaux ont montré que l'huile végétale a présenté une activité anti-inflammatoire potentielle, inhibant de 91,9% la libération d'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>) dans les macrophages RAW 264,7. De plus, les résultats ont permis de mettre en évidence la richesse des fruits en antioxydants. En effet, l'extrait obtenu par l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) a montré une activité antiradicalaire (IC<sub>50</sub> = 2,39 µg/ml) comparable à celle de l'antioxydant de synthèse le Trolox (IC<sub>50</sub> = 2,56 µg/ml). En outre, l'extrait aromatique de *P. lentiscus* obtenu avec l'EtOAc a présenté une activité antiradicalaire intéressante contre le DPPH (IC<sub>50</sub> = 5,82 µg/ml).

**Mots clés :** *Pistacia lentiscus*, solvants alternatifs, éco-extraction, COSMO-RS, huile végétale, arômes, antioxydants, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante.

## Abstract

The development of Green chemistry, the depletion of petroleum resources and the awareness of the risks associated to the use of petroleum solvents have led to search a new alternatives to reduce the use of non-renewable petrochemical harmful solvents such as hexane. The objective of this thesis has consisted in the research of alternative solvents more respectful of health and environment for the eco-extraction of fatty acids and phenolic compounds from *Pistacia lentiscus* fruits and aromas from these leaves. A first *in silico* approach using the COSMO-RS predictions was supplemented by an experimental approach paired with chemometrics analysis. This led to selection of four alternative solvents, MeTHF for oil extraction, EtOAc for aromas extraction, EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) for polyphenols and flavonoids extraction and EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) for anthocyanins extraction. Subsequently, the anti-inflammatory activity of MeTHF lipid extract and the antioxidant activity of aromatic and phenolic extracts of *P. lentiscus* were evaluated *in vitro*. Results showed that vegetable oil exhibited a potential anti-inflammatory activity, inhibiting by 91.9% the release of (nitric oxide) NO in RAW 264.7 macrophages. In addition, results highlighted the richness of the fruits in antioxidants. In fact, EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) extract showed a good antiradical activity (IC<sub>50</sub> = 2.39 µg/ml) comparable to that of the synthetic antioxidant Trolox (IC<sub>50</sub> = 2.56 µg / ml). In addition, the aromatic extract obtained with EtOAc showed an interesting anti-radical activity against DPPH (IC<sub>50</sub> = 5.82 µg/ml).

**Keywords:** *Pistacia lentiscus*, alternative solvents, eco-extraction, COSMO-RS, vegetable oil, aromas, antioxidants, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.



## Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Bibliographie .....	3
I. Les solvants alternatifs.....	4
I.1. Contexte .....	4
I.2. Panorama des solvants d'extraction des produits naturels.....	6
I.3. Les outils d'aide à la décision pour le screening des solvants alternatifs.....	15
I.4. Apport de la métabolomique et de l'analyse chimométrique au choix de solvants alternatifs .....	18
II. <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	21
II.1. Classification.....	21
II.2. Description botanique .....	22
II.3. Aire de répartition de l'espèce <i>Pistacia Lentiscus</i> .....	23
II.4. Composition chimique .....	23
II.5. Utilisations et vertus traditionnelles .....	26
II.6. Activités biologiques et pharmacologiques .....	28
II.7. Applications industrielles.....	31
Chapitre II : Matériel et méthodes .....	33
I. Matériel végétal .....	34
II. La méthodologie .....	34
III.1. Les huiles végétales .....	34
III.2. Les arômes.....	37
III.3. Les antioxydants des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	40
III.4. Les simulations COSMO-RS .....	42
III.5. Analyses des activités biologiques .....	44
Chapitre III. L'huile végétale des fruits de <i>Pistacia Lentiscus</i> : éco-extraction, profilage métabolique et activité anti-inflammatoire .....	47
I. Introduction .....	48
II. Approche <i>in silico</i> pour le screening des solvants alternatifs: les simulations COSMO-RS .....	48
III. Approche expérimentale pour le screening des solvants alternatifs .....	51
III.2. Analyse de la composition lipidique par CPG-FID .....	54
III.3. Rendements d'extraction .....	58
III.4. L'approche <i>in silico</i> versus l'approche expérimentale .....	59

IV. L'activité anti-inflammatoire .....	60
V. Conclusion.....	62
<b>Chapitre IV : Eco-extraction des arômes à partir des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> en utilisant des agro-solvants : simulations COSMO-RS et analyse métabolomique.....</b>	<b>63</b>
I. Introduction .....	64
II. L'approche <i>in silico</i> : les simulations COSMO-RS .....	65
III. L'approche expérimentale : les analyses GC-MS.....	67
III.1. Analyse de la composition de l'huile essentielle et des extraits aromatiques des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	67
III.1.1. Composition chimique de l'huile essentielle .....	67
III.1.2. Composition chimique des extraits aromatiques .....	67
IV. L'approche métabolomique.....	71
V. L'approche <i>in silico</i> versus l'approche expérimentale .....	77
VI. L'activité anti-oxydante .....	79
VI.1. Activité antiradicalaire contre le DPPH .....	80
VI.2. Activité inhibitrice du blanchiment de la $\beta$ -carotène.....	81
VII. Conclusion.....	81
<b>Chapitre V : Effet du solvant d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et sur l'activité antioxydante des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> .....</b>	<b>83</b>
I. Introduction .....	84
II. Etude <i>in silico</i> : simulation COSMO-RS.....	85
III. Rendements d'extraction .....	87
IV. Variabilité des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en anthocyanes en fonction du solvant d'extraction.....	88
IV.1. Teneurs en polyphénols totaux .....	88
IV.2. Teneurs en flavonoïdes totaux .....	89
IV.3. Teneurs en anthocyanes totaux.....	90
V. Activité antioxydante .....	91
VI. Analyse statistique.....	92
VI.1. Matrice de corrélation .....	92
VI.2. Choix des composantes principales .....	93
VI.3. Définition des composantes principales .....	93
VI.4. Analyse de l'ACP .....	94
VII. Identification des composés phénoliques par CLHP.....	95
VIII. Conclusion.....	97

Sommaire

<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>98</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>101</b>

## Liste des abréviations

**EHS** : Environnement, Health, Safety  
**COV**: Composés Organiques Volatils  
**COVNM** : Composés Organiques Volatils Non Méthanique  
**REACH** : Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals  
**GRAS**: Generally Recognized as Safe  
**DES**: Deep Eutectic Solvent  
**NADES**: Natural Deep Eutectic Solvents  
**FDA**: Food and Drug Administration  
**RED**: Relative Energy Difference  
**COSMO-RS**: COnductor like Screening MOdel for Real Solvents  
**GPS**: Global Positioning System  
**EtOH**: Ethanol  
**IPA**: Isopropanol  
**EtOAc**: Ethyl acétate  
**DMC**: Diméthyl carbonate  
**MeTHF**: méthyltetrahydrofuran  
**CPME**: cyclopentyl methyl ether  
**NO** : Nitric Oxide  
**rpm** : rotation par minute  
**CPG-FID** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme  
**EMAG** : Esters Méthyliques d'Acides Gras  
**HPTLC** : chromatographie sur couche mince haute performance  
**GC-MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse  
**MAG** : Monoglycérides.  
**DAG** : Diglycérides  
**TAG** : Triacylglycérides  
**FFA** : acides gras libres  
**ACP** : Analyse en Composante Principale  
**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance  
**TPC** : teneur en polyphénols totaux  
**TFC** : teneur en flavonoïdes totaux

## Liste des figures

<b>Figure I.1.</b> Les 12 principes de la chimie verte .....	4
<b>Figure I.2.</b> Les 6 principes de l'éco-extraction (Chemat, 2015) .....	6
<b>Figure I.3.</b> Origine des biosolvants .....	10
<b>Figure I.4.</b> Sphère de solubilité de Hansen. P : soluté, S : solvant, R : rayon de la sphère de solubilité, D : distance .....	17
<b>Figure I.5.</b> Structure chimique (a) et $\sigma$ -surface (b) de l'éthyl acétate ; $\sigma$ -profil (c) et $\sigma$ -potential (d) de trois solvants typiques : hexane (apolaire), éthyl acétate (accepteur de liaison hydrogène) et méthanol (amphiprotique) .....	18
<b>Figure I.6.</b> Etapes d'une analyse métabolomique par GC-MS.....	20
<b>Figure I.7.</b> <i>Pistacia lentiscus</i> : a. fleurs, b. feuilles, c. fruits, d. résineou mastic gum.....	22
<b>Figure I.8.</b> Répartition géographique de <i>Pistacia lentiscus</i> . Noir= <i>Pistacia lentiscus</i> subsp. <i>emarginata</i> . Vert= <i>Pistacia lentiscus</i> subsp. <i>lentiscus</i> . (Al-Saghir, 2006). .....	23
<b>Figure I.9.</b> Produits commercialisés à base de <i>Pistacia lentiscus</i> . A. Huiles essentielles, B. Huiles végétales, C. Compléments alimentaire, D. Parfums.....	32
<b>Figure II. 1.</b> Extracteur Soxhlet.....	35
<b>Figure II.2.</b> Les différentes composantes de l'HPTLC .....	37
<b>Figure II.3.</b> Montage à reflux .....	38
<b>Figure II.4.</b> Broyeur IKA Ultra Turrax Tube drive.....	40
<b>Figure II.5.</b> Les différentes étapes de calculs de COSMO-RS : exemple Germacrene D. a. surface moléculaire du Germacrene D. b. Energies d'interactions de surface entre $\sigma$ - profiles du Germacrene D et des solvants. c. $\sigma$ -potential du Germacrene D et des solvants. ....	44
<b>Figure III.1.</b> Biplot de l'ACP : scores et loadings plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les valeurs $\log_{10}(X_{\text{solub}})$ des métabolites majoritaires de <i>P. lentiscus</i> dans les différents solvants testés obtenus par COSMO-RS. ....	50
<b>Figure III.2a.</b> Profils HPTLC des lipides neutres après révélation sous UV à 366nm. Track 1, 4, 7, 10 and 13) Standards: MAG, ergosterols, DAG, FFA et TAG (avec RF croissant). Volume appliqué (1, 2,5, 5, 10 et 20 $\mu$ l); Track 2 et 3: extrait d'hexane, Track 5et 6 : extrait EtOH, Track 8 et 9 : extrait EtOAC, Track 10 et 11. CPME, Track 14 et 15. MeTHF, Track 16 et 17. DMC, Track 18 et 19. IPA (volume appliqué 2 et 20 $\mu$ L). .....	52
<b>Figure III.3.</b> Biplot de l'ACP : scores et loading plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les classes de lipides analysées par HPTLC. MAG: Monoglycérides. DAG: Diglycérides. TAG: Triglycérides. FFA: acides gras libres. LYSO: Lysophosphatidilcholine. PE: Phosphatdylethanolamine. PI: phosphatidylinositol. PC: Phosphatydylcholine.....	54
<b>Figure III.4.</b> Biplot de l'ACP : scores et loading plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les profils d'acides gras analysés par CPG-FID.....	56
<b>Figure III.5.</b> Le dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique réalisé à partir des données CPG-FID. ....	57
<b>Figure III.6.</b> Rendements d'extraction de l'huile des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> par les différents agro-solvants testés et de l'hexane conventionnellement utilisé. ....	58
<b>Figure III.7.</b> La viabilité des cellules macrophage de murins Raw 264,7 traitées avec des concentrations croissantes (10, 50, 100 et 200 $\mu$ g/mL) de l'extrait lipidique MeTHF. ....	60

<b>Figure III.8.</b> Effet du traitement des cellules macrophages de murins RAW 267,4, stimulé au LPS, par des concentrations croissantes d'extrait lipidique MeTHF sur la production de l'oxyde nitrique (NO).....	61
<b>Figure IV.1.</b> Démarche utilisée pour la substitution de l'hexane par un agro-solvant.....	64
<b>Figure IV.2.</b> ACP basée sur les résultats GC-MS. (a) ACP scores plot: CP1 vs CP2; (b) ACP scores plot: CP1vs CP4. ....	71
<b>Figure IV.3. a.</b> Scores plot du modèle PLS-DA. Le cercle vert représente le groupe 1 (Hexane-EtOAc) et le cercle bleu représente le groupe 2 (EtOH, IPA, CPME, DMC et MeTHF). <b>b.</b> Test de permutation validé.....	72
<b>Figure IV.4.</b> Dendrogramme résultant de l'analyse hiérarchique de Ward. a. dendrogramme basé sur les simulations COSMO-RS. b. dendrogramme basé sur l'analyse GC-MS.....	76
<b>Figure IV.5.</b> Rendements d'extraction obtenus avec les différents solvants testés. ....	76
<b>Figure V.1.</b> Variation des rendements d'extraction en fonction du solvant d'extraction. ....	87
<b>Figure V.2.</b> Influence du rapport EtOH/H2O sur les teneurs en polyphénols totaux.....	86
<b>Figure V.3.</b> Influence du rapport EtOH/H2O sur les teneurs en flavonoïdes totaux.....	88
<b>Figure V.4.</b> Influence du rapport EtOH/H2O sur les teneurs en anthocyanes totaux. ....	88
<b>Figure V.5.</b> Biplot de l'ACP : projection des variables et des individus dans le plan factoriel F1-F2. ....	94

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Activités biologiques et pharmacologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	29
<b>Tableau III.1.</b> Screening des solvants verts assisté par COSMO-RS : Solubilité relative (log <sub>10</sub> (Xsolub)) des composés majoritaires des fruits de <i>P. lentiscus</i> dans les différents solvants testés. Le logarithme, log <sub>10</sub> (Xsolub), de la meilleure solubilité est fixé à zéro et le reste des solvants sont donné par rapport au meilleur.....	49
<b>Tableau III.2.</b> Influence du solvant d'extraction sur les classes de lipide de l'huile des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> . .....	53
<b>Tableau III.3.</b> Composition en acide gras des huiles de fruits de <i>P. lentiscus</i> obtenues par les différents solvants testés.....	55
<b>Tableau IV.1.</b> Les valeurs SP <sub>i,j</sub> des calculs de similarités obtenues par COSMO-RS.....	666
<b>Tableau IV.2.</b> Composition de l'huile essentielle et des arômes des feuilles de <i>P. lentiscus</i> obtenus par les différents solvants testés.....	68
<b>Tableau IV.3.</b> Liste des métabolites identifiés ayant un VIP supérieur à 1,5 selon le modèle PLS-DA et les coefficients correspondants pour chaque groupe. Les valeurs avec un coefficient positif indiquent des teneurs élevés, tandis que les valeurs avec un coefficient négatif indiquent des teneurs plus bas.....	74
<b>Tableau IV.4.</b> Propriétés des solvants utilisés.....	779
<b>Tableau IV.5.</b> L'activité antiradicalaire et l'activité inhibitrice du blanchiment de la $\beta$ -carotène des différents extraits. Les valeurs représentées dans ce tableau sont la moyenne de trois répétitions $\pm$ ET.....	780
<b>Tableau V.1.</b> Solubilité relative des antioxydants dans les différents systèmes de solvant....	84
<b>Tableau V.2.</b> Variabilité du pouvoir antiradicalire (IC <sub>50</sub> ) des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> en fonction du ratio EtOH/H <sub>2</sub> O.....	89
<b>Tableau V.3.</b> Coefficient de corrélation (Pearson (r)) entre les différentes variables.....	91
<b>Tableau V.4.</b> Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes factoriels. ....	91
<b>Tableau V.5.</b> Corrélations entre les variables et les axes factoriels. ....	92
<b>Tableau V.6.</b> Profils en composés phénoliques des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> en fonction du solvant d'extraction obtenus par HPLC. ....	94

## Introduction générale

Les solvants occupent une place importante dans l'industrie chimique et sont largement utilisés pour de nombreuses applications comme la synthèse de produits chimiques, pharmaceutiques ou alimentaires, la formulation des produits phytosanitaires et dans les procédés d'extraction et de séparation. Ils sont également utilisés comme diluants ou adjuvants dans les peintures et les encres et comme agents de nettoyage. Les solvants pétrochimiques sont caractérisés par un EHS (Environnement, Health, Safety) négatif et sont considérés comme composés organiques volatils (COVs). En effet, les solvants sont responsables de 29% des émissions de COVs en Europe (CITEPA, 2016).

Ces dernières années avec le développement de la chimie verte et sous la pression réglementaire (la réglementation REACH : Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals et les directives européennes liées à l'utilisation des solvants pétrochimiques: 1999/13/CE, 67/548/CEE, 1999/45/CE) et la prise de conscience de la nécessité de la protection de l'environnement, la recherche de nouvelles alternatives aux solvants pétrochimiques est devenue une préoccupation majeure des chimistes.

En effet, les biosolvants ou solvants verts sont apparus comme une alternative prometteuse pour la substitution des solvants pétrochimiques conventionnellement utilisés pour l'extraction des substances naturelles. Ces bio-solvants sont produits à partir de matière première renouvelable tels que le bois, l'amidon, les huiles végétales et les fruits et présentent de nombreux avantages : ils sont biodégradables, ininflammables, ont un bon pouvoir solvant et sont pour la majorité d'entre eux non toxique.

Ainsi, le présent travail de thèse en cotutelle, réalisé entre le laboratoire GREEN de l'Université d'Avignon et le laboratoire LPAM du Centre de Biotechnologie de Borj Cédria, a pour objectif de trouver des alternatifs aux solvants pétroliers conventionnellement utilisés pour l'extraction des métabolites primaires et secondaires à partir des différentes parties de *Pistacia lentiscus*. Cette espèce appartenant à la famille des Anacardiaceae est traditionnellement utilisée par la population tunisienne pour ses vertus thérapeutiques et médicinales grâce à sa richesse en substances actives (huile végétale, huile essentielle, arômes et antioxydants).

Deux approches ont été mises en œuvres dans la recherche de solvants alternatifs aux solvants toxiques : l'approche *in silico* basée sur l'utilisation des outils d'aide à la décision



comme les simulations COSMO-RS et l'approche expérimentale associée à des analyses chimiométriques.

### **Organisation du rapport**

Le présent travail de thèse est réparti en cinq chapitres.

**Le chapitre 1** consiste en une synthèse bibliographique divisée en deux parties. La première partie fait le point sur l'origine et les différents solvants verts utilisés dans le domaine de l'extraction du végétal et les outils utilisés pour faciliter la substitution des solvants pétrochimiques par des solvants verts comme les outils d'aide à la décision (COSMO-RS et les paramètres de solubilité de Hansen) et l'approche métabolomique. La deuxième partie est dédiée à la présentation de la plante d'étude *Pistacia lentiscus*, sa composition chimique, ses vertus médicinales et thérapeutiques et ses activités biologiques.

Ensuite, les différents procédés et solvants d'extraction ainsi que les différentes techniques analytiques mises en œuvre dans cette étude sont présentés dans **le chapitre 2**.

La partie résultats et discussion est réparti sur trois chapitres. **Le chapitre 3** porte sur l'étude de l'efficacité de dix agro-solvants à substituer l'hexane pour l'extraction de l'huile végétale à partir des fruits de *Pistacia lentiscus* et l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de cette huile. Deux approches, une approche *in silico* basée sur les simulations COSMO-RS et une approche expérimentale associée à des analyses statistiques, ont été mises en œuvre pour trouver un candidat potentiel à l'hexane, conventionnellement utilisés pour l'extraction des huiles végétales.

Dans **le chapitre 4**, l'efficacité de six agro-solvants pour l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus* a été évaluée en utilisant également une approche théorique basée sur les prédictions COSMO-RS et une approche expérimentale basée sur l'analyse métabolomique. Par la suite, l'activité antioxydante des différents extraits a été déterminée.

**Le chapitre 5**, porte sur l'étude de l'effet du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O sur les teneurs en composés phénoliques et sur l'activité antioxydante des fruits de *P. lentiscus*. La solubilité des différents métabolites dans les différents systèmes de solvants a été prédite grâce au programme COSMOthermX. Ensuite, une corrélation entre les données théoriques et les données expérimentales a permis de déterminer le meilleur système de solvants pour l'extraction des antioxydants des fruits du Lentisque.

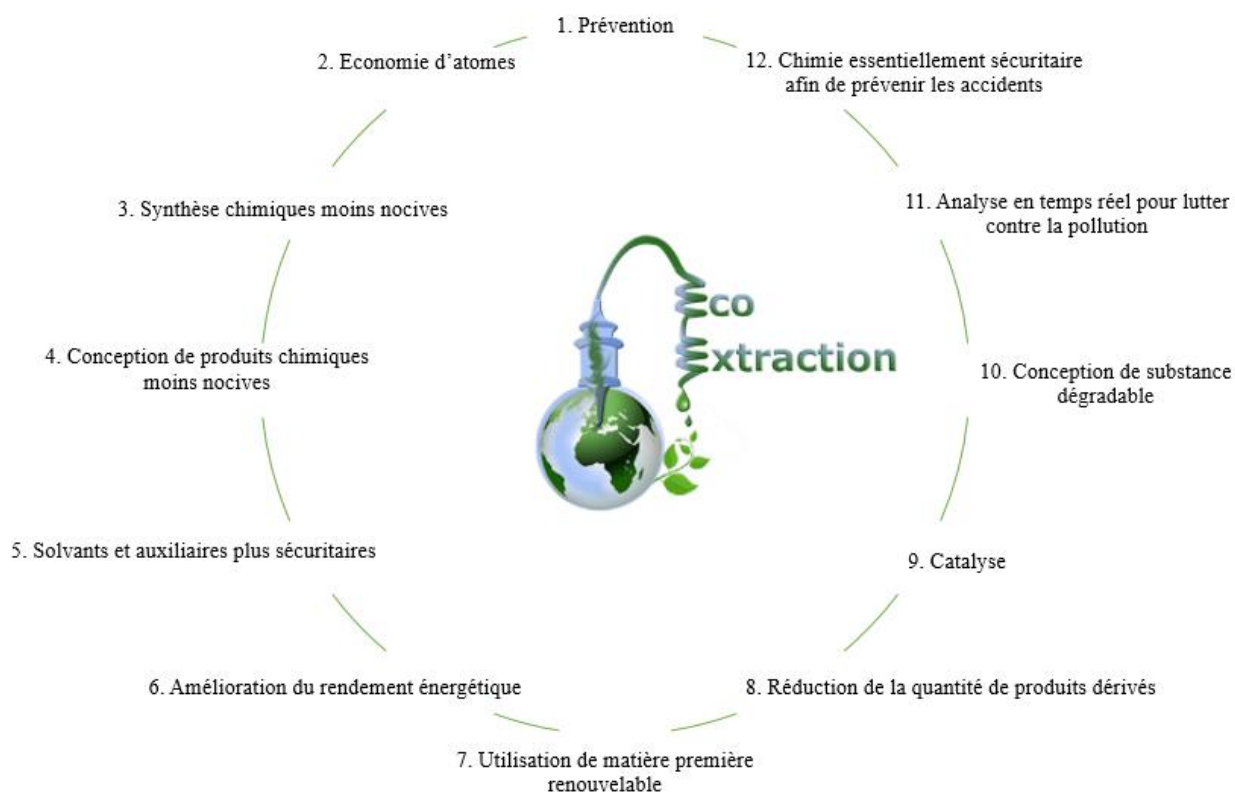
**Chapitre I : Bibliographie**

### I. Les solvants alternatifs

#### I.1. Contexte

Ces dernières années, la sensibilisation à la protection de l'environnement et les contraintes techniques et réglementaires ont incité les industries chimiques à changer leur mode de développement et d'opter vers une démarche de chimie verte et durable. Cette mutation, amène vers une réforme de la chimie pour réduire l'impact des activités humaines sur l'environnement.

Ainsi, le concept de la chimie verte a été développé aux Etats-Unis à partir de 1990 à l'issue du Pollution Prevention Act afin de réduire la production de déchets et la pollution. Ensuite, en 1998, Anastas et Warner ont définis les 12 principes de la chimie verte qui a pour but de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances (matière première, produits, sous-produits, solvants, réactifs, etc) dangereuses pour l'homme et l'environnement. Ces principes sont résumés dans la Figure I.1.



**Figure I.1.** Les 12 principes de la chimie verte (Anastas et Warner, 1998)

## Chapitre I : Bibliographie

Selon les douze principes de la chimie verte, la substitution des solvants toxiques par des solvants moins nocifs pour l'homme et l'environnement est primordiale grâce au cinquième principe qui incite de rendre inutile ou inoffensifs les auxiliaires de synthèses (solvants, agents de séparation, etc).

En effet, les solvants sont des substances chimiques largement utilisés dans de nombreuses industries chimiques comme la pharmacie, cosmétique, agro-alimentaire, matériaux, parfumerie, nutraceutique ou les bioénergies et le moyen le plus efficace pour réduire l'impact liés à leur utilisation est de trouver des solvants alternatifs plus respectueux de l'environnement.

Ainsi, le problème des solvants conventionnels est du à leur EHS négatif, car ils sont issus de ressources pétrochimiques non-renouvelables et la plupart d'entre eux sont considérés en Europe comme COVs puisque leur pression de vapeur saturante est supérieure à 10 Pa à 20°C et à la pression atmosphérique (Le Cloirec, 1998). En Europe, 29% des COVs émis dans l'atmosphère proviennent des solvants. En France, 53,1% des émissions de COVs non méthaniques sont issues également des solvants (COVNM) (CITEPA, 2016).

Donc, afin de réduire les émissions de COVs trois réglementations, sont rentrés en vigueur :

- La directive 1999/13/CE : visant la réduction de l'émission de COV dues à l'utilisation **de solvants organiques** dans certaines activités et installations;
- La directive 67/548/EEC : concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage **des substances dangereuses** et visant la réduction de l'émission de COV provenant de l'utilisation de substances dangereuses;
- La directive 1999/45/EC : concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la classification, à l'emballage et à l'étiquetage **des préparations dangereuses** et visant la réduction de l'émission de COV provenant des produits dangereux.

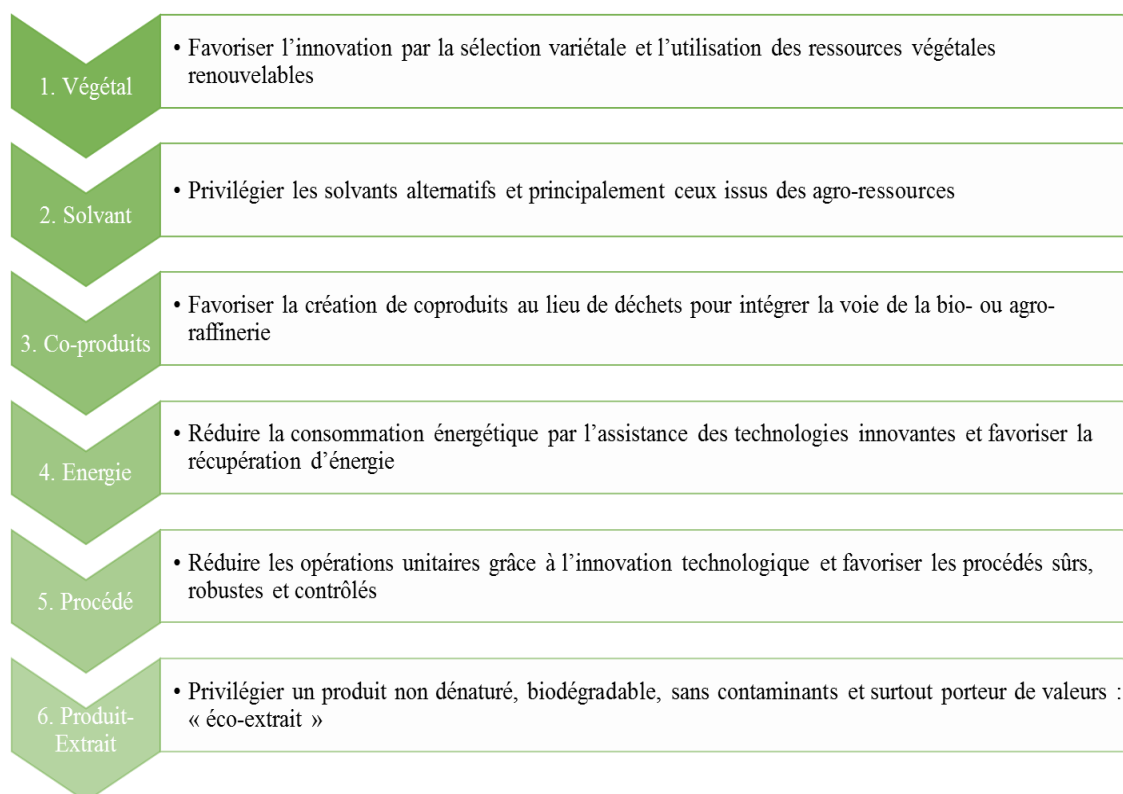
A ceci vient s'ajouter la réglementation REACH, entré en vigueur le 1er Juin 2007, qui a pour but d'évaluer et d'autoriser les substances chimiques préoccupantes pour la santé et l'environnement.

Cette nouvelle réglementation encourage ainsi la recherche de solvants alternatifs pour remplacer les solvants conventionnels à risques.

Par conséquent, plusieurs équipes se sont lancées dans la recherche de solvants « verts » et se sont orientées vers l'éco-extraction qui est basée sur la découverte et la conception de

## Chapitre I : Bibliographie

procédés d'extraction permettant de réduire la consommation énergétique, mais aussi l'utilisation de solvants alternatifs et des ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un produit/extrait sur de qualité. La Figure I.2 représente les 6 principes de l'éco-extraction.



**Figure I.2.** Les 6 principes de l'éco-extraction (Chemat, 2015)

### I.2. Panorama des solvants d'extraction des produits naturels

#### I.2.1. Les solvants pétrochimiques conventionnels

Les composés naturels sont généralement obtenus par extraction solide/liquide. Parmi les procédés d'extraction solide/liquide usuellement utilisés on trouve la macération, la percolation, la lixiviation et la décoction. Conventionnellement, ces procédés utilisent l'eau et l'éthanol comme solvant d'extraction pour l'obtention d'extraits naturels. Néanmoins, ces solvants permettent de solubiliser principalement des composés hydrophiles avec une faible sélectivité.

Pour une extraction plus sélective d'autres solvants organiques sont utilisés tels que l'hexane, l'acétone, le dichlorométhane et le méthanol pour l'extraction des substances naturelles. Ces solvants présentent de nombreux avantages : sélectivité, solubilité, faible coût

## **Chapitre I : Bibliographie**

et leur volatilité facilite leur élimination en fin de procédé. Cependant, ces solvants organiques, sont aussi, pour bon nombre d'entre eux, inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes, etc.) (Baldasseroni et al., 2003; Manini et al., 2004).

Par exemple, l'hexane est une molécule classé en tant que substance reprotoxique de catégorie 2 dans la réglementation REACH, en tant que substance aquatique toxique chronique de catégorie 2 et il est classé dans la liste des substances interdites dans les produits cosmétiques (règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen) (Rapinel et al., 2016). Il possède un point éclair bas (23,3°C) et une température d'auto-inflammation de 233,9°C (Chemat, 2015 ; Sicaire et al., 2015). De ce fait, trouver des solvants alternatifs aux solvants toxiques et en particulier à l'hexane est l'objectif clé de cette thèse.

### **I.2.2. Les « solvants verts » comme alternative**

La substitution des solvants d'origine pétrochimique par les solvants verts constitue l'une des voies de réduction des émissions de COV générés par les solvants et l'un des moyens de remplacement des solvants à risques.

#### **I.2.2.1. L'eau comme solvant d'extraction**

L'eau est considérée comme le solvant le plus écologique. C'est la molécule la plus abondante sur terre, non toxique, sans danger pour la santé et non inflammable. L'eau est un solvant fortement polaire dans les conditions ambiantes (avec une constante diélectrique  $\epsilon = 78,3$ ). Les propriétés physicochimiques de l'eau change quand on augmente la température et la pression. En effet, quand la température est entre 100°C et 374°C et la pression entre 1 et 221 bars, l'eau est dans sa zone sous-critique et on parle d'eau subcritique. L'eau subcritique à 250°C et 5 MPa a des propriétés diélectriques ( $\epsilon = 27$ ) comparables à celles des solvants organiques, tels que le méthanol ( $\epsilon = 33$ ) et l'éthanol ( $\epsilon = 24$ ) à température ambiante et pression atmosphérique. Dans ces conditions, la polarité de l'eau diminue et devient capable de solubiliser les composés faiblement polaires. Par conséquent, en maintenant la température de l'eau à haute pression, nous pouvons adapter sa polarité et cibler l'extraction des molécules d'intérêts.

## **Chapitre I : Bibliographie**

### **I.2.2.2. Les gaz liquéfiés**

Parmi les gaz liquéfiés le CO<sub>2</sub> supercritique est le gaz le plus utilisé. Le CO<sub>2</sub> constitue une alternative prometteuse aux solvants conventionnels tels que l'hexane et le dichlorométhane. En effet, il présente de nombreux avantages : c'est un gaz non-inflammable, inerte, facilement disponible et peu coûteux. Le CO<sub>2</sub> est classé dans la catégorie GRAS (Generally Recognized as Safe) (Chemat et al., 2019). De plus, le CO<sub>2</sub> présente une température et pression critique modérée (31.1°C et 72.9 atm) permettant de travailler à une température modérée qui ne dénature pas les qualités organoleptiques et les principes actifs de l'extrait obtenu (Meullemiestre et al., 2015). La technologie de CO<sub>2</sub> supercritique est basée sur le pouvoir solvant du CO<sub>2</sub> qui est modulable selon les conditions de pression et de température qu'on lui applique.

Cette technique est utilisée dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique, la chimie et l'environnement. Elle est adaptée aux molécules de faible poids moléculaire et ayant une faible polarité tels que les caroténoïdes, triglycérides, alcools gras, arômes légers, etc. Elle constitue une alternative efficace et plus respectueuse de l'environnement et de la santé. Néanmoins, le coût de cette technologie, lié à l'investissement initial du matériel, est très élevé limitant son développement à l'échelle industrielle.

Ainsi, pour palier à ce problème d'autres gaz liquéfiés ont été utilisés comme solvant pour l'extraction de produits naturels comme le propane, le diméthyl éther, le n-butane et le 1,1,1,2-tétrafluoroéthane R134a (Rapinel et al., 2018). Ces derniers constituent une alternative prometteuse aux solvants existants, puisqu'ils permettent eux aussi d'extraire des substances naturelles à température ambiante, sans laisser de traces dans le produit final, avec une faible consommation énergétique et pression modérée (1-10 bar) qui facilite sa mise en œuvre à l'échelle industrielle (Vian et al., 2017).

### **I.2.2.3. Les liquides ioniques et les solvants eutectiques profonds**

Les liquides ioniques sont des sels organiques liquides ayant une température de fusion inférieure à 100°C et formés exclusivement d'une association d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Ils sont capables de dissoudre des molécules apolaires aussi bien que des molécules polaires. Ils sont chimiquement et thermiquement très stables, non inflammables et leur caractère ionique leur confère une plage de polarité importante (Choi et

## Chapitre I : Bibliographie

al., 2014). Ils sont généralement utilisés en système biphasique avec l'eau dans les procédés d'extraction de produits naturels.

Les solvants eutectiques profonds (DES en anglais: Deep Eutectic Solvent) sont utilisés de plus en plus comme alternative plus verte des liquides ioniques. Ces solvants sont constitués par des mélanges de solides ayant des points de fusion beaucoup plus bas que ceux de leurs constituants pris isolément. Ils sont généralement liquides à température ambiante bien qu'ils sont constitués de composés solides lorsqu'ils sont considérés séparément. Le DES le plus connu est formé d'un mélange de chlorure de choline et d'urée dans le rapport molaire 1: 2. Ce mélange est liquide à température ambiante et il a un point de fusion de 12°C (beaucoup plus bas comparativement au point de fusion de la choline, 302°C ou de l'urée, 133°C).

Ces dernières années, une attention particulière a été portée à l'utilisation de substances naturelles pour la synthèse de ces solvants eutectiques, appelés solvants eutectiques profonds naturels (NADES en anglais : Natural Deep Eutectic Solvents). Ils sont constitués d'acides organiques, d'acides aminés, de sucres, de polyols, de choline et d'urée (Choi et al., 2011). Ces métabolites naturels constituent une source prometteuse pour la préparation des mélanges eutectiques puisqu'ils sont abondants dans la biomasse, biodégradables, comestibles, ont une grande diversité structurale et une faible toxicité. En outre, les NADES possèdent de meilleures propriétés d'extraction que les DESs : ils sont liquides au-dessous de 0°C, ils ont une viscosité ajustable, et une grande capacité de solubilisation des composés apolaires et polaires. En outre, ces NADES sont de plus en plus utilisés pour l'extraction des composés naturels à partir des plantes et d'autres matrices naturelles (Bajkacz & Adamek, 2017 ; Bajkacz & Adamek, 2018).

### I.2.2.4. Les agro-solvants

Parmi les solvants verts, on distingue les agro-solvants ou encore appelés les bio-solvants. Ces derniers proviennent de matières premières renouvelables d'origine, végétale ou animale transformées ou non, dont la majeure partie de la molécule finale est d'origine naturelle. Ces solvants biosourcés peuvent être classés en fonction de la filière d'où ils sont issus :

- Les agro-solvants issus de la filière céréale : ces solvants sont obtenus par fermentation de matières riches en sucre comme les céréales, les betteraves et la canne à sucre et des plantes amylacées riches en amidon (blé, l'orge, le maïs ou l'avoine). Les principaux solvants sont le bio-éthanol, le lactate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle.



## Chapitre I : Bibliographie

- Les agro-solvants issus de la filière oléagineux : proviennent de graines (colza, tournesol, soja, sésame) ou de fruits (cas de l'huile de palme, de coprah, ou d'olive) telles que les esters méthyliques d'acides gras et les dérivés du glycérol.

Les esters d'acides gras sont majoritairement obtenus à partir des triglycérides selon une étape de transestérification dans un alcool (méthanol, éthanol). Cette transformation permet par ailleurs de produire du glycérol qui peut servir de matière première pour la production d'agro-solvants comme, par exemple, le carbonate de glycérol.

- Les agro-solvants issus des co-produits de l'industrie du bois, du papier ou des agrumes : ils sont produits à partir des pins et des écorces d'agrumes. Les principaux solvants de cette filière sont les hydrocarbures terpéniques comme le d-limonène,  $\alpha$ -pinène et le p-cymène.

La figure I.3 illustre l'origine et les différents types d'agro-solvants.

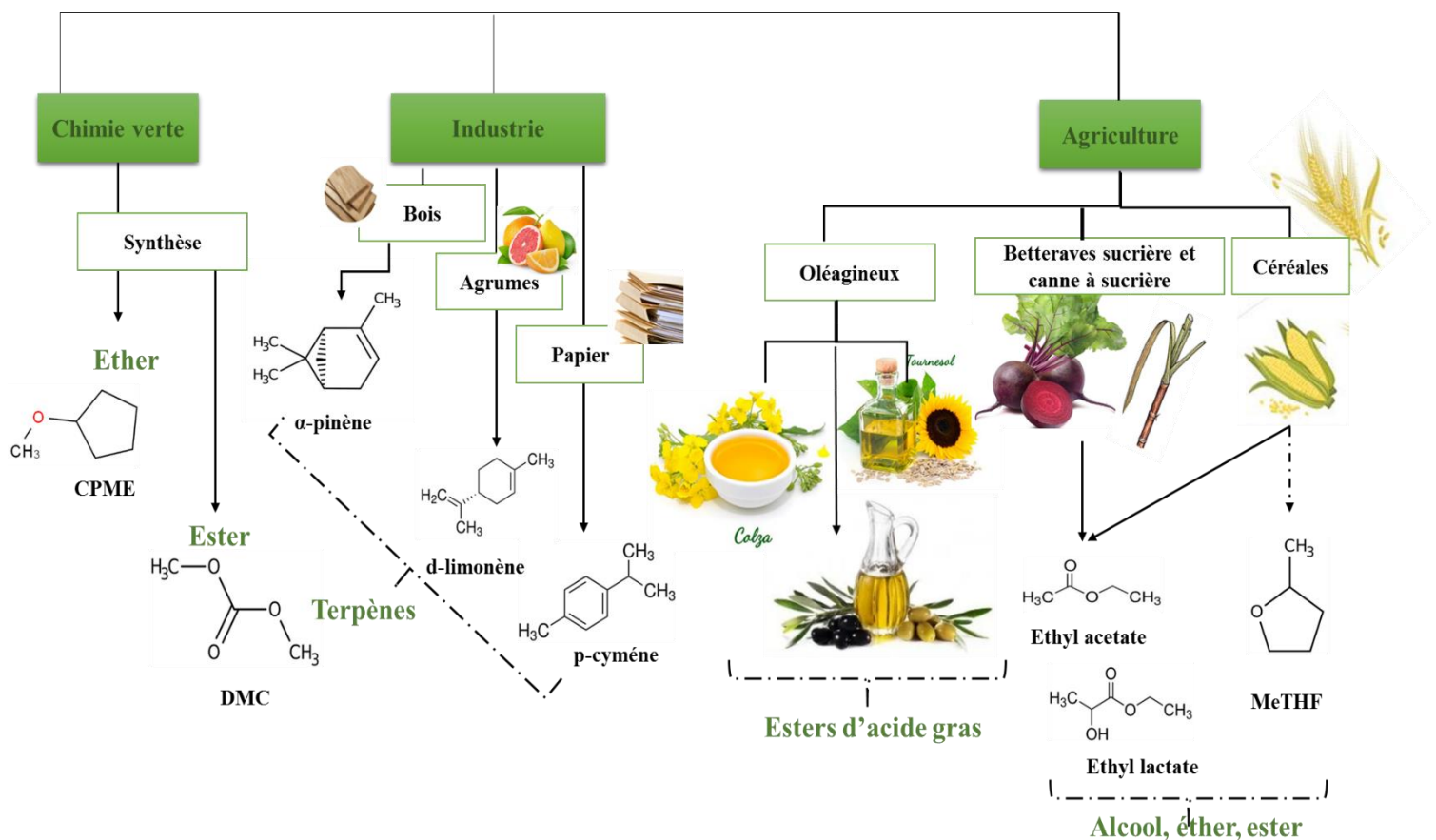


Figure I.3. Origine des biosolvants

## Chapitre I : Bibliographie

### a. Utilisations des agro-solvants

#### ▪ Le bio-éthanol

Il est utilisé comme biocarburant. Sa production permet de réduire les émissions des gaz à effet de serre de 70% (Takeuchi et al., 2018). Il peut être également utilisé comme solvant d'extraction comme une alternative plus écologique à l'éthanol synthétique, utilisé à grande échelle dans l'industrie chimique. En effet, le bio-éthanol présente les mêmes caractéristiques et les mêmes propriétés que l'éthanol d'origine pétrochimique. L'inhalation de vapeurs d'éthanol ne semble pas entraîner des effets graves pour la santé, tout comme le passage transcutané qui peut être considéré comme négligeable (Mardirrosian, 2009)

#### ▪ Le lactate d'éthyle

Il est produit par estérification de l'éthanol et de l'acide lactique, tous deux issus des procédés de fermentation de sucres. Il est 100% biodégradable, facile à recycler, non corrosif, non carcinogène, non toxique et il est approuvé comme additif alimentaire par la FDA (US Food and Drug Administration, 2005). Ce solvant présente de nombreux avantages : une faible pression de vapeur, une faible tension de surface et un bon pouvoir solvant (Kua et al., 2016). Néanmoins, le problème du lactate d'éthyle est sa température d'ébullition très élevée (154°C). Le lactate d'éthyle est utilisé à froid comme nettoyant et dégraissant d'objet métallique pour son efficacité d'élimination des graisses, huiles et des adhésifs. Il constitue une alternative aux solvants toxiques comme la Nméthylpyrrolidone, l'acétone et le xylène (Pereira et Rodrigues 2014). Récemment, ce solvant vert suscite de l'intérêt comme solvant d'extraction de composés bioactifs issus de ressources naturelles. En effet, le lactate d'éthyle a été utilisé pour l'extraction de l'huile à partir des fibres de maïs (Abbas et al., 2003), des caroténoïdes comme le lycopène à partir de la tomate, la lutéine à partir du maïs et du  $\beta$ -carotène à partir des carottes. De plus, des études ont montré que le lactate d'éthyle peut être une alternative intéressante aux solvants toxiques comme le chloroforme, l'acétone et l'éther de pétrole, pour l'extraction de l'astaxanthine (Pereira et Rodrigues, 2014).

#### ▪ L'acétate d'éthyle

Il est produit par déshydrogénation du bioéthanol. C'est un solvant biodégradable. Il est légèrement soluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques, tels que l'alcool, l'acétone, l'éther et le chloroforme.

## Chapitre I : Bibliographie

Il est utilisé dans une large gamme d'applications comprenant les encres d'imprimerie, les vernis et les produits chimiques d'entretien pour l'automobile, et dans la production de vernis, de matières plastiques et de caoutchouc. L'acétate d'éthyle est utilisé dans l'industrie alimentaire dans la préparation d'essences de fruits, d'arômes synthétiques et de parfums. Dans l'industrie pharmaceutique, il est un élément important pour la concentration et la purification des antibiotiques. De plus, il est utilisé comme intermédiaire dans la fabrication de divers médicaments. Il est également utilisé en chromatographie comme une alternative verte au dichlorométhane (Pankaj, 2004).

L'acétate d'éthyle est un solvant peu toxique ayant une  $DL_{50}$  par voie orale de 5620mg/kg chez le rat (Joshi et Adhikari, 2019). Il est classé comme GRAS (generally recognized as safe) selon la FDA (Food and Drug Administration) (Djerafi et al., 2015).

### ▪ Le 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF)

Le 2-MeTHF est synthétisé à partir de matière première renouvelable par hydrogénation de la fraction glucidique de l'hémicellulose à partir d'épis de maïs ou de la bagasse de canne à sucre (Sicaire et al., 2014). Ce solvant présente de nombreux avantages : il est biodégradable, recyclable, et possède un excellent profil HSE. En outre, des études toxicologiques ont montré que le 2-MeThf ne présente aucune toxicité pour l'homme (Antonucci et al., 2011). En effet, il est classé parmi les solvants autorisés en industrie pharmaceutique (Clarke et al., 2018). Le 2-MeTHF présente une alternative prometteuse au THF, couramment utilisé en chimie organique. En effet, le 2-MeTHF a une miscibilité à l'eau plus faible, une plus grande stabilité et une volatilité inférieure à celle du THF (le 2-MeTHF a un point de fusion de  $-136\text{ }^{\circ}\text{C}$  et un point d'ébullition de  $80,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  comparé au THF qui a un point de fusion de  $-108,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  et un point d'ébullition de  $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Aujourd'hui, le 2-MeTHF trouve de nouvelles applications en chimie verte en tant que solvant d'extraction des substances actives à partir des produits naturels afin de substituer les solvants pétrochimiques utilisés conventionnellement comme l'hexane. De nombreux travaux ont montré le potentiel de 2-MeTHF pour l'extraction des huiles végétales à partir des graines de colza (Sicaire et al., 2015), l'extraction de lipides à partir de levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* IFP29 (Breil et al., 2015) et l'extraction des arômes (Filly et al., 2014, Chaabani et al., 2019) avec des rendements d'extraction comparables à ceux obtenus avec l'hexane et une bonne sélectivité.

## Chapitre I : Bibliographie

### ▪ Le d-limonène

Grâce à sa faible polarité, son très fort pouvoir solvant, le d-limonène offre des avantages pour l'extraction de matières grasses. Il peut être une alternative «verte» à l'utilisation de l'hexane (Mamidipally et Liu, 2004 ; Mamidipally et Liu, 2005 ; Virot et al., 2008, Fine et al., 2013).

Le d-limonène, utilisé depuis longtemps comme arôme, trouve aujourd'hui de nouvelles applications en chimie verte en tant que solvant industriel. Il est utilisé comme solvant naturel renouvelable dans les produits de nettoyages; il peut même décaper la peinture et est considéré comme substitut efficace à la térébenthine.

Le d-limonène a été comparé avec du toluène dans la procédure de Dean-Stark en fonction de sa capacité à former un mélange azéotrope avec de l'eau (Veillet et al., 2010). Récemment, le d-limonène a également été utilisé comme solvant vert en tant que substitut de dichlorométhane pour l'extraction des caroténoïdes en particulier le lycopène (Li et al., 2014a). Il constitue aussi une alternative prometteuse pour l'extraction des huiles végétales (Fine et al., 2013).

Il doit être manipulé avec précaution, car il est classé comme allergène cutané. La toxicité systémique du d-limonène est considérée comme faible chez l'homme. Il est classé comme non cancérigène et non mutagène (les effets à court terme se traduit par une légère irritation des yeux et de la peau). En effet, aucun effet cancérigène n'a été rapporté chez l'homme (Kerton et Marriott, 2013).

À faible dose le d-limonène est non toxique chez l'humain. Il est en effet classé dans la catégorie GRAS (Generally Recognized as Safe) par l'administration étasunienne des aliments et drogues (USFDA, 1997). L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommandent une dose journalière acceptable maximum de 1,5 mg/kg de poids corporel pour le d-limonène (Codex Alimentarius, 1993).

### ▪ L' $\alpha$ -pinène

L' $\alpha$ -pinène est un hydrocarbure monoterpénique naturel, présent dans la résine de la plupart des conifères et certaines plantes comme la menthe, la lavande, la sauge, le romarin, le basilic, et les roses (Fernandez et Chemat, 2012). Ce terpène est obtenu à partir de feuilles, d'écorce ou de bois, et il est un composant majeur de l'essence de térébenthine et de pin. Il est couramment utilisé dans l'industrie des arômes et parfums, comme insecticide et dans les bases de parfum, ainsi que pour la synthèse de camphre. Il est insoluble dans l'eau et complètement

## Chapitre I : Bibliographie

miscible aux huiles. Ces dernières années, plusieurs recherches ont été mené pour tester les possibilités d'utiliser  $\alpha$ -pinène comme un substitut de solvants pétroliers pour l'extraction de composés bioactifs.

Les travaux de Bertouche et ses collaborateurs (2013) ont montré le potentiel du  $\alpha$ -pinène comme alternative au n-hexane pour l'extraction de l'huile de certains produits oléagineux (les arachides, le soja, le tournesol et l'olive). En effet, les rendements d'extraction de l'extrait  $\alpha$ -pinène étaient légèrement supérieurs à ceux obtenus avec l'hexane. De plus,  $\alpha$ -pinène donne un meilleur rendement que l'hexane pour l'extraction des huiles à partir de la microalgue *Chlorella vulgaris* (Dejoye et al., 2013).

L' $\alpha$ -pinène, comme le limonène, il est classé comme non cancérigène et non mutagène. Il est irritant et sensibilisant par contact cutané ou par inhalation (Patrascu, 2012).

### ▪ Le *p*-cymène

Le *p*-cymène est présent dans les huiles essentielles de cumin, camphrier, eucalyptus, de thym, d'arbre à thé et de *Mentha arvensis*. Il est produit par hydrogénation à partir de terpènes monocycliques. C'est un sous-produit de la fabrication de la pâte à papier par le procédé au bisulfite et il est utilisé principalement avec d'autres solvants et hydrocarbures aromatiques comme diluant des laques et des vernis. Le *p*-cymène peut être une alternative prometteuse au n-hexane pour l'extraction des composés polaires. En effet, Li et al. (2014b) ont évalué les performances de cinq solvants alternatifs (éthanol, isopropanol, d-limonène,  $\alpha$ -pinène, *p*-cymène) par rapport au n-hexane pour l'extraction de l'huile de colza. Parmi ces cinq candidats, les résultats obtenus ont montré que le *p*-cymène pourrait être le solvant le plus prometteur pour la substitution du n-hexane, avec un rendement lipidique élevé et une bonne sélectivité.

Les effets à court terme comprennent une légère irritation pour la peau et les yeux mais il n'existe pas de preuve quant à son effet mutagène ou reprotoxique. Aucun effet cancérigène n'a été rapporté chez l'homme (Patrascu, 2012).

### I.2.2.5. Les solvants issus de la chimie verte : le diméthylcarbonate (DMC) et le cyclopentyl méthyl éther (CPME)

#### a. Le diméthylcarbonate (DMC)

## **Chapitre I : Bibliographie**

Le carbonate de diméthyle est obtenu par transestérification du carbonate de propylène ou en faisant réagir ensemble du monoxyde de carbone, du méthanol et de l'oxygène. C'est un solvant issu de la chimie verte, non toxique et biodégradable. Il n'a pas d'effet irritant ni mutagène que ce soit par contact ou par inhalation (Tundo et al., 2006).

Il peut être une alternative aux solvants organiques halogénés largement utilisé pour le nettoyage à sec et en synthèse organique en raison de leur capacité à dissoudre une large gamme de composés organiques de faible et moyenne polarité. Le DMC joue un rôle important en industrie chimique grâce à sa polyvalence, sa faible toxicité et sa large gamme d'applications. Il est principalement utilisé comme solvant d'extraction, additif pour carburant et comme réactif dans les réactions de carbonylation et de méthylation. Il constitue une alternative aux cétones et aux esters d'acétate, utilisés comme solvants pour les industries de la peinture. Il présente des performances élevées en tant qu'électrolyte non aqueux pour les piles au lithium (Santos et al., 2014).

### **b. Le Cyclopentyl Méthyl Ether (CPME)**

Le CPME est considéré comme une alternative écologique au Tetrahydrofurane, au tert-Butyl méthyl éther (MTBE), au 1,4-Dioxane et autres solvants éthers avec une grande résistance à la formation de peroxydes. Il présente de nombreux avantages : une stabilité relative dans des conditions acides et basiques, une faible miscibilité dans l'eau, faible énergie d'évaporation et un risque d'explosion limité comparé aux éthers classiques (Watanabe et al., 2007). Le CPME a été utilisé comme solvant organique pour la déshydratation sélective des pentoses lignocellulosiques en furfural (Campos Molina et al., 2012). Récemment, le potentiel de CPME a été évalué dans le domaine de l'éco-extraction du végétal comme alternative à l'hexane pour l'extraction d'huile à partir de graines de colza (Sicaire et al., 2015) et de levure oléagineuse (Breil et al., 2016).

Le CPME est un solvant non toxique. En effet, les travaux d'Antonucci et al. (2011) ont montré l'absence de génotoxicité et de mutagenicité du CPME et son potentiel d'utilisation dans l'industrie pharmaceutique.

### **I.3. Les outils d'aide à la décision pour le screening des solvants alternatifs**

Le choix d'un solvant alternatif constitue une étape cruciale dans une démarche de substitution des solvants conventionnels.

## Chapitre I : Bibliographie

À ces fins, des outils d'aide à la décision comme la méthode de Hansen-HSP et des approches *in silico* type COSMO-RS (Conductor-like Screening Model) ont été développés, mais la validation de ces méthodes de prédiction par l'expérimentateur reste un passage obligé.

### I.3.1. Les paramètres de solubilité de Hansen

La théorie de Hansen est basée sur le principe de « like dissolve like ». Cette approche est basée sur les interactions de trois paramètres de solubilité  $\delta d$ ,  $\delta p$  et  $\delta h$  qui rendent compte des interactions dispersives, polaires et des liaisons hydrogènes représentant le paramètre d'Hildebrand.

$$\delta = \sqrt{\delta d^2 + \delta p^2 + \delta h^2}$$

$\delta d$  correspond aux interactions non polaires dérivées des forces de dispersion de London,  $\delta p$  correspond aux interactions polaires liées aux forces de Keesom et  $\delta h$  correspond aux interactions dues aux liaisons hydrogènes. Ces trois paramètres représentent les coordonnées de l'espace tridimensionnel de Hansen et permettent ainsi de prédire d'une façon qualitative la solubilité d'une substance dans un solvant. Ainsi, cette approche ne permet pas de prédire des valeurs de solubilités mais prédit de façon qualitative la solubilité d'une substance dans un solvant.

A partir des valeurs de solubilité de Hansen il est possible de construire une sphère de solubilité délimitant la zone de miscibilité. L'ensemble de ces données permettent de calculer le nombre RED (Relative Energy Difference) qui correspond à la différence d'énergie relative entre deux entités chimiques. Le nombre RED permet de prévoir la solubilité d'un ou plusieurs solutés dans un solvant. Cette différence d'énergie correspond au rapport de la distance entre le soluté et le centre de la sphère de solubilité et le rayon de la sphère.

$$RED = D/R$$

R est le rayon de la sphère de solubilité de Hansen (par défaut, R= 1)

D est la distance entre le soluté et le centre de la sphère de solubilité.

Cette distance est calculée à partir de l'équation ci-dessous:

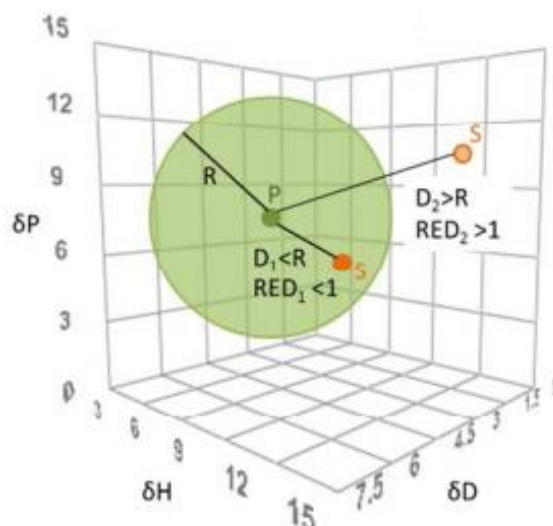
$$D = (4(\delta d_s - \delta d_p)^2 + (\delta p_s - \delta p_p)^2 + (\delta h_s - \delta h_p)^2)^{1/2}$$

Où  $\delta d_p$ ,  $\delta p_p$  et  $\delta h_p$  ; les paramètres de Hansen du soluté

$\delta d_s$ ,  $\delta p_s$  et  $\delta h_s$  ; les paramètres de Hansen du solvant

## Chapitre I : Bibliographie

Si  $RED < 1$ , le solvant est situé à l'intérieur de la sphère de solubilité et il est considéré comme un bon solvant. Par contre, si  $RED \geq 1$  alors le solvant est située à l'extérieur de la sphère de miscibilité et il est considéré comme un mauvais solvant (Figure I.4).



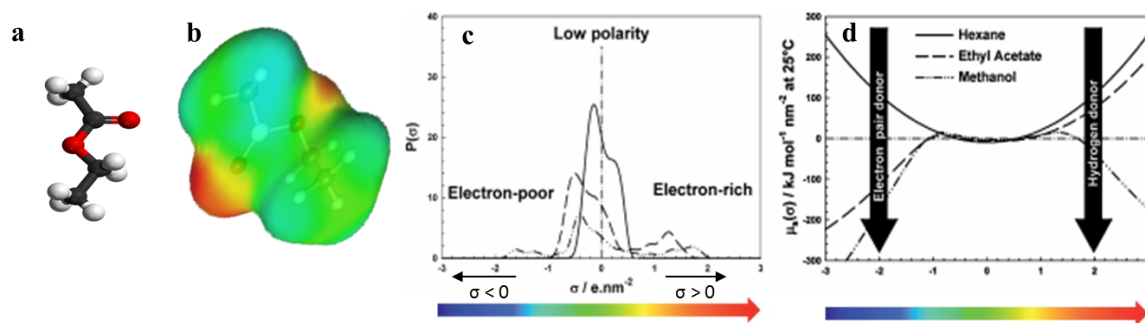
**Figure I.4.** Sphère de solubilité de Hansen. P : soluté, S : solvant, R : rayon de la sphère de solubilité, D : distance

### I.3.2. L'approche COSMO-RS

COSMO-RS est une méthode prédictive qui permet de calculer les différences de potentiel chimique des molécules en phase liquide. Ce modèle génère des surfaces de densité de charge COSMO pour décrire l'état de chaque molécule et de ses interactions avec d'autres molécules dans un conducteur parfait (Figure I.5).

Les zones fortement positives et polaires sont en couleur bleue et les zones très négatives et polaires sont en rouge. Par contre, les couleurs jaune et verte présentent des polarités plus faibles. Ces surfaces de densité de charge sont ensuite converties en profil  $\sigma$  permettant de représenter l'importance des différentes zones de polarité d'une molécule. Ces  $\sigma$ -profils permettent de calculer le potentiel chimique d'une espèce en solution ( $\mu_{\text{solv}}$ ) et donc de prédire la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ainsi, plus  $\mu_{\text{solv}}$  est dans les valeurs négatives, plus le solvant est censé solubiliser le soluté (Durand et al., 2011 ; Moity et al., 2012). Les différentes étapes de calculs COSMO-RS sont illustrées dans la Figure I.5.





**Figure I.5.** Structure chimique (a) et  $\sigma$ -surface (b) de l'éthyl acétate ;  $\sigma$ -profil (c) et  $\sigma$ -potential (d) de trois solvants typiques : hexane (apolaire), éthyl acétate (accepteur de liaison hydrogène) et méthanol (amphiprotique)

Les zones fortement positives et polaires sont en couleur bleue et les zones très négatives et polaires sont en rouge. Par contre, les couleurs jaune et verte présentent des polarités plus faibles. Ces surfaces de densité de charge sont ensuite converties en profil  $\sigma$  permettant de représenter l'importance des différentes zones de polarité d'une molécule. Ces  $\sigma$ -profils permettent de calculer le potentiel chimique d'une espèce en solution ( $\mu_{\text{solv}}$ ) et donc de prédire la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ainsi, plus  $\mu_{\text{solv}}$  est dans les valeurs négatives, plus le solvant est censé solubiliser le soluté (Durand et al., 2011 ; Moity et al., 2012). Les différentes étapes de calculs COSMO-RS sont illustrées dans la Figure I.5.

L'approche COSMO-RS est utilisée dans divers domaines d'activité comme la formulation pharmaceutique pour le choix des excipients (Pozarska et al., 2013) ou en cosmétique pour l'étude de la solubilisation d'ingrédient (Benazzouz et al., 2014).

Récemment, cette approche a été utilisée pour le screening des solvants alternatifs pour l'extraction des arômes (Filly et al., 2015 ; Chaabani et al., 2019), des lipides (Sicaire et al., 2015a ; Breil et al., 2016) et des composés phénoliques (Ravi et al., 2018).

#### I.4. Apport de la métabolomique et de l'analyse chimiométrique au choix de solvants alternatifs

Le développement actuel en bio-informatique et les avancées technologiques dans le domaine de la spectroscopie (RMN et la spectrométrie de masse) ont permis l'émergence d'une nouvelle approche pour l'analyse des systèmes biologiques complexes nommée 'la métabolomique'.

## Chapitre I : Bibliographie

C'est une approche multidisciplinaire qui englobe plusieurs domaines tels que la chimie analytique, la biochimie, les bio-statistiques, la bio-informatique et la biologie métabolique (Mishur and Rea, 2012).

Elle consiste en l'étude complète de l'ensemble de métabolites contenu dans un système biologique (cellule, tissu, organe, organisme) à un instant donné et dans des conditions spécifiques.

La métabolomique est utilisée dans de nombreux domaines tels que : la biologie végétale, la pharmacie, la médecine, la microbiologie, la toxicologie et la sécurité alimentaire. Cette stratégie a été également utilisée pour l'évaluation des protocoles d'extraction (Tambellini et al., 2013) et le screening des solvants d'extraction (Martin et al., 2014).

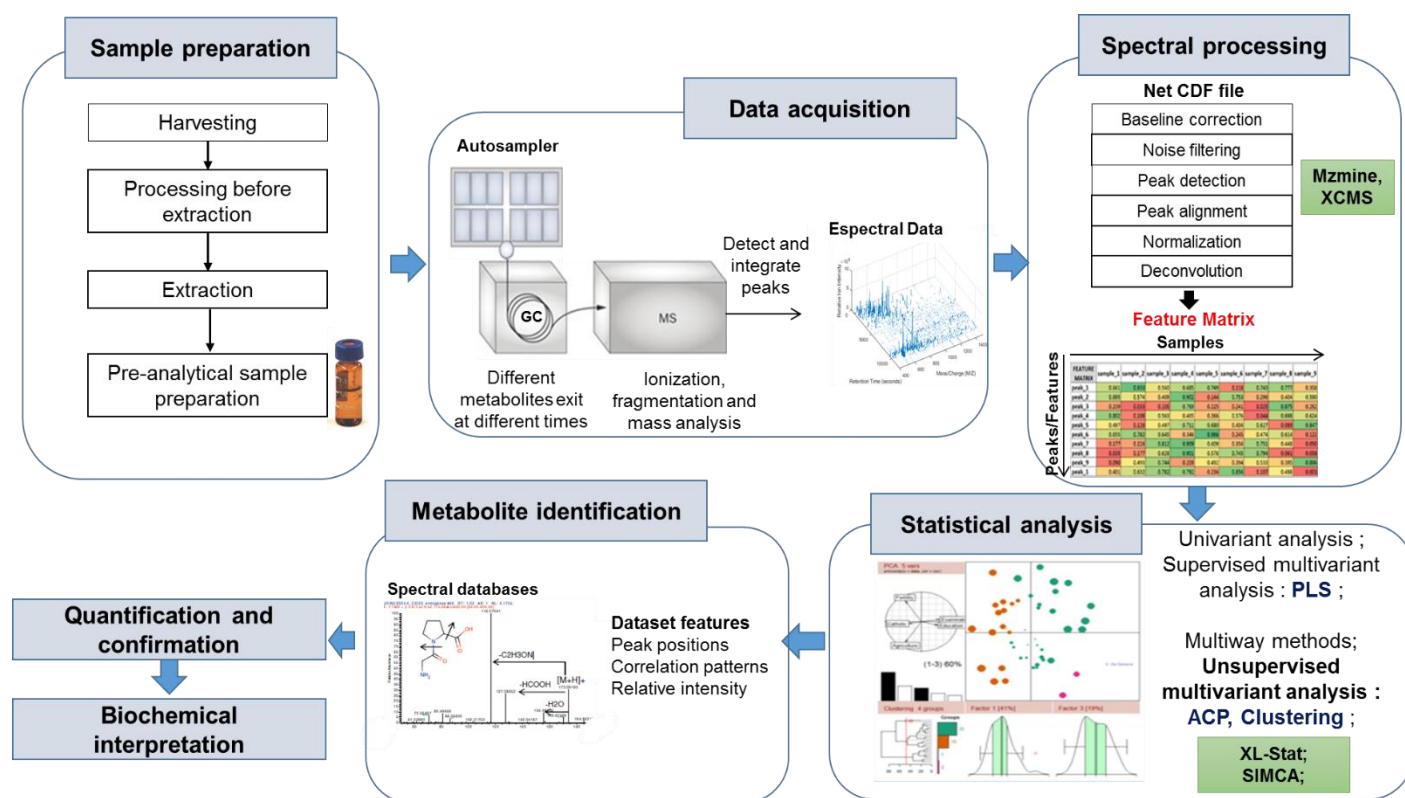
Deux approches peuvent être utilisées pour l'analyse du métabolome : l'approche non ciblée et l'approche ciblée. L'approche non ciblée ou approche globale consiste à l'étude complète de "tous" les métabolites dans un échantillon, y compris les substances chimiques inconnues à un moment défini dans des conditions spécifiques et la comparaison des empreintes métaboliques afin d'identifier les métabolites les plus discriminants. L'approche ciblée correspond quant à elle à l'identification et la quantification des métabolites connus. Elle nécessite alors une connaissance préalable des molécules ou des familles de molécules recherchées.

L'analyse métabolomique se déroule en quatre étapes principales dans le domaine du végétal :

1. La préparation d'échantillon pour analyse,
2. L'acquisition des données,
3. Le traitement des données,
4. Et l'analyse statistique et chimiométrique

La figure I.6 illustre les différentes étapes d'une analyse métabolomique par GC-MS.

## Chapitre I : Bibliographie



**Figure I.6.** Etapes d'une analyse métabolomique par GC-MS

La préparation d'échantillon est l'étape la plus cruciale dans l'analyse métabolomique qui va influencer la qualité et la quantité des résultats obtenus. En effet selon Choi and Verpoorte (2014) « *What you see is what you extract* », c'est à dire on analyse ce qu'on extrait.

La préparation d'échantillon peut être divisée en quatre étapes : (Ernst et al., 2013)

1. L'échantillonnage,
2. Le pré-traitement du matériel végétal (séchage, broyage, etc),
3. L'extraction,
4. Et la préparation d'extrait pour analyse.

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération au moment de l'échantillonnage : l'origine géographique, le stade de développement, les conditions climatiques (les radiations UV, degré d'exposition au soleil), le type d'organe (feuilles, fruits, tige, racine, etc.) afin d'obtenir un échantillon représentatif et de réduire les effets matrice. Ces paramètres vont avoir une influence directe sur le profil métabolomique d'un extrait.

## Chapitre I : Bibliographie

D'autres paramètres comme le séchage (teneur en eau résiduelle), la taille de particule (degré de broyage), le choix du solvant et la méthode d'extraction utilisée agissent plus ou moins directement sur l'efficacité de l'extraction des métabolites (Kim et Verpoorte, 2009).

Conventionnellement, l'isolation des métabolites présents dans une matrice végétale est effectuée par extraction solide/liquide. Cependant, les solvants couramment utilisés sont souvent d'origine pétrochimique ou des solvants halogénés présentant une nocivité certaine pour l'utilisateur et un coût important de retraitement par des entreprises spécialisées.

Ainsi, le choix d'un solvant d'extraction repose sur de nombreux critères comme la polarité, la sélectivité, le point d'ébullition, risque d'interférence avec la méthode d'analyse mais également sur sa toxicité (Verpoorte et al., 2008).

Donc, dans une démarche de substitution de solvants pétrochimiques par des solvants verts, la métabolomique peut servir comme outil pour élucider l'influence du solvant d'extraction sur la qualité de l'extrait final en se basant sur la comparaison des profils métabolomiques des différents extraits et la sélection d'un solvant vert le plus appropriée pour l'isolation des métabolites d'intérêts.

Pour simplifier l'interprétation des données après analyse et traitement des spectres obtenus, des analyses statistiques multivariées (descriptives et explicatives) sont utilisées. Parmi les analyses descriptives, l'analyse en composante principale (ACP) est la plus utilisée. Elle permet de visualiser la variabilité entre les données et de mettre en évidence les variables les plus discriminantes. Quant aux analyses explicatives et prédictives on distingue l'analyse discriminante PLS (PLS-DA : partial least square-discriminant analysis) qui vise à regrouper des données multivariées en maximisant la variance entre différents groupes d'échantillons.

## II. *Pistacia lentiscus* L.

### II.1. Classification

L'espèce *Pistacia Lentiscus* L. ou communément appelé Lentisque ou 'Dhrou' appartient au :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphyte
- Sous-embranchement : Magnoliophyta ou Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida ou Eudicots
- Sous-classe : Rosidae ou Eudicots moyennes dialypétales (plus de 90 000 espèces connues)

## Chapitre I : Bibliographie

- Ordre : Sapindales
- Famille : Anacardiaceae
- Genre : *Pistacia L* (pistache)

En 1883, Engler a proposé la première monographie du genre *Pistacia* formée par huit espèces: *P. lentiscus*, *P. khinjuk*, *P. mutica*, *P. mexicana*, *P. terebinthus*, *P. chinensis*, *P. vera*, et *P. atlantica*,

### II.2. Description botanique

*Pistacia lentiscus* est un nanophanérophyte de 1 à 3 m (Pottier-Alapetit, 1979). Elle est caractérisée par :

- une odeur résineuse forte,
- des feuilles persistantes formées par 4 à 10 folioles de couleur verte foncée,
- des fleurs aromatiques, unisexuées. Les fleurs mâles sont caractérisées par une couleur rouge foncée tandis que les fleurs femelles sont de couleur vert jaunâtre. La floraison s'étend du mois d'avril au mois du juin ;
- Des fruits en forme de baies globuleuses, d'abord rouge et deviennent noire en automne quand ils arrivent à maturité ;
- la production de résine jaune clair (entre 4 à 5 kg par arbre) appelée 'le mastic' qui est obtenue en été par incision du tronc. La distillation de cette résine permet l'extraction d'une essence utilisée en parfumerie.

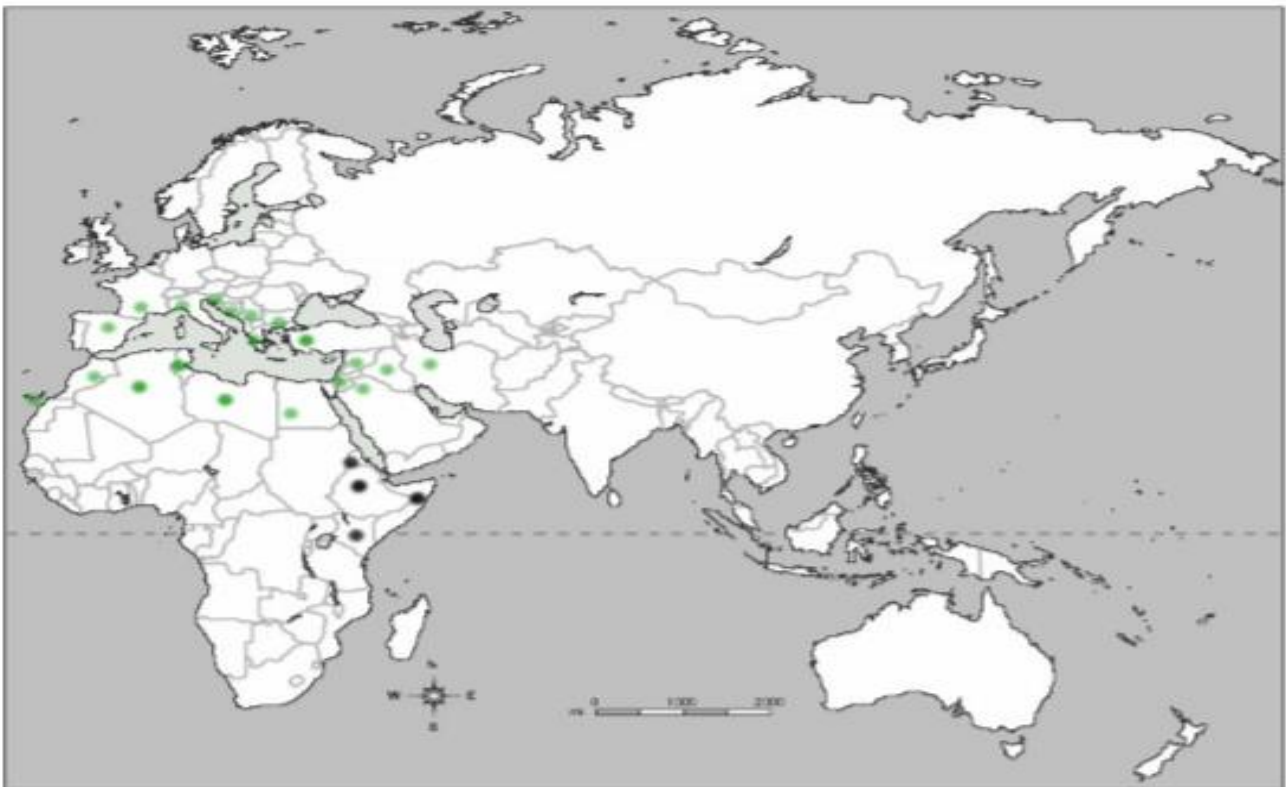


**Figure I.7.** *Pistacia lentiscus* : a. fleurs, b. feuilles, c. fruits, d. résine ou mastic gum.

### II.3. Aire de répartition de l'espèce *Pistacia Lentiscus*

*Pistacia lentiscus* est une espèce sauvage, thermophile, largement distribuée dans les écosystèmes extrêmes de la région méditerranéenne. On la rencontre également en Europe, Asie, et en Afrique (Figure I.8). Cette espèce est adaptée au climat semi-aride de la méditerranée et aux sols désertique et salin (Rauf et al., 2017).

En Tunisie, cette espèce a une large répartition géographique et bioclimatique, allant des régions humides jusqu'aux régions arides (Trabelsi et al., 2012). On la retrouve aussi en Algérie, Maroc, Turquie, France, Espagne, Italie et Grèce (Tingshuang et al., 2008).



**Figure I.8.** Répartition géographique de *Pistacia lentiscus*. Noir= *Pistacia lentiscus* subsp. *emarginata*. Vert= *Pistacia lentiscus* subsp. *lentiscus*. (Al-Saghir, 2006)

### II.4. Composition chimique

#### II.4.1. Les métabolites primaires

Le métabolisme primaire regroupe toutes les voies de synthèse de composés indispensables à la croissance et au développement de la plante. Les métabolites primaires qui en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucres et polysaccharides...). Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux acides gras de *Pistacia lentiscus*.

## Chapitre I : Bibliographie

### II.4.1.1. Les acides gras

Les fruits matures de *P. lentiscus* produisent une huile végétale caractérisée par sa richesse en acides gras monoinsaturés. Ces derniers présentent 53% des acides gras totaux. Le principal acide gras est l'acide oléique (50,72%), suivie de l'acide palmitique (23,2%) et l'acide linoléique (21,75%). D'autres acides gras sont présents en très faible quantité comme l'acide palmitoléique (1,28%), stéarique (1,13%), linoléique (1%), gadoléique (0,18%) et arachidique (0,006%). Les rendements en huile varient entre 1,83 et 42,54% en fonction du stade de maturité (Trabelsi et al., 2012).

### II.4.2. Les métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection contre les UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...). Certains de ces composés participent à la défense contre les bioagresseurs (Herms et Mattson, 1992). Les produits des métabolismes secondaires sont très nombreux, plus de 200.000 structures ont été identifiées. On distingue classiquement quatre grandes catégories de métabolites secondaires chez les plantes : les composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes et composés azotés et les composés terpéniques.

Chez l'espèce *Pistacia lentiscus* les métabolites secondaires les plus connues sont les terpénoïdes, les stérols, les composés phénoliques et leurs dérivés.

#### II.4.2.1. Les terpénoïdes

##### II.4.2.1.1. Les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes

Les feuilles, les fruits, les fleurs et la résine du Lentisque sont riches en huile essentielle. La composition de l'huile essentielle varie, qualitativement et quantitativement, en fonction de plusieurs facteurs incluant la méthode d'extraction, le sexe de la plante, la période de collecte, l'origine géographique, les conditions climatiques ainsi que les caractéristiques génétiques de la plante, qui peuvent influencer le chémotype de l'huile essentielle (Alma et al., 2004 ; Benamar et al., 2010). Ces facteurs influencent les voies de biosynthèse de l'huile essentielle et par conséquent les caractéristiques des principaux métabolites et leurs pourcentages (Amhamdi et al., 2009).

## Chapitre I : Bibliographie

Les monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés sont les principaux composants de l'huile essentielle de *P. lentiscus*. Le composant majeur des monoterpènes hydrocarbonés est  $\alpha$ -pinène (Bozorgi et al., 2013).

L'huile essentielle de *P. lentiscus* extraite à partir des feuilles, par hydrodistillation, et provenant de la Tunisie a été caractérisée par sa richesse en  $\alpha$ -pinène (20,6%), limonène (15,3%) et  $\beta$ -pinène (9,6%) (Isamil et al., 2013). Cependant, Bachrouch et al. (2010) ont rapporté que l'huile essentielle des feuilles du Lentisque issues de la région Nord de Tunis est principalement composée du terpinène-4-ol (23,32%),  $\alpha$ -terpeniol (7,12%) et  $\beta$ -caryophyllène (22,6%).

Amhamdi et al., (2009) ont rapporté que les principaux composants de l'huile des feuilles de la région marocaine étaient : myrcène (39,2%), limonène (10,3) gurjunène (7,8), germacrène (4,3%), pinène (2,9%), muurolène (2,9), humulène (2,6), epi bicyclosesquiphellandrène (2,5),  $\alpha$ -pinène (2,2).

Les composants majeurs de l'huile essentielle, obtenue à partir des parties aériennes, des 3 régions d'Algérie (Alger, Tizi-Ouzou et Oran) étaient le longifolène dans les huiles d'Alger et de Tizi-Ouzou (12 et 16,4% respectivement) et  $\alpha$ -pinène (19,0%) dans l'huile d'Oran (Dob et al., 2006).

L'huile essentielle obtenue à partir des fruits est composée de 90 à 96% d'hydrocarbures monoterpéniques et 3,2% de sesquiterpènes. Les fruits non mûrs sont constitués de 22% d' $\alpha$ -pinène et 54% de  $\beta$ -myrcène ; alors qu'à la maturité leurs huiles essentielles sont constituées de 11% d' $\alpha$ -pinène et 72% de  $\beta$ -myrcène (Boelens et Jimenez, 1991).

Les principaux constituants de l'huile essentielle de la résine de *Pistacia lentiscus* var. Chia est :  $\alpha$ -pinène (63%),  $\beta$ -pinène (3,3%),  $\beta$ -myrcène (25%), limonène (1,5%), et  $\beta$ -caryophyllène ; d'autres constituants représentent 6,2% de la concentration totale (Koutsoudaki et al., 2005)

### II.4.2.1.2 Les diterpenoïdes

Ils sont présents à l'état de trace dans l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

### II.4.2.1.3. Les triterpenoïdes

La résine de *P. lentiscus* est formée par des triterpènes penta et tetracycliques. Parmi les triterpènes on trouve l'acide masticadienonic, l'acide masticadienolic, acide morolic, acide oleanolic, acide ursonic et leurs dérivés dans la fraction acide de la résine (Assimopoulou *et al.*, 2005a ; Sharifi *et al.*, 2012), tandis que la fraction neutre de la résine contient de nombreux



## Chapitre I : Bibliographie

triterpénoïdes comme le tirucalol, dammaradiénone,  $\beta$ -amyrin, lupeol, oleanolic aldehyde et 28-norolean-12-en-3-one (Assimopoulou *et al.*, 2005b).

### II.4.2.2. Les stérols

L'huile fixe de *P. lentiscus* est caractérisée par la présence de 4 phytostérols majoritaires qui sont le  $\beta$ -sitostérol, le campestérol, le cholestérol et le stigmastérol (Trabelsi *et al.*, 2012).

### II.4.2.3. Les composés phénoliques

Les feuilles de *P. lentiscus* sont caractérisées par leurs richesses en composés phénoliques. Elles contiennent entre 5 à 7% de gallotannins à savoir les dérivés gallolyle tels que les acides mono, di, et tri-O-gallolyle quinique et l'acide gallique (Romani *et al.*, 2002).

Ces feuilles sont également riches en glycosides de flavonols tels que la quercétine, myricétine, lutéoline et isoflavone génistéine (Vaya *et al.*, 2006 ; Stocker *et al.*, 2004).

Les graines du lentisque renferment 5,4mg/ml d'anthocyanines composés principalement par cyanidine-3-O-glucoside (70%), delphinidine-3-O-glucoside (20%) et cyanidine-3-O-arabinoside (10%) (Longo *et al.*, 2007).

D'autres composés phénoliques comme l'acide digallique (Bhourri *et al.*, 2011), l'acide gallique et le 1,2,3,4,6-pentagallolylglucose (Abdelwahed *et al.*, 2007) ont été isolés des baies du lentisque.

### II.4.2.4. Les alcaloïdes

Ils sont présents dans les fruits et absents dans les feuilles et les tiges (Barbouchi *et al.*, 2018).

## II.5. Utilisations et vertus traditionnelles

Traditionnellement, le Lentisque est essentiellement utilisé pour sa résine, on se sert également de ses feuilles, de son bois et de ses fruits pour des usages alimentaires, domestiques ou médicaux (De Lanfranchi *et al.*, 1999).

### II.5.1. La résine

Elle a été utilisée en Europe, en dentisterie pour l'occlusion des dents cariées; en médecine comme antidiarrhéique, antiscorbutique ou sous forme de cataplasme. Elle a été

## **Chapitre I : Bibliographie**

également utilisée pour faire des fumigations et pour la fabrication de vernis et de colles (Dorvault, 1928). Elle est obtenue par incision du tronc en été.

Dans l'Antiquité cette résine a été employée comme un produit cosmétique. En effet, selon Dioscoride, les femmes grecques s'en servaient de cette résine pour fixer des cils postiche sur leurs paupières. En Afrique du Nord, elle servait de parfum et de dépilatoire. Elle a été également utilisée en Orient, comme masticatoire parfumé, pour rafraîchir l'haleine et protéger les gencives. Elle a été aussi utilisée pour embaumer les cadavres (De Lanfranchi et al., 1999).

### **II.5.2. Les feuilles**

Les feuilles du Lentisque sont utilisées pour leur propriété antiparasitaire pour lutter contre les charançons, les teignes et les puces. En Afrique du Nord, on utilisait des infusions préparées à partir de ces feuilles pour enlever l'odeur de sueur et la mauvaise haleine.

Grâce à leur richesse en tanins, les feuilles étaient utilisées pour le tannage du cuir en Libye. Dans d'autres pays comme la Macédoine, la Tunisie, le Maroc et l'Anatolie, elles sont utilisées pour teindre la laine des tapis en noir (De Lanfranchi et al., 1999).

### **II.5.3. Les fruits**

Les fruits sont principalement utilisés pour l'extraction de l'huile fixe. En Méditerranée, cette huile a de nombreuses utilisations. En effet, au Maroc l'huile des fruits de Lentisque est employée sous forme d'onguent pour soulager les douleurs dorsales et soigner les brûlures. En Tunisie, cette huile comestible est utilisée traditionnellement par la population tunisienne dans son alimentation quotidienne en salades et pâtisseries (Trabelsi et al., 2012). Elle sert également de condiment dans le nord-ouest de la Tunisie et elle est utilisée pour le traitement de la gale, des allergies respiratoire, des rhumatismes et dans la fabrication de pilules anti-diarrhéiques (Le Floch et Nabli, 1983).

En orient et en Espagne on l'utilise pour l'éclairage (Bonnier et Douin, 1934), pour la fabrication des savons ou la préparation d'une sorte de beurre, en la mélangeant avec de la pâte d'amande ou de la farine, connue pour ces propriétés aphrodisiaque (De Lanfranchi et al., 1999)

Les fruits sont aussi utilisés en confiserie et pour la fabrication d'une liqueur appelée « mastiche ».

#### **II.5.3.1. Extraction traditionnelle de l'huile de Lentisque**

L'extraction de l'huile de Lentisque est effectuée exclusivement par des femmes selon une méthode héritée de mère en fille. Toutefois, il existe quelques difficultés de

## **Chapitre I : Bibliographie**

commercialisation et des problèmes liés à la méthode d'extraction qui se voit non ergonomique et qui donne un rendement faible en huile et de mauvaise qualité.

Les étapes de l'obtention de l'huile sont les suivantes :

- **Le broyage**

Les fruits de Lentisque sont broyés à l'aide d'un hachoir ordinaire ou électrique.

- **Le malaxage**

La pâte obtenue est ensuite homogénéisée dans un bain mari manuellement par une spatule permettant de réunir les gouttelettes d'huile et facilitant ainsi la séparation future des phases.

- **La presse**

Le broyat est soumis à l'action de presse hydraulique ou manuelle afin de séparer la phase liquide des tourteaux. Le jeu obtenu est laissé au repos. L'huile remonte à la surface et elle est ensuite récupérée.

En Tunisie, la production annuelle est généralement de 30 à 40 litres par ménage. Le prix d'un litre varie de 30 à 60 dinars.

### **II.5.4. Le bois**

Le bois du Lentisque est employé en ébénisterie, en menuiserie et comme bois de chauffage. Les cendres obtenues à partir du bois servaient comme savon (De Lanfranchi et al., 1999).

## **II.6. Activités biologiques et pharmacologiques**

De nombreuses études pharmacologiques ont rapporté que les molécules contenues dans les différentes parties (feuilles, fruits, partie aérienne) de cette plante ont de multiples activités biologiques à savoir : anti-oxydantes, antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, etc, qui sont résumées dans le tableau suivant :

## Chapitre I : Bibliographie

**Tableau I.1.** Activités biologiques et pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*

	Activités biologiques	Partie utilisée	Métabolites/ Extraits	Références
<i>Pistacia lentiscus</i>	anti-oxydante	Fruits	Acide digallique	Bhouri et al., 2010
			Extrait hydro-alcoolique	Remila et al., 2015
		Feuilles	Huile essentielle	Barra et al., 2007
			Fractions aqueuses du chloroforme et d'hexane	Atmani et al., 2009
		Mastic	Extrait aqueux de résine	Sakagami et al., 2009
	Antimicrobienne et antivirale	Feuilles	Huile essentielle	Djenane et al., 2011
			Extrait méthanolique	Chrysaavgi et al., 2008
		Fruits	Huile végétale	Mezni et al., 2015
			Extrait phénolique	Mezni et al., 2015
		Mastic liquide	Extrait aqueux de mastic	Sakagami et al., 2009
	Antifongique	Feuilles	Huile essentielle	Ismail et al., 2013
	Antiinflammatoire	Feuilles	Extraits aqueux, chloroforme, ethyl acetate et méthanol	Dellai et al., 2013
		Fruits	Huile végétale	Ben Khedir et al., 2016
			Extrait hydro-alcoolique	Remila et al., 2015

## Chapitre I : Bibliographie

			Huile végétale	Al-said et al., 2009
Antidiabétique	Fruits		Huile végétale	Djerrou et al., 2011
			Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
	Feuilles		Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
Anticancéreuse	Feuilles		Extrait hydro-alcoolique	Remila et al., 2015
Hépatoprotectrice	Feuilles		Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
Anticholinestérasique	Feuilles		Extrait aqueux	Benamar et al., 2010
Insecticide	Feuilles		Huile essentielle	Bachrouch et al., 2010
Antimutagène	Feuilles		Huile essentielle	Ben Douissa et al., 2005
			Extrait aqueux	Hayder et al., 2005
			Extrait enrichi en flavonoïdes	Hayder et al., 2005
Anti-ulcère	Fruits		Huile végétale	Naouar et al., 2016

### II.7. Applications industrielles

De nombreux produits sont formulés à partir d'ingrédients issus de *Pistacia lentiscus* tels que la résine, l'huile essentielle, l'huile végétale ou des extraits enrichis.

La société Super Smart commercialise un supplément naturel à base de la résine de mastic (*Pistacia lentiscus*) sous le nom de Mastic gum. Ce supplément nutritionnel semble protéger la muqueuse gastrique, possède des effets antimicrobiens et antifongiques et présente un intérêt contre la dyspepsie et les ulcères gastroduodénaux. La boîte de 60 gélules est vendue à 32 euros.

Mastic Gum est un autre produit à base de la résine de *Pistacia lentiscus*, commercialisé par la société Jarrow formulas pour protéger l'estomac et prévenir les problèmes gastriques.

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est commercialisée par de nombreuses sociétés comme Vitalba, Huiles & Sens, Florame, etc. Cette huile est connue pour ces propriétés anti-œdémateuse, antalgique cutanée, parasiticide, insectifuge, décongestionnante veineuse et lymphatique, décongestionnante prostatique et décongestionnante des sinus et des bronches.

L'huile végétale des fruits de Lentisque obtenue par pression mécanique est également commercialisée par le laboratoire Nature orient.

Le Lentisque est même utilisé dans plusieurs parfums comme Lilaia (Bvlgari), Infusion d'Iris (Prada), French Mastic (Queen B), etc. La figure I.9 regroupe les produits commercialisés à base de Lentisque.

## Chapitre I : Bibliographie

A



B



C



D Mastic or Lentisque Parfemi



**Figure I.9.** Produits commercialisés à base de *Pistacia lentiscus*. A. Huiles essentielles, B. Huiles végétales, C. Compléments alimentaire, D. Parfums.

**Chapitre II : Matériel et méthodes**



## Chapitre II: Matériel et Méthodes

### I. Matériel végétal

Les feuilles matures et les fruits en début de maturité (de couleur rouge) de *Pistacia lentiscus* ont été collectés de la région de Tabarka située au Nord-ouest de la Tunisie aux coordonnées géographiques suivantes obtenus par GPS (36°57'33,6" N et 08°57'36,2" E, Altitude: 20 m). La collecte a été faite en Décembre 2015 pour les feuilles et en Septembre 2016 pour les fruits. Les échantillons ont été identifiés par monsieur le Professeur Abderrazek Smaoui, botaniste du Centre de Biotechnologie de Borj Cédria.

Les feuilles et les fruits ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant deux semaines. Après séchage, les échantillons ont été broyés en poudre fine (1 à 2 mm de diamètre). Pour les feuilles un broyeur à couteaux Microtron MB 550 (voltage 230 V  $\pm$  10% ; fréquence 50-60 Hz et puissance: 550 W) a été utilisé alors que pour les fruits un broyeur IKA MF 10 basic (vitesse de rotation : 6500rpm et diamètre de tamis : 2 mm) a été utilisé en raison de leurs structure relativement dure.

### II. La méthodologie

#### III.1. Les huiles végétales

##### III.1.1. Extraction des lipides des fruits de *Pistacia lentiscus*

L'huile végétale des fruits de *Pistacia lentiscus* a été obtenue à l'aide d'un extracteur Soxhlet (Figure II.1). Dix solvants verts ont été sélectionnés pour l'extraction des lipides (EtOH, IPA, EtOAc, lactate d'éthyle, DMC, p-cymène,  $\alpha$ -pinène, limonène, MeTHF et CPME). L'hexane, conventionnellement utilisé, est pris comme référence.

30 grammes de poudre des fruits de *P. lentiscus* préalablement séchées et broyées ont été introduites dans une cartouche cellulose de 30 mm x 100 mm (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) placée à l'intérieur de la chambre d'extraction d'un extracteur Soxhlet de 125 ml et positionnée sur un ballon de 500 ml contenant 300 ml de solvant. Après 8h d'extraction, les extraits obtenus ont été évaporés sous pression réduite, en utilisant un évaporateur rotatif à 45°C, à l'exception des extraits de lactate d'éthyle, de p-cymène, d' $\alpha$ -pinène et de limonène. Ces solvants ont un point d'ébullition élevé (154°C, 177°C, 155°C et 176°C, respectivement) et leur élimination n'est pas possible par évaporation classique. Ainsi, pour faciliter leur évaporation, le principe de distillation hétéroazéotropique a été appliqué. Ainsi, 50% (v/v) d'eau ont été

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

ajoutés aux extraits de p-cymène, d' $\alpha$ -pinène et de limonène et 70% (v/v) d'eau ont été ajoutés aux extraits de lactate d'éthyle. Ensuite, les mélanges ont été évaporés sous pression réduite comme décrit précédemment.

Les rendements d'extractions sont exprimés en g/100gMS.

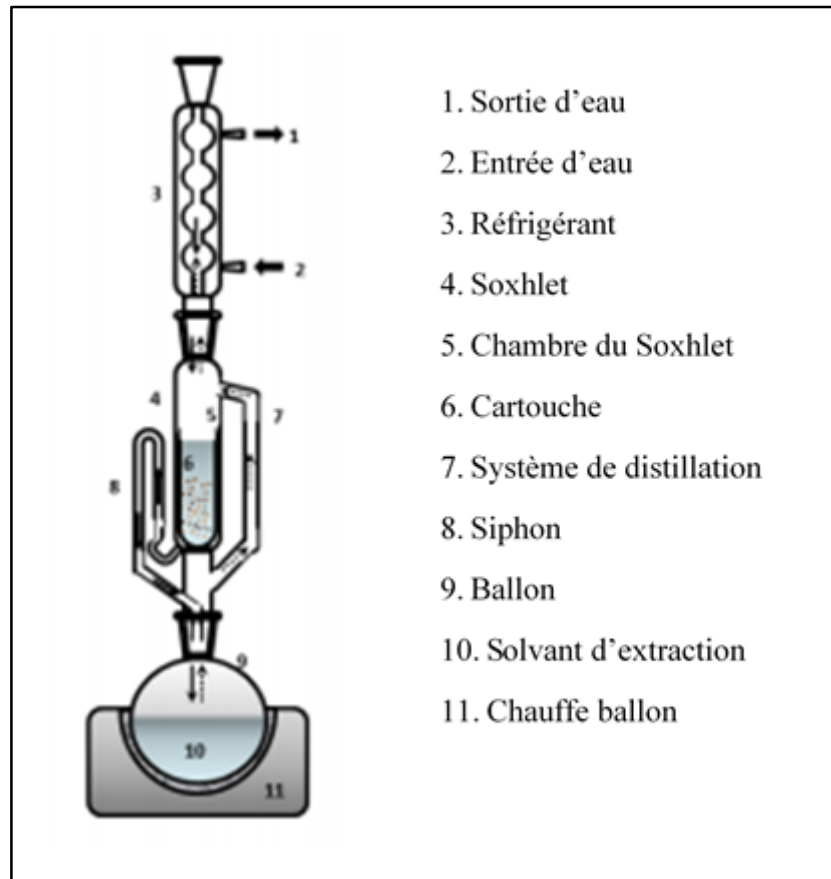


Figure II. 1. Extracteur Soxhlet

### III.1.2. Analyses de la composition lipidique

#### III.1.2.1. Analyse qualitative et quantitative des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID)

##### a. La dérivation des acides gras

Afin d'être analysés en CPG les acides gras doivent être transformés en composés plus volatiles : les esters méthyliques. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ont été préparés

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

selon la méthode décrite par Morrison et Smith (1964) au moyen d'une transméthylation catalysée par un acide ( $H_2SO_4$ ).

Ainsi, 10 à 15 mg d'huile ont été pesée dans un tube à hémolyse. Ensuite, 1 ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 5% et 500  $\mu$ l du glycéryl triheptadecanoate (TAG : C17 à 2 mg/ml), utilisé comme étalon interne, ont été ajoutés. Le mélange obtenu a été chauffé à 85°C pendant 90 min. Après refroidissement, 1 ml d'hexane et 1,5 ml de solution de chlorure de sodium (0,9%) ont été ajoutés au mélange et agités vigoureusement pendant 30 s. Après décantation 2  $\mu$ l de la phase hexanique supérieure contenant les EMAG ont été transférés dans des vials pour être injectés en CPG.

### b. Analyse des EMAG

L'analyse des EMAG a été conduite sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7820 A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire BD-EN14103 (30m  $\times$  320 $\mu$ m  $\times$  0,25 $\mu$ m). L'hélium était utilisé comme gaz vecteur à une vitesse de circulation constante de 33 cm s<sup>-1</sup>. L'échantillon à analyser a été injecté en mode split (split ratio : 1/20) et la température de l'injecteur a été fixée à 250°C. La température du four a été programmée comme suit: tout d'abord, la température a été maintenue à 50°C pendant 1 min, puis augmentée à 220°C à une vitesse de 20°C/min et atteint 280°C à une vitesse de 2°C /min. Enfin, elle a été maintenue à 230°C pendant 10 min. Les EMAG ont été identifiés en comparant leur temps de rétention avec ceux des standards à l'aide du logiciel Agilent EZChrom Elite.

### III.1.2.2. Analyse des classes de lipides par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)

Les lipides neutres et polaires de l'huile de *P. lentiscus* ont été séparés et quantifiés par densitométrie à l'aide d'un système HPTLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland) (Figure II.2).

Tout d'abord, les plaques ont été conditionnées avec un mélange de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et activées à 110°C pendant 60 minutes sur un chauffe plaque TLC afin d'enlever des éventuelles impuretés. Ensuite, les extraits lipidiques ont été déposés en « spray bande » à l'aide d'un déposeur automatique ATS 4 (CAMAG, Switerland), utilisant l'azote comme gaz vecteur, sur des plaques de silice de 20 x 10cm (gel de silice 60 F254; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Les plaques ont été développées dans un développeur automatique ADC2 (CAMAG). Deux systèmes d'élution différents ont été utilisés pour la

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

séparation des lipides neutres et polaires. Pour les lipides neutres, l'élution a été réalisée avec un mélange hexane/diéthyléther/acide acétique glacial dans un rapport de 65: 35: 2 (v/v/v) jusqu'à 85 mm. Quant aux lipides polaires, l'élution a été réalisée à l'aide d'un mélange d'acétate de méthyle/isopropanol/chloroforme/méthanol/KCl (solution à 0,25%) dans un rapport de 25: 25: 25: 10: 9 (v / v / v / v / v) jusqu'à 85 mm. Après séchage, les plaques de silice ont été plongées pendant 6 secondes dans une solution de primuline (10 mg de primuline, 160 ml d'acétone et 40 ml d'eau) puis scannées à l'aide d'un scanner densitométrique 3 TLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland). L'identification et la quantification des différentes classes de lipides ont été réalisées grâce à la présence des standards en utilisant le logiciel WinCATs (CAMAG). Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif.



**Figure II.2.** Les différentes composantes de l'HPTLC

### III.2. Les arômes

#### III.2.1. Extraction des composés aromatiques des feuilles de *Pistacia lentiscus*

- **Hydro-distillation**

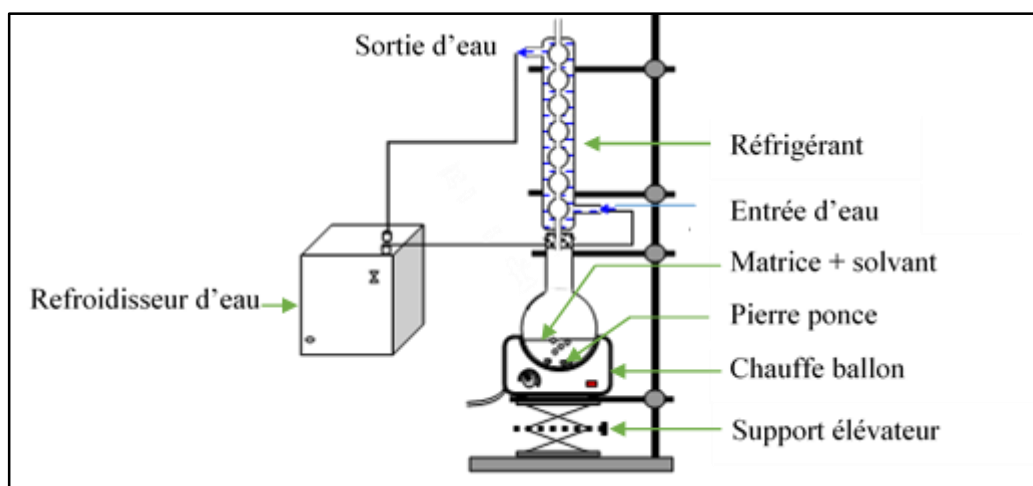
L'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* a été obtenue par hydrodistillation. Pour ce faire, 200g de feuilles séchées et finement broyées (1mm de diamètre) ont été mélangées à 600 ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite soumis à l'hydrodistillation pendant 2 heures dans un appareil de type Clevenger. A la fin de l'extraction l'huile essentielle obtenue est récupérée et conservée à 4°C jusqu'à l'analyse.

- **Extraction à reflux**

Six solvants alternatifs ont été utilisés pour l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus*: CPME, DMC, EtOH, EtOAc, MeTHF et IPA. L'hexane, conventionnellement utilisé, est pris comme référence.

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

5g de feuilles séchées et finement broyées ont été mélangées avec 50 ml de solvant dans un ballon à col rodée contenant quelques pierres ponce. L'extraction a été réalisée à la température d'ébullition de chaque solvant dans un extracteur à reflux (Figure II.3). Après 2 heures d'extraction, et après avoir été refroidi, le mélange a été filtré sur un filtre en microfibre de verre de 1,6  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ensuite, les extraits obtenus ont été évaporée sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C et conservés à 4°C avant d'être analysés en GC-MS. Les extractions ont été réalisées en triplicata.



**Figure II.3.** Montage à reflux

### III.2.2. Analyses chromatographique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'un appareil GC-MS QP-2010 (Shimadzu, Japon) équipé d'un passeur automatique d'échantillons AOC-5000. Le passeur a été utilisé en mode injection liquide utilisant une seringue de 10 $\mu\text{l}$ . La séparation des métabolites a été réalisée sur une colonne capillaire de type ZB5MS (Phenomenex, 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ).

1 $\mu\text{l}$  d'extrait a été injecté en mode splitless à 250°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 ml/min.

La séparation des métabolites a été effectuée en utilisant le programme de température suivant : la température initiale du four a été maintenue à 40°C pendant 2 min, puis augmenté à 230°C à une vitesse de 5°C/min et maintenue constante à 230°C pendant 5 min. La

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

température de la ligne de transfert entre la GC et la MS était de 230°C et la température de la source d'ionisation était de 200°C. Le spectromètre de masse a été utilisé en impact électronique à 70eV en mode scan (1 scan toutes les 0,2 s). La gamme de masse étudiée était comprise entre 33 et 300 m/z.

Les données GC-MS ont été collectées et traitées avec le logiciel labsolution GC-MS solution 2,72, Shimadzu.

Les composés aromatiques ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse et leur indice de rétention à ceux de la banque de données spectrales NIST08 (Gaithersburg, MD, USA) ou en comparant leur indices de rétention à ceux de la base de données pherobase combiné à des données de littérature de l'indice de rétention (Adams, 1995). Pour d'autres composés, l'identification a été réalisée en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres de masse à ceux d'échantillons authentiques. L'indice de rétention linéaire (LRI) a été mesuré par injection de séries homologues d'alcanes (carbones en C10 à C30).

L'analyse semi-quantitative a été effectuée à l'aide d'un étalon interne 4-nonanol (1,1 µg dans 10 µl de méthanol) introduit avant l'injection GC-MS.

### III.2.3. Traitement des données et analyses statistiques multivariées

Avant de procéder au traitement de données, les données GC-MS ont été converties en fichier NetCDF grâce au logiciel LabSolutions GC-MS solution 2,72, (Shimadzu, Japan). Ensuite, les fichiers NetCDF ont été exportés en ligne à la plateforme virtuelle workflow4metabolomics. Il s'agit d'un environnement de recherche virtuel pour l'analyse métabolomique qui offre un large spectre d'outils comme le pré-processing des données brutes, la normalisation, le contrôle qualité, les analyses statistiques uni et multivariées, etc.

Les données GC-MS ont été extraite en ligne en utilisant le package metaMS. Ensuite, la matrice de données a été normalisée par rapport à l'étalon interne, le 4-nonanol. Les traitements statistiques uni et multivariées ont été effectuées grâce au logiciel SIMCA (version 14.1.0.2047, Umetrix, Umeå, Sweden). Ainsi, la matrice de donnée a été au préalable transformée en  $\log_{10}$  avant l'analyse chimiométrique. Après, des analyses non supervisées comme l'analyse en composante principale (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) et des analyses supervisées comme la PLS-DA ont été effectuées.

Afin de valider la robustesse des modèles discriminants PLS, deux tests ont été effectués : le test de validation croisée CV-ANOVA (seuil de signification = 0,05) et le test de permutation.

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

A partir de ces modèles, les VIP (Variable Importance in Projection) ont été déterminés. Plus la valeur du VIP est importante, plus son rôle explicatif de la variance est important. En effet, les VIP indiquent l'importance de la variable dans l'explication de la variance dans chaque dimension du modèle et se sont les variables qui contribuent le plus à la construction du modèle. Généralement les VIP ayant une valeur supérieure à 1 sont considérés comme les plus discriminants. Dans notre cas seulement les métabolites ayant une valeur du VIP supérieur à 1,5 ont été identifiés.

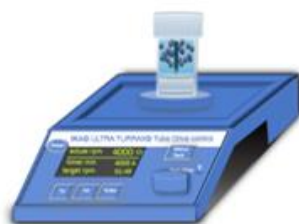
Pour l'identification, l'ion caractéristique de chaque métabolite d'intérêt ainsi que le temps de rétention correspondant ont été déterminés. Ensuite, le pic chromatographique correspondant à chaque ion a été intégré et le spectre de masse global a été ainsi généré. Finalement, l'identification des composés a été réalisée par comparaison des spectres de masse avec ceux des bibliothèques Wiley275 et NIST et par comparaison des indices de rétention avec ceux de la base Pubchem et de la publication de Adams (Adams, 1995).

### III.3. Les antioxydants des graines de *Pistacia lentiscus*

#### III.2.1. Eco-extraction des antioxydants des graines de *Pistacia lentiscus*

Les composés phénoliques des graines de *P. lentiscus* ont été extraits à l'aide d'un broyeur IKA Ultra Turrax Tube drive (UTTD, IKA WERKE, Germany) (Figure II.4) en utilisant différents systèmes de solvants (EtOH/H<sub>2</sub>O) à différentes ratios (100:0 ; 90:10 ; 80:20 ; 70:30 ; 60:40 ; 50:50 ; 40:60 ; 30:70 ; 20:80 ; 10:90 ; 0:100) (Figure 13).

Ainsi, dans un tube contenant 20g de billes en céramique on introduit 2,5 grammes de poudre finement broyée (4mm) et 25 ml du solvant. L'extraction a été réalisée à 4000 tr/min pendant 30 min. Ensuite, les extraits obtenus ont été filtrés sous vide à l'aide d'un Büchner sur un filtre Whatman (diamètre : 90 mm). Les extraits ont été évaporés sous vide à 40°C en premier temps. Ensuite, les échantillons contenant des traces d'eau ont été lyophilisés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.



**Figure II.4.** Broyeur IKA Ultra Turrax Tube drive.

### III.2.2. Etude de la composition phénolique

#### III.2.2.1. Dosage des composés phénoliques

- **Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin est basé sur une réaction d'oxydo-réduction. En effet, le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, se réduit lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Pour le dosage, 125 µl d'extrait dilué ont été mélangés avec 500 µl d'eau distillé et 125 µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation au vortex, 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (7%) et 1 ml d'eau distillée ont été additionnées. L'absorbance du mélange est mesurée, après 90 min de repos à l'obscurité, à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (Biochrom, Libra S22, UK). La gamme étalon d'acide gallique a été préparée à des concentrations de 0 à 400 µg/ml. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/gMS).

- **Dosage des flavonoïdes totaux**

250 µl d'extrait ont été mélangés avec 75 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>, 5%). Après 6 min de repos, 150 µl d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 10%) fraîchement préparée ont été ajoutés. Après 5 min de repos à température ambiante, 500 µl de NaOH (1M) et 1525 µl d'eau distillé ont été additionnés. L'absorbance du mélange a été déterminée à 510 nm. La gamme étalon a été préparé avec de la catéchine à des concentrations de 0 à 600 µg/ml. Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/gMS).

- **Dosage des anthocyanes**

Le dosage des anthocyanes des fruits de *P. lentiscus* a été réalisé par la méthode du pH différentiel en utilisant 2 solutions tampons : une solution de chlorure de potassium: pH 1 (0,025 M) et une solution d'acétate du sodium: pH 4,5 (0,4 M).

Dans deux tubes à hémolyse, une aliquote de chaque extrait a été diluée dans chacune des solutions tampons de pH=1 et pH=4,5. Après 30 min de repos, l'absorbance des deux solutions a été mesuré en premier temps à 510 nm et ensuite à 700 nm.



## Chapitre II: Matériel et Méthodes

La teneur en anthocyane totaux (TAC), exprimée en mg cyanidine-3-glucoside/l, a été déterminée selon l'équation suivante :

$$TAC = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Où **A**: Absorbance ( $A_{510} - A_{700}$ )<sub>pH1</sub> - ( $A_{510} - A_{700}$ )<sub>pH4,5</sub>; **MW**: Poids moléculaire de cyanidin-3-glucoside (449,2 g/mol); **DF**: Facteur de dilution;  $\epsilon$ : Coefficient d'extinction molaire de cyanidin-3-glucoside (26 900 l<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>); **l**: Trajet optique en cm = 1 cm; **10<sup>3</sup>**: Facteur de conversion du g en mg.

### III.2.2.2. Identification et quantification des composés phénoliques par HPLC

L'identification et la quantification des composés phénoliques ont été effectuées sur un chromatogramme HPLC Waters (Milford, MA) équipé d'un injecteur automatique (Waters e2695, USA), d'une pompe et d'un détecteur à barrette de photodiode Waters 2996. La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une colonne RP-18 phase inverse (250 mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m; Merck) maintenue à 25°C. La phase mobile est composée d'un système de solvant binaire (A et B). Le premier système (A) est constitué d'eau et d'acide trifluoroacétique (0,025%) et le deuxième système (B) d'acétonitrile pompés à un débit constant de 1ml/min. Le gradient d'élution a été programmé comme suit : 90 A/10 B (de 0 à 40 min), 50 A/50 B (de 40 à 41 min), 100% B (de 41 à 50 min) et 90 A/10 B (de 50 à 59 min). Le volume d'injection était de 20  $\mu$ l. La quantification des composés phénoliques des fruits du Lentisk a été faite grâce à l'utilisation des étalons à une longueur d'onde de 280 nm. Des courbes d'étalonnage ont été déterminées pour les composés d'intérêts à des concentrations variant de 1 à 5 mg/ml. Les analyses ont été réalisées en triplicata et les valeurs moyennes ont été rapportées en mg/g extrait.

### III.4. Les simulations COSMO-RS

Le modèle COSMO-RS, développé par Klamt (2003), permet de déterminer et de prédire le potentiel chimique de molécules dans un liquide sans données expérimentales. Il s'agit d'une méthode puissante utilisée comme outil d'aide à la décision pour le criblage de solvants (Sicaire et al., 2015; Rapinel et al., 2016; Ravi et al., 2018).

## Chapitre II: Materiel et Méthodes

Les calculs COSMO-RS consiste en deux étapes : une étape de calculs de chimies quantiques (COSMO) pour chaque molécule isolée puis une étape de calculs thermodynamiques, avec l'extension (RS).

Le solvant est considéré comme un milieu conducteur parfait affecté d'une constante diélectrique  $\epsilon$ , dans lequel la molécule de soluté est immergée. Dans un tel environnement, une surface est construite autour de la molécule ce qui génère un nombre important de charges électrostatiques. Afin de trouver un écrantage électrostatique idéal du système, la structure et la distribution de charges sont optimisés à l'aide des algorithmes nommé 'TZVP' (Triple Zeta Valence Polarized). Cette densité de charge est nommée  $\sigma$ -surface (Figure. II.5a). La partition de cette surface en segments surfaciques chargé permet de déterminer le  $\sigma$ -profil (Figure II.5b). Ainsi, la  $\sigma$ -surface et le  $\sigma$ -profil permettent de caractériser une molécule de référence (dans son état le plus stable, énergie minimale) en tant que soluté dans un conducteur parfait. La thermodynamique des interactions moléculaires basée sur le  $\sigma$ -profil obtenu a ensuite été utilisée pour calculer le  $\sigma$ -potentiel à l'aide du programme COSMOthermX (version C30, version 17.02) (Figure 2.5c). En effet, l'affinité d'un solvant et l'interaction entre les solutés et le solvant dans un mélange peuvent être prédites à l'aide du  $\sigma$ -profil et du  $\sigma$ -potentiel.

Ainsi, la solubilité relative des acides gras et des triglycérides majoritaires des fruits de *Pistacia lentiscus* dans les solvants verts testés ( Chapitre III) ainsi que la solubilité relative des composés phénoliques majoritaires des feuilles de *P. lentiscus* dans des mélanges hydro-alcoolique (EtOH/H<sub>2</sub>O) (Chapitre V) ont été prédites en utilisant le logiciel COSMOthermX (version C30, version 17.02) selon l'équation suivante :

$$\log_{10}(x_j) = \log_{10} \left[ \frac{\exp(\mu_j^{pure} - \mu_j^{solvent} - \Delta G_{j,fusion})}{RT} \right]$$

Où  $\mu_j^{pure}$ : potentiel chimique d'un composé pur j (Joule/mol)

$\mu_j^{solvent}$ : potentiel chimique du j à des dilutions infinies (Joule/mol)

$\Delta G_{j, fusion}$ : énergie libre de fusion du j (Joule/mol)

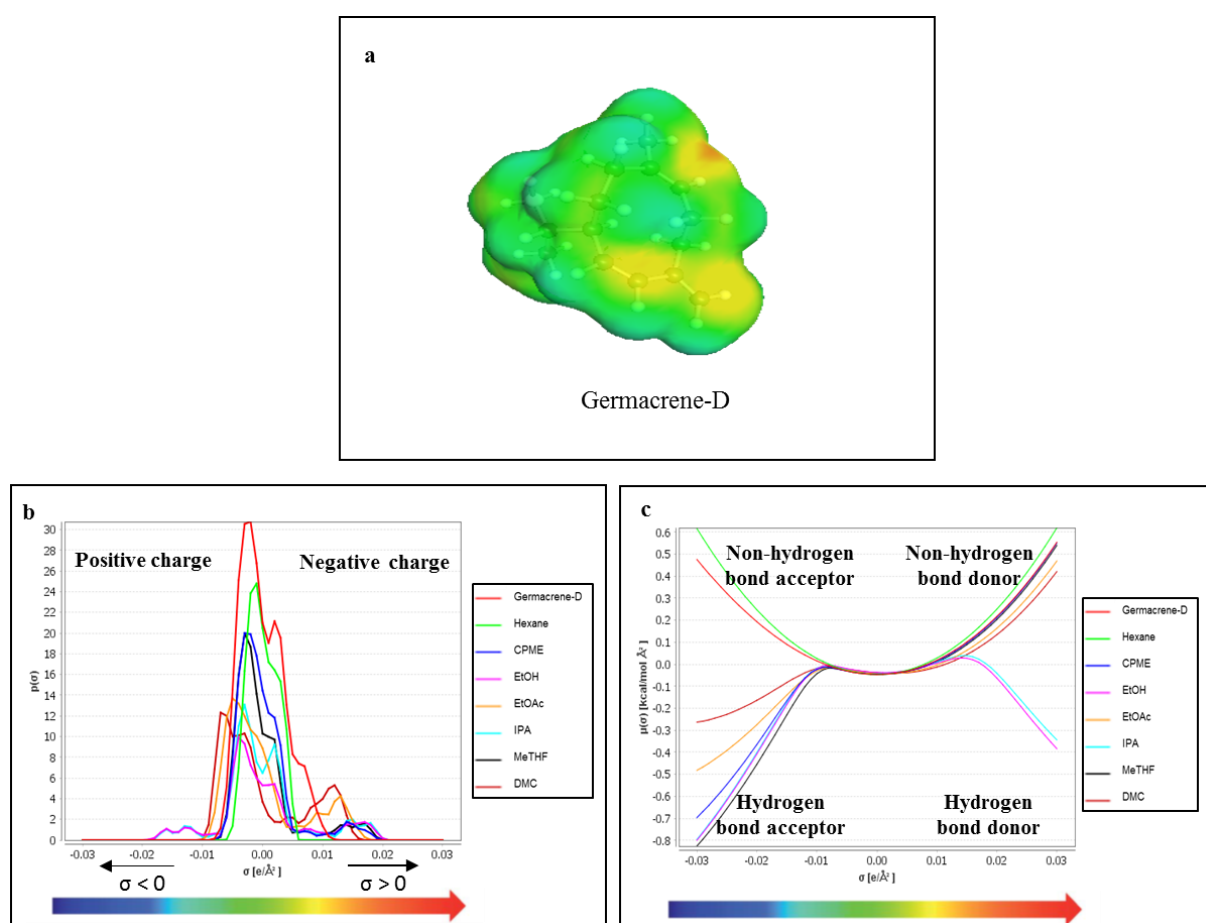
$x_j$  : solubilité du j (g/g solvant).

## Chapitre II: Materiel et Méthodes

D'autre paramètre comme le facteur de similarité des  $\sigma$ -potentiels ( $S_{i,j}^P$ ) a été calculé à l'aide du logiciel COSMOthermX (version C30, version 16.02) pour prédire la solvation des arômes dans six solvants alternatifs (Chapitre IV) selon la formule suivante :

$$S_{i,j}^P = \exp\left(-\sum_{m=-0.02}^{m=+0.02} |\mu_i(\sigma_m) - \mu_j(\sigma_m)|\right) \times 100$$

$S_{i,j}^P$  correspond à la somme des différences du potentiel chimique ( $\sigma$ -potential) de deux composés purs  $\mu_i(\sigma)$  et  $\mu_j(\sigma)$ .



**Figure II.5.** Les différentes étapes de calculs de COSMO-RS : exemple Germacrene D. **a.** surface moléculaire du Germacrene D. **b.** Energies d'interactions de surface entre  $\sigma$ -profiles du Germacrene D et des solvants. **c.**  $\sigma$ -potentiel du Germacrene D et des solvants

### III.5. Analyses des activités biologiques

#### III.5.1. L'activité antioxydante

##### III.5.1.1. Test DPPH

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

Le pouvoir anti-radicalaire des extraits a été déterminé en utilisant le réactif 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH), qui est un radical libre de couleur violette. En présence de composé anti-radicalaire le DPPH est réduit en un composé de couleur jaune (Meddour et al., 2013).

Pour le dosage, 1ml d'extrait a été additionnés à 0,250 ml de solution méthanolique de DPPH (0,2mM), après agitation au vortex, le mélange est placé à l'obscurité pendant 30 minutes. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (Biochrom, Libra S22, UK).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition des radicaux libres selon la formule suivante :

$$PI (\%) = \frac{DO_T - DO_E}{DO_T} \times 100$$

Où **PI** : pourcentage d'inhibition ; **DO<sub>T</sub>** : absorbance du témoin ; **DO<sub>E</sub>** : absorbance de l'échantillon.

La **CI<sub>50</sub>** est la concentration qui correspond à 50% d'inhibition qui permet de déterminer l'efficacité de l'extrait. Ainsi, plus cette valeur est faible plus l'activité anti-radicalaire de l'extrait est élevée.

### III.5.1.2. Test d'inhibition du blanchiment de la $\beta$ -carotène

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits par le test du blanchiment de la  $\beta$ -carotène a été réalisée selon la méthode décrite par Koleva et al. (2002).

Cette technique repose sur la mesure de l'oxydation du  $\beta$ -carotène (décoloration) en présence de composés organiques volatils et des hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation d'acide linoléique.

Ainsi, 2ml d'une solution formée par 2mg du  $\beta$ -carotène et 20 ml du chloroforme ont été introduite dans un ballon contenant 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du solvant à 40°C, 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutées. Après agitation, 150  $\mu$ l de la nouvelle solution ont été additionnés à 10  $\mu$ l d'extrait préparés à différentes concentrations dans des plaques ELISA. L'absorbance des plaques a été déterminée à  $T_0$  à 470 nm à l'aide d'un variokan flash (Thermo scientific). Ensuite, les plaques ont été incubées

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

pendant 120 minutes à 50°C. Après ce temps d'incubation ( $T_{120}$ ), l'absorbance a été mesurée également à 470 nm.

Les résultats ont été exprimés en  $CI_{50}$  (concentration qui correspond à 50% d'inhibition) et l'activité antioxydante relative à ce test a été déterminée selon l'équation suivante :

$$PI = [(DO_{E(T120)} - DO_{T(T120)}) / (DO_{T(0)} - DO_{T(T120)})] \times 100$$

Où **PI** : pourcentage d'inhibition ;  **$DO_{E(T120)}$**  : Absorbance de l'échantillon à  $T=120$  min ;  **$DO_{T(0)}$**  : Absorbance du témoin à  $T=0$  min ;  **$DO_{T(T120)}$**  : Absorbance du témoin à  $T=120$  min

### III.5.2. L'activité anti-inflammatoire

Le test de l'activité anti-inflammatoire a été conduit in vitro sur des cellules macrophages de murins RAW 264.7 en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les cellules après leur stimulation par des lipopolysaccharides (LPS) (Green et al., 1990).

- **Culture cellulaire**

La lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 (ATCC, Manassas, USA) a été cultivée dans du milieu RPMI 1640, auquel ont été ajouté 10% (v/v) de sérum fœtal de bovin, 100 U/ml de pénicilline et 100  $\mu\text{g/mL}$  de streptomycine. Les cultures de cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone.

- **Mesure de la production de nitrite**

Les cellules RAW 264.7 ont été ensemencées dans des plaques à 24 puits à une densité de  $2 \times 10^5$  cellules par puits. Puis, les cellules ont été incubées pendant 24h à 37°C afin de permettre leur adhésion.

Par la suite, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes d'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* (10, 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ) dissoutes dans du DMSO. Après 60 minutes, les cellules traitées ont été stimulées avec 100  $\mu\text{g/ml}$  de lipopolysaccharide (LPS).

Au bout de 24 h, la quantité de nitrite accumulée dans le surnageant de culture a été déterminée sur la base de la réaction de Griess (Aboura et al., 2017). L'absorbance à 540 nm a été mesurée et le taux d'oxyde nitrique (NO), produits par les cellules murins RAW264.7, a été quantifié à partir d'une courbe standard de  $\text{NaNO}_2$ . Les tests ont été effectués en triplicata.

**Chapitre III. L'huile végétale des fruits de *Pistacia Lentiscus* : éco-extraction, profilage métabolique et activité anti-inflammatoire**

### I. Introduction

L'efficacité de dix agro-solvants (EtOH, IPA, EtOAc, ethyl lactate, DMC, p-cymene,  $\alpha$ -pinene, limonene, MeTHF et CPME) a été évaluée afin de substituer l'hexane, conventionnellement utilisé, pour l'extraction de l'huile à partir des graines de *Pistacia lentiscus*. En effet, une étude théorique a été réalisée en premier temps en utilisant des outils de prédiction tels que COSMO-RS afin d'étudier la solubilité des différents métabolites de l'huile de Lentisque dans les différents agro-solvants. Ensuite, une approche expérimentale a été menée afin d'évaluer l'efficacité de ces agro-solvants et d'établir une corrélation entre les données théoriques et les résultats expérimentaux pour sélectionner un candidat potentiel au remplacement de l'hexane. Puis, l'activité anti-inflammatoire du meilleur solvant alternatif a été évaluée *in vitro* sur des cellules de macrophages murins RAW 264,7.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal 'Oilseeds & fats Crops and Lipids (OCL)' intitulée « *Pistacia lentiscus* L. edible oil: Green extraction with bio-based solvents, metabolite profiling and *in vitro* anti-inflammatory activity ».

### II. Approche *in silico* pour le screening des solvants alternatifs: les simulations COSMO-RS

Les simulations COSMO-RS ont été effectuées afin de prédire la solubilité relative des métabolites majoritaires de l'huile de graines de *Pistacia lentiscus* dans les dix solvants verts sélectionnés ainsi que dans l'hexane, pris comme référence.

Tout d'abord une recherche bibliographique exhaustive a été menée sur l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* afin de déterminer les métabolites majoritaires de cette huile qui seront utilisées pour l'analyse *in silico*. En effet, des travaux antérieurs ont rapporté que l'huile de *Pistacia lentiscus* est principalement composée par trois acides gras libres (FFA) : l'acide palmitique (C16), l'acide oléique (C18:1) et l'acide linoléique (C18:2) et quatre triacylglycérides (TAG) : Palmitoyl-oléyl-linoléoylglycérol (POL), Palmitoyl-dioléylglycérol (POO), Oléyl-dilinoléoyl-glycérol (OLL) et Trioléylglycérol (OOO) (Dhifi et al., 2013 ; Trabelsi et al., 2012). Ainsi, la solubilité relative de ces métabolites majoritaires a été prédite dans les différents solvants testés à l'aide du programme COSMOthermX (version 17).

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

Les résultats sont exprimés en solubilité relative et sont résumés dans le tableau III.1. Le logarithme,  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$ , de la meilleure solubilité est fixé à zéro et le reste des solvants sont classés par rapport au meilleur.

**Tableau II.1.** Screening des solvants verts assisté par COSMO-RS : Solubilité relative ( $\log_{10}(X_{\text{solub}})$ ) des composés majoritaires des fruits de *P. lentiscus* dans les différents solvants testés. Le logarithme,  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$ , de la meilleure solubilité est fixé à zéro et le reste des solvants sont donné par rapport au meilleur.

Solvants	FFAs			TAGs			
	FFA1	FFA2	FFA3	TAG1	TAG2	TAG3	TAG4
Hexane	-1.27	-1.34	-1.31	0	0	-0.17	-0.001
EtOH	-0.001	-0.05	0	-2.52	-2.53	-2.19	-2.55
IPA	0	0	0	-1.49	-1.51	-1.24	-1.52
EtOAc	0	0	0	0	0	0	0
Ethyl lactate	-0.22	-0.27	-0.06	-3.23	-3.24	-3.99	-3.15
DMC	-0.56	-0.51	-0.22	-1.51	-1.46	-1.21	-1.41
<i>p</i> -cymene	-1.03	-1.03	-0.9	0	0	0	0
$\alpha$ -pinene	-1.08	-1.11	-1.03	0	0	0	0
<i>d</i> -limonene	-0.96	-0.98	-0.88	0	0	0	0
MeTHF	0	0	0	0	0	0	0
CPME	0	0	0	0	0	0	0

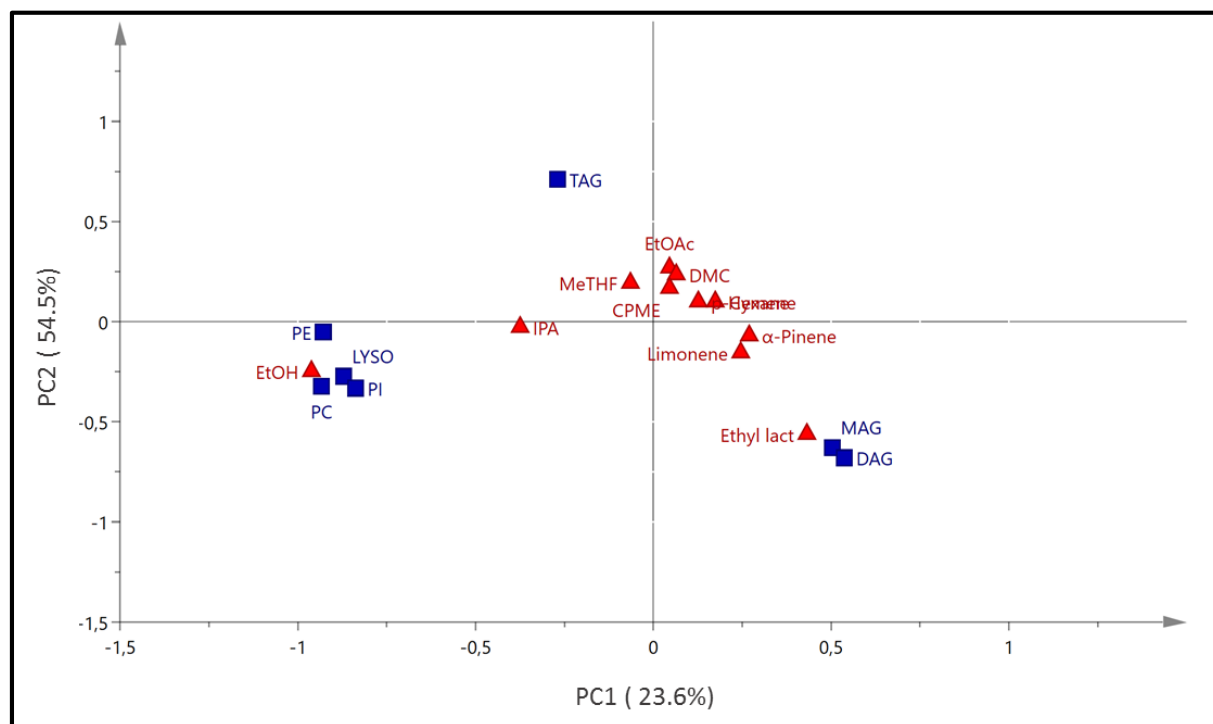
Solubility index	Reference or equivalent	Better than reference	Lesser than reference
------------------	-------------------------	-----------------------	-----------------------

**FFAs:** FFA1 (C16:0), FFA2 (C18:1), FFA3 (C18:2).

**TAGs:** TAG1: OOO (C18:2, C18:2, C18:2), TAG2: OOL (C18:2, C18:2, C18:1), TAG3: POO (C16:0, C18:2, C18:2), TAG4: POL (C16:0, C18:2, C18:1).

Les calculs issus du logiciel COSMO-RS ont montré que les agro-solvants ont un pouvoir de solubilisation des acides gras (C16, C18:1 et C18:2) plus élevé que celui de l'hexane. En effet, les logarithmes,  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$  des solvants verts sont supérieurs au  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$  de l'hexane. Quant aux TAG, les  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$  de l'EtOAc, le *p*-cymène, l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le MeTHF et le CPME sont égaux à 0, considérés comme de bons candidats pour l'extraction des TAG. Néanmoins, l'EtOH, l'IPA, le lactate d'éthyle et le DMC ne sont pas théoriquement adaptés à l'extraction des TAGs, en comparaison avec l'hexane, car leurs valeurs de solubilité sont inférieures à zéro. Afin d'étudier la variabilité générale des prédictions COSMO-RS une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée.





**Figure III.1.** Biplot de l'ACP : scores et loadings plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les valeurs  $\log_{10}(X_{\text{solub}})$  des métabolites majoritaires de *P. lentiscus* dans les différents solvants testés obtenus par COSMO-RS.

La figure III.1 illustre le biplot de l'analyse en composante principale (ACP) (scores et loadings plot) des valeurs de solubilité des FFAs et des TAGs dans les solvants étudiés. Les deux premiers axes du modèle ACP expliquent 99,2% de la variance totale, avec 71% pour le premier axe CP1 et 28,2% pour le deuxième axe CP2. L'hexane, le p-cymène, l'α-pinène et le limonène sont plus proches des TAGs et se différencient des FFAs le long de la CP1, ce qui signifie que ces solvants ont un bon pouvoir de dissolution des TAGs. Néanmoins, ils ne conviennent pas à l'extraction des acides gras. L'EtOH, l'IPA, le DMC et l'Ethyl lactate sont séparés des autres échantillons le long de l'axe CP1 et sont regroupés près des FFAs, ce qui indique que ces solvants ont le même pouvoir de solvation de ces métabolites. Le MeTHF, le CPME et l'EtOAc sont situés au centre, ce qui indique que ces solvants pourraient théoriquement extraire les TAGs et les FFAs de manière égale à partir des baies de *P. lentiscus*.

En résumé, parmi les dix solvants testés, le MeTHF, l'EtOAc et le CPME sont théoriquement les solvants les plus appropriés pour substituer l'hexane, conventionnellement utilisé, pour l'extraction de l'huile des fruits de *P. lentiscus*.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Cascant et al. (2017) qui ont rapporté que le MeTHF, le CPME et l'EtOAc sont théoriquement de bons solvants pour l'extraction des

### **Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus***

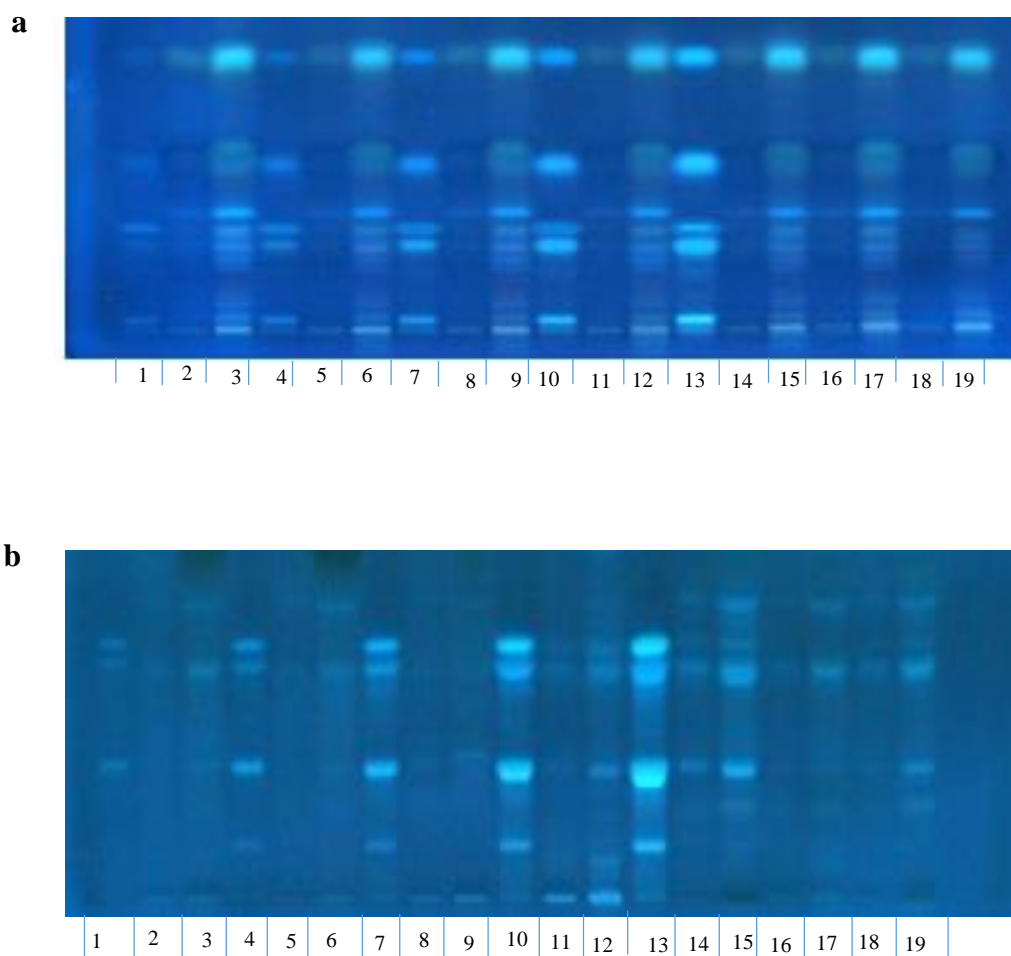
TAGs et des FFAs à partir d'huile de saumon. De plus, Sicaire et al. (2015a) ont montré que le MeTHF et le CPME sont théoriquement de bons solvants pour l'extraction des TAGs à partir d'huile de colza.

#### **III. Approche expérimentale pour le screening des solvants alternatifs**

Les 10 solvants alternatifs sélectionnés ont été testés expérimentalement afin d'évaluer leur efficacité et d'établir une corrélation entre les résultats expérimentaux avec ceux obtenus théoriquement par les simulations COSMO-RS. Ainsi, afin d'évaluer la performance des solvants verts, l'hexane, conventionnellement utilisé, a été pris comme référence.

##### **III.1. Analyse des classes de lipides par HPTLC**

Les différentes classes de lipides des extraits, obtenus par les différents solvants testés, ont été séparées et quantifiées à l'aide d'un système HPTLC (Figure III.2). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau III.2.



**Figure III.2a.** Profils HPTLC des lipides neutres après révélation sous UV à 366nm. Track 1, 4, 7, 10 and 13) Standards: MAG, ergosterols, DAG, FFA et TAG (avec RF croissant). Volume appliqué (1, 2,5, 5, 10 et 20  $\mu$ l); Track 2 et 3: extrait d'hexane, Track 5 et 6 : extrait EtOH, Track 8 et 9 : extrait EtOAc, Track 10 et 11. CPME, Track 14 et 15. MeTHF, Track 16 et 17. DMC, Track 18 et 19. IPA (volume appliqué 2 et 20  $\mu$ L).

**b.** Profils HPTLC des lipides polaires après révélation sous UV à 366nm. Track 1, 4, 7, 10 and 13 standards (Lyso, PC, PE et PI (avec RF croissant); Track 2 et 3. EtOAc, Track 5 et 6. DMC, Track 8 et 9. Ethyl lactate, Track 11 et 12. Hexane, Track 14 et 15. EtOH, Track 16 et 17. CPME, Track 18 et 19. IPA (volume appliqué 5 et 20  $\mu$ L).

Les analyses HPTLC montrent que l'huile de *Pisatcia lentiscus* obtenue par les différents agro-solvants ainsi que par l'hexane est principalement composée de TAGs (72,16% - 99,99%).

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

**Tableau III.2.** Influence du solvant d'extraction sur les classes de lipide de l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus*.

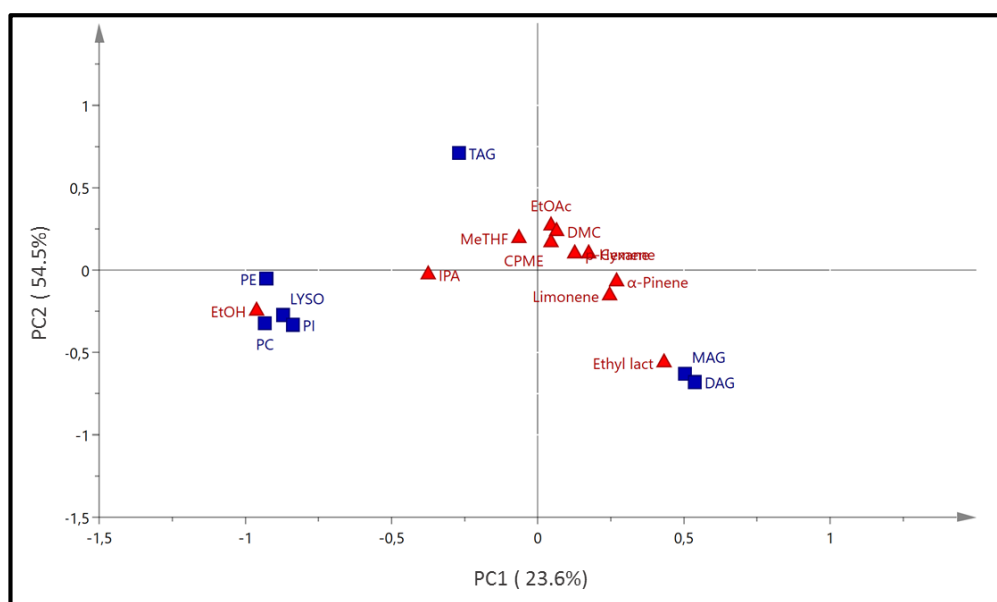
Teneurs en lipides neutres et polaires (%)											
	Hexane	EtOH	IPA	EtOAc	Ethyl lactate	DMC	p-cymene	$\alpha$ -pinene	Limonene	MeTHF	CPME
<b>Lipides neutres (%)</b>											
MAG	2.24±0.01	nd	nd	nd	8.10±0.03	nd	nd	1.51±0.01	nd	nd	nd
DAG	nd	nd	nd	nd	19.73±0.00	nd	nd	8.29±0.08	12.68±0.01	nd	nd
TAG	97.76±0.62	84.93±0.48	92.21±0.83	99.50±0.78	72.16±0.18	99.62±0.19	99.99±0.09	90.20±0.76	87.32±1.10	97.75±1.12	99.04±1.25
FFA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Lipides polaires (%)</b>											
LYSO	nd	0.07±0.02	0.09±0.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PE	nd	3.32±0.03	2.04±0.16	0.50±0.05	nd	0.38±0.02	nd	nd	nd	2.25±0.00	0.96±0.11
PI	nd	1.27±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PC	nd	10.41±0.14	5.66±0.17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Les valeurs représentées dans ce tableau sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  SD.

MAG: Monoglycérides. DAG: Diglycérides. TAG: Triglycérides. FFA: acides gras libres. LYSO: Lysophosphatidilcholine. PE: Phosphatidylethanolamine. PI: phosphatidylinositol. PC: Phosphatidylcholine.

Une ACP a été réalisée pour avoir une aperçue générale des résultats HPTLC et évaluer l'effet du solvant d'extraction sur les classes de lipides. La figure III.3 montre le biplot de l'ACP. Les deux premiers axes du modèle ACP expliquent 78,1% de la variance totale, avec 23,6% pour le premier axe CP1 et 54,5% pour le deuxième axe CP2.

Une nette discrimination est observée entre les alcools (EtOH et IPA) et le reste des solvants. En effet, l'EtOH et l'IPA sont regroupés avec les phospholipides. Ces observations montrent que les alcools ont un bon pouvoir de solvation des lipides polaires. Ainsi, ces solvants sont plus polaires que l'hexane ce qui explique la présence des phospholipides dans les extraits alcooliques.



**Figure III.3.** Biplot de l'ACP : scores et loading plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les classes de lipides analysées par HPTLC. MAG: Monoglycérides. DAG: Diglycérides. TAG: Triglycérides. FFA: acides gras libres. LYSO: Lysophosphatidilcholine. PE: Phosphatdylethanolamine. PI: phosphatidylinositol. PC: Phosphatydlcholine.

L'ethyl lactate, le limonene et l' $\alpha$ -pinène sont regroupés avec les MAG et les DAG et sont séparés des alcools d'après la CP1 et de reste des solvants d'après la CP2. En effet, ces solvants ont un profil lipidique différent des autres solvants, caractérisés par une teneur élevée en DAG (19,73, 12,68 et 8,29% pour le lactate d'éthyle, le limonène et l' $\alpha$ -pinène, respectivement). En outre, l'extrait de lactate d'éthyle contient plus de MAG (8,10%) que l'extrait de l'hexane (2,24%). Ces solvants ont un point d'ébullition élevé ce qui peut affecter leur efficacité et induire une dégradation des lipides. En effet, le risque de dégradation des lipides est augmenté en chauffant au-dessus de 100°C (Muik et al. 2005). Casacant et al. (2017) ont signalé que l'utilisation de limonène et de p-cymène comme solvant pour l'extraction de l'huile de saumon a engendré une dégradation des lipides.

#### III.2. Analyse de la composition lipidique par CPG-FID

La composition en acide gras des huiles de fruits de *P. lentiscus*, extraites par les différents agro-solvants testés et d'hexane, obtenue par CPG-FID après transméthylation, est présentée dans le tableau III.3.

**Tableau III.3.** Composition en acide gras des huiles de fruits de *P. lentiscus* obtenues par les différents solvants testés.

Boiling point (°C)	Teneurs en acide gras (%)										
	Hexane	EtOH	IPA	EtOAc	Ethyl lactate	DMC	p-cymene	$\alpha$ -pinene	Limonene	MeTHF	CPME
	69	78	82.8	77.1	154	90	177	155	176	80	106
C8 :0	-	-	-	-	-	-	-	-	5.00±0.77	-	-
C10 :0	-	0.2±0.00	0.21±0.15	0.16±0.12	-	-	-	-	-	0.32±0.03	0.12±0.04
C12 :0	-	0.08±0.01	0.08±0.00	0.13±0.00	-	-	-	-	-	0.08±0.02	0.08±0.01
C14 :0	-	0.13±0.00	0.18±0.00	0.2±0.00	-	0.18±0.01	0.15±0.06	-	0.46±0.19	0.16±0.00	0.21±0.01
C16 :0	23.96±0.58	23.21±0.05	23.19±0.02	23.59±0.09	23.63±0.00	23.4±0.08	22.11±0.24	23.3±0.32	22.39±0.48	23.09±0.09	23.36±0.10
C16:1	1.34±0.17	1.6±0.12	1.53±0.00	1.54±0.02	1.29±0.00	1.52±0.00	1.43±0.08	3.8±0.41	1.96±0.09	1.7±0.01	1.48±0.02
C18 :0	1.15±0.02	1.13±0.00	1.07±0.08	1.26±0.01	1.2±0.00	1.23±0.00	7.38±0.36	1.93±0.52	1.87±0.01	0.96±0.00	1.25±0.01
C18:1n9	48.37±0.46	46.11±0.00	45.32±0.15	45.95±0.11	45.13±0.08	46.02±0.13	41.96±0.30	43.89±0.65	41.8±0.88	47.48±0.41	45.55±0.49
C18:2n6	23.31±0.53	25.2±0.00	26.03±0.00	24.62±0.14	26.1±0.01	24.88±0.15	22.21±0.34	24.43±0.19	23.47±0.29	24.12±0.24	25.44±0.38
C18:3n3	1.57±0.10	2.01±0.07	2.11±0.09	1.95±0.08	1.93±0.06	2.02±0.04	3.34±0.25	2.2±0.16	2.05±0.29	1.86±0.08	2.11±0.12
C20 :0	0.01±0.00	0.13±0.01	0.17±0.10	0.09±0.03	0.2±0.07	0.11±0.05	0.29±0.16	0.43±0.08	0.61±0.02	0.15±0.01	0.08±0.04
C20:1	0.11±0.05	0.2±0.03	0.12±0.00	0.25±0.03	0.52±0.00	0.27±0.01	0.34±0.10	-	0.38±0.20	0.09±0.01	0.3±0.03
C20:2	0.19±0.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22 :0	-	-	-	-	-	-	0.77±0.10	-	-	-	-
C22:1n-9	-	-	-	0.26±0.03	-	0.30±0.02	-	-	-	-	-
C22:2	-	-	-	-	-	0.07±0.02	-	-	-	-	-
$\Sigma$ SFA	25.12	24.88	24.9	25.43	25.03	24.92	30.71	25.66	30.33	24.76	25.11
$\Sigma$ MUFA	49.82	47.91	46.97	48.00	46.95	48.11	43.73	47.7	44.15	49.26	47.33
$\Sigma$ PUFA	25.06	27.2	28.14	26.56	28.03	26.97	25.55	26.64	25.52	25.98	27.56

Les valeurs représentées dans ce tableau sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  SD.

$\Sigma$ SFA: Total des acides gras saturés,  $\Sigma$ MUFA: Total des acides gras monounsaturés.  $\Sigma$ PUFA: Total des acides gras polyunsaturés

Les résultats montrent que les huiles de fruits du Lentisque sont principalement composées d'acide oléique (C18: 1n9) (41,8 - 48,37%), d'acide linoléique (C18: 2n6) (22,21 - 26,1%) et d'acide palmitique (C16) (22,11 - 23,96%). Ces 3 acides gras représentent plus de 90% des acides gras totaux dans les différents extraits.

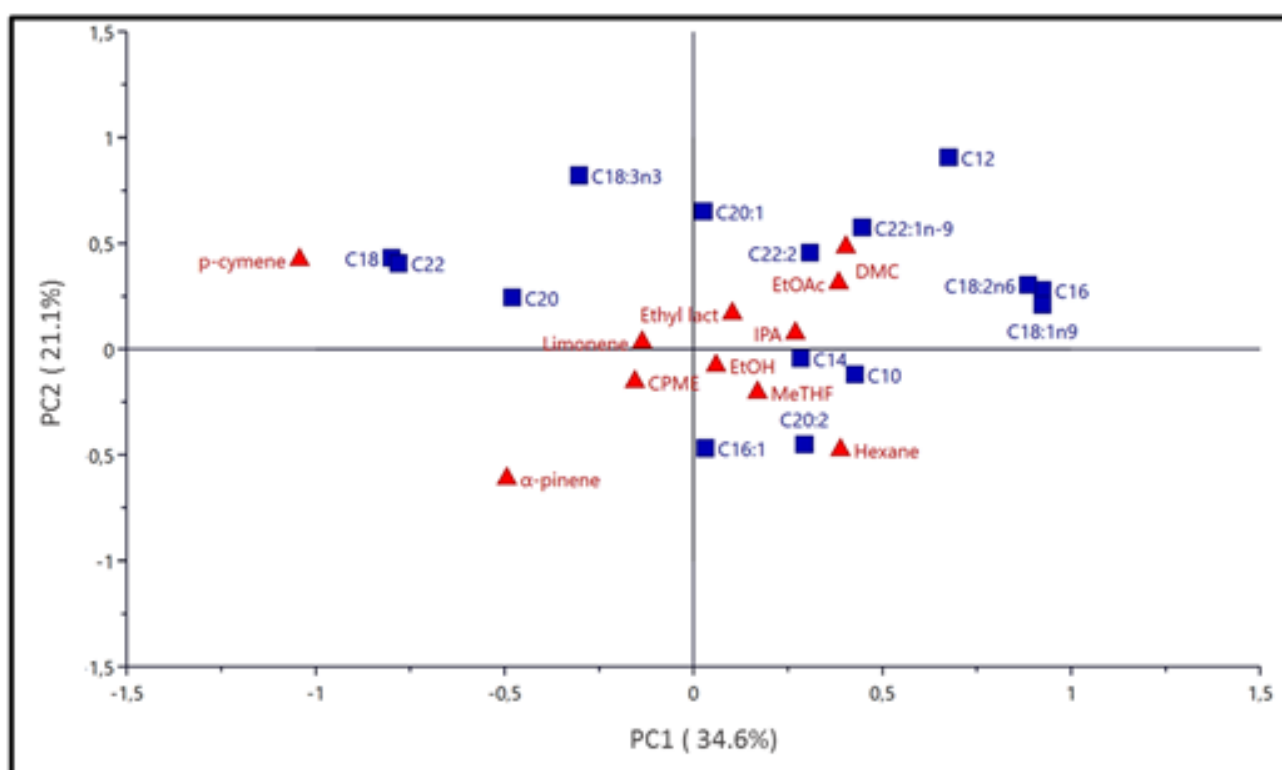
En effet, l'huile de Lentisque est connue pour ces vertus nutritionnelles grâce à sa richesse en acide gras essentiels : l'acide oléique (oméga 9) et l'acide linoléique (oméga 6). Ces acides gras sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et anticancéreuses (Dakiche et al. 2017; De Morais et al. 2017; Mezni et al. 2016).

En outre, les profils d'acides gras montrent que l'huile des baies de Lentisque est constituée majoritairement d'acides gras monoinsaturé (AGMI) représentant entre 43,73 et 49,82% des acides gras totaux, suivis des acides gras saturés (SFA) (24,76 - 30,71%) et des

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

acides gras polyinsaturés (AGPI) (25,06 à 28,03%). Ainsi, l'huile de Lentisque peut être considérée comme une huile monoinsaturée. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs sur l'huile de *Pistacia lentiscus* (Dhifi et al. 2013; Mezni et al. 2014; Tej-Yakoubi et Dhaou, 2007; Trabelsi et al. 2012).

Afin d'évaluer l'influence du solvant d'extraction sur tous les acides gras des extraits de *Pistacia lentiscus* une ACP a été appliquée aux données CPG-FID. La figure III.4 illustre le biplot de l'ACP. Les deux premiers axes du modèle ACP expliquent 55,7% de la variance totale, avec 34,6% pour le premier axe CP1 et 21,1% pour le deuxième axe CP2.



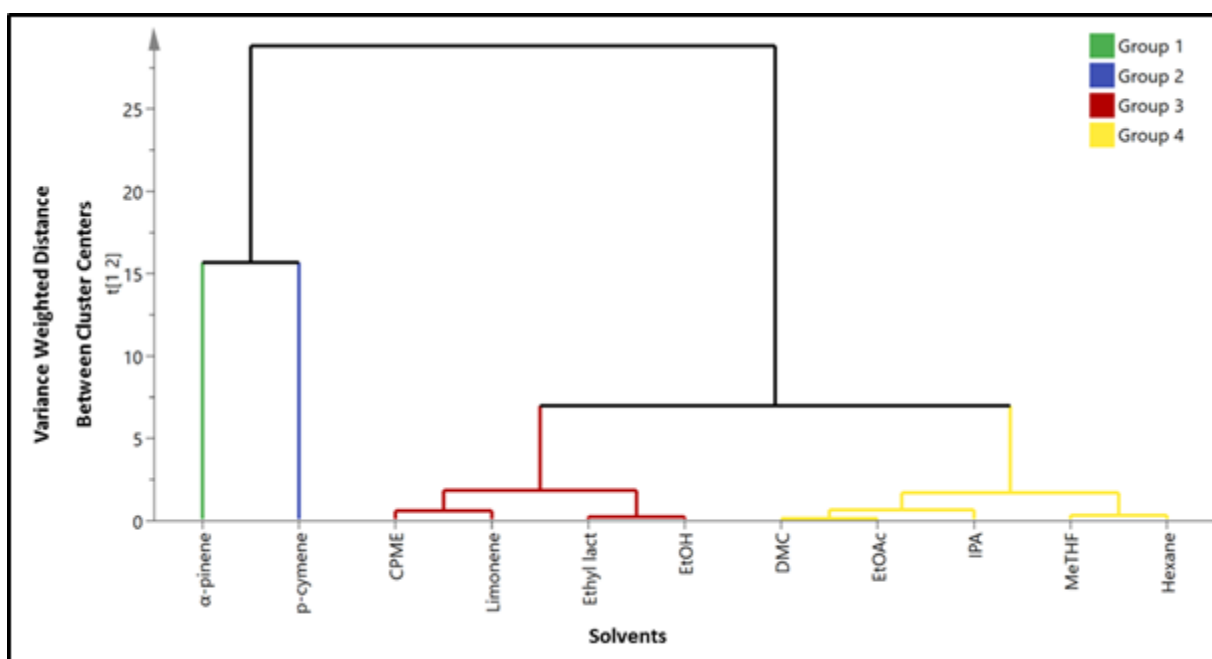
**Figure III.4.** Biplot de l'ACP : scores et loading plot obtenus sur CP1 et CP2 pour les profils d'acides gras analysés par CPG-FID.

L'ACP révèle une nette discrimination de l'extrait p-cymène des autres solvants. Ce dernier est positionné près des acides gras C18:0 et C22:0. En effet, l'acide docosanoïque (C22:0) n'a été détecté que dans l'extrait p-cymène. Quant à l'acide stéarique (C18:0), sa teneur a augmenté dans l'extrait p-cymène en comparaison avec les autres agro-solvants et notamment à l'hexane (de 1,15% à 7,38%) (Tableau III.3). La même tendance a été observée par Cascant et al. (2017) pour l'extraction de l'huile de saumon en utilisant les mêmes solvants d'extraction.

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

L' $\alpha$ -pinène est situé du côté opposé à l'hexane ce qui indique que cet extrait a un profil d'acides gras différent à celui de l'hexane. Le reste des agro-solvants ainsi que l'hexane sont regroupés au centre.

Evidemment, l'ACP fournit une aperçue générale des tendances de regroupement/séparation des extraits en fonction de leurs profils métabolique mais elle ne permet pas de montrer le degré de similarités entre les groupes. Ainsi, la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été appliquée aux données CPG-FID en utilisant la méthode hiérarchique de Ward.



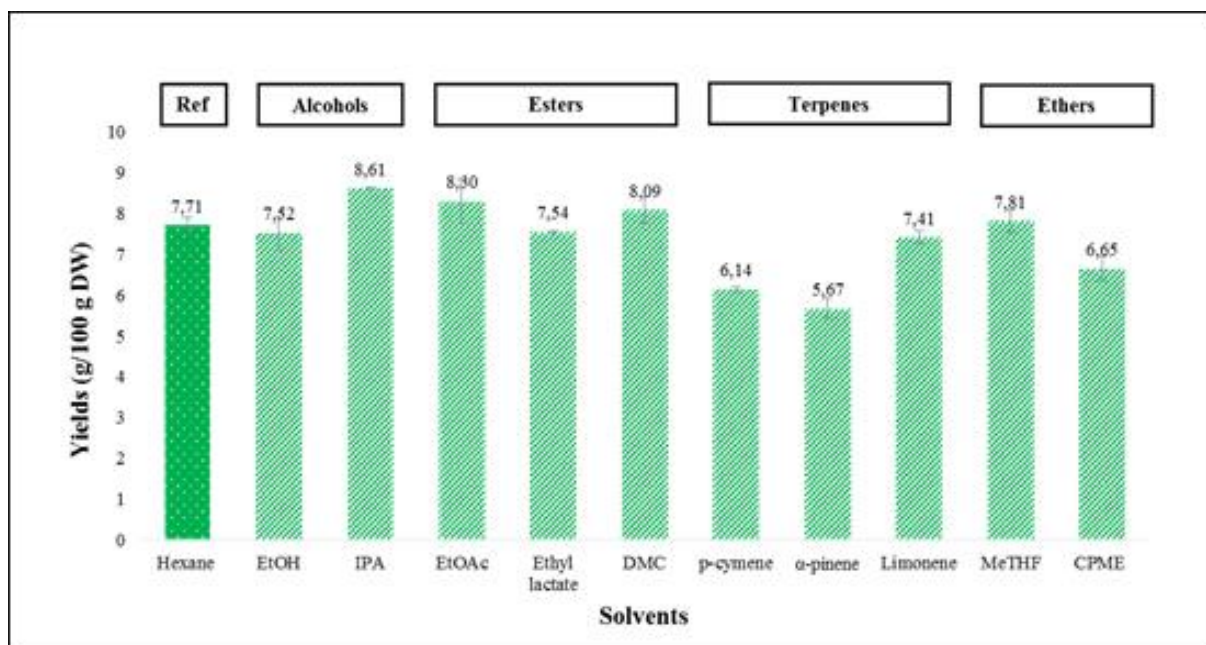
**Figure III.5.** Le dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique réalisé à partir des données CPG-FID.

Le dendrogramme CAH résultant (Figure III.5) montre que les agro-solvants peuvent être classifiés en quatre groupes différents en fonction de leur pouvoir de dissolution. L' $\alpha$ -pinène et le p-cymène forme les deux premiers groupes. Le troisième groupe est composé de CPME, de limonène, de lactate d'éthyle et d'EtOH et le quatrième groupe est formé par l'hexane, le MeTHF, l'IPA, l'EtOAc et le DMC. Ainsi, en se basant sur ces observations on peut conclure que les extraits lipidiques de MeTHF, IPA, EtOAc et DMC ont des profils d'acides gras similaires à ceux d'hexane. Néanmoins, les terpènes (p-cymène et  $\alpha$ -pinène) présentent la plus grande dissimilarité par rapport aux groupes 3 et 4, ce qui indique que le pouvoir de dissolution des terpènes est très différent de reste des solvants testés, en particulier de l'hexane. Ces résultats confirment les observations de l'ACP.



### III.3. Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction de l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* obtenus par les dix agro-solvants ainsi que de l'hexane, conventionnellement utilisé, sont exprimés en g/100 g de matière sèche et sont représentés dans la figure III.6.



**Figure III.6.** Rendements d'extraction de l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* par les différents agro-solvants testés et de l'hexane conventionnellement utilisé.

Le rendement en huile obtenu avec l'hexane pris comme référence est de l'ordre de 7,71%. Cette teneur est similaire à celle obtenue par Trabelsi et al. (2012) qui est de l'ordre de 7,36% pour les fruits immatures de *P. lentiscus* provenant de la Tunisie et récoltés à la même période.

Comme le montre la figure III.6 il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en huile des extraits obtenus par le MeTHF, le limonène, le DMC, l'ethyl lactate, l'EtOAc, l'EtOH et l'hexane. En revanche, le rendement d'extraction en huile de l'IPA est relativement supérieur (8,61%) à celui de l'hexane (7,71%). En effet, l'IPA favorise l'extraction des métabolites moyennement polaire tels que les phospholipides comme le montrent les analyses HPTLC.

Cependant, les rendements en huile les plus faibles sont obtenus avec les terpènes ( $\alpha$ -pinène, p-cymène) et le CPME (5,67, 6,14 et 6,65%, respectivement). En effet, Sicaire et al.

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

(2015a) ont rapporté que les terpènes ne sont pas de bon candidats pour substituer l'hexane dans l'extraction de l'huile de colza car ils donnent de faibles teneurs en huile.

Ainsi, en se basant sur les résultats CPG-FID, les résultats HPTLC et les rendements d'extraction on peut conclure que les solvants verts les plus appropriés pour substituer l'hexane pour l'extraction de l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* sont l'EtOAc, le DMC et le MeTHF.

#### III.4. L'approche *in silico* versus l'approche expérimentale

Les résultats COSMO-RS ont été comparés aux résultats expérimentaux afin d'établir une corrélation entre l'approche *in silico* et l'approche expérimentale et sélectionner le ou les agro-solvants potentiels à la substitution de l'hexane.

Les prédictions COSMO-RS ont montré que les solvants les plus appropriés pour substituer l'hexane sont le MeTHF, l'EtOAc et le CPME. Tandis que les expérimentations ont montré que parmi ces 3 candidats potentiels seulement le MeTHF et l'EtOAc constituent une alternative prometteuse au remplacement de l'hexane. En outre, le DMC apparaît comme un bon solvant pour remplacer l'hexane, ce qui n'est pas en accord avec les simulations COSMO-RS. Néanmoins, expérimentalement, le CPME n'est pas un bon solvant pour remplacer l'hexane. En effet, le rendement d'extraction du CPME (6,65%) est inférieur à celui de l'hexane (7,71%). De plus, les analyses statistiques multivariées ont montré que le CPME présente un profil d'acides gras différent à celui de l'hexane.

Outre la solubilité, d'autres paramètres, comme le logP, le point d'ébullition, l'énergie nécessaire pour l'évaporation du solvant et l'indice de toxicité, sont à prendre en considération dans une démarche de substitution du solvant pétrochimique, tel que l'hexane, par un solvant vert (Verpoorte et al. 2008; Ernst et al. 2014).

Ainsi, en se basant sur les critères de solubilités et les paramètres énergétiques et économiques, le MeTHF s'est révélé comme le solvant vert le plus approprié pour remplacer l'hexane dans l'extraction de l'huile à partir des fruits de *Pistacia lentiscus*. En effet, le potentiel du MeTHF comme un solvant de remplacement de l'hexane pour l'extraction des huiles végétales a été rapportés dans de nombreux travaux. Ainsi, Ben yousef et al. (2018) ont montré que le MeTHF est un bon solvant pour remplacer l'hexane dans l'extraction de l'huile à partir des noyaux de dattes. Sicaire et al. (2015b) ont également montré le potentiel du MeTHF comme solvant vert pour l'extraction des huiles végétales à l'échelle industrielle à la place de l'hexane. Ce solvant vert, issu de ressources renouvelables, présente une faible toxicité (Clarke et al. 2018) et son utilisation dans les industries pharmaceutiques a été approuvée par Scott et al. (2011). En outre, ce solvant requière pratiquement la même énergie pour évaporer 1 kg de

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

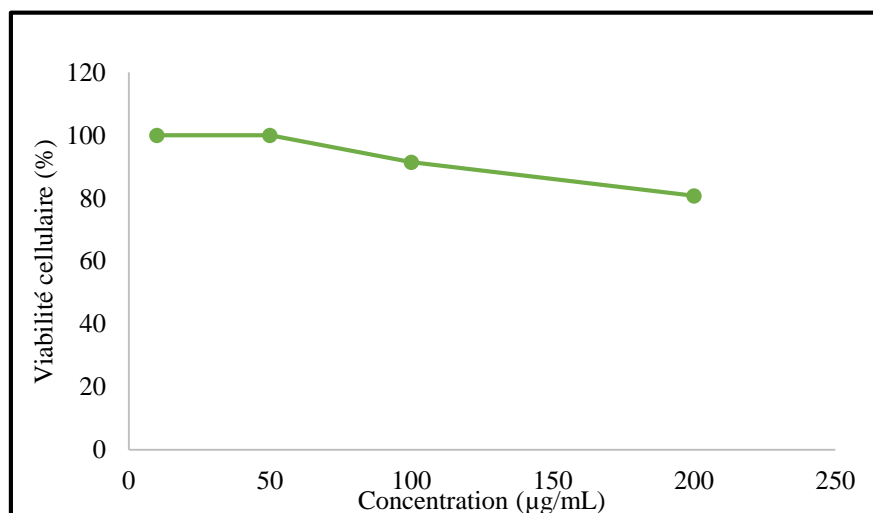
solvant que l'hexane et il est caractérisé par un point d'ébullition bas et un log P > 0. Néanmoins, le DMC et l'EtOAc nécessitent plus d'énergie pour évaporer 1 kg de solvant (0,194 KW / h, 0,217 kW / h) par rapport à l'hexane (0,121 KW / h).

#### IV. L'activité anti-inflammatoire

Au cours du processus inflammatoire, les macrophages produisent des médiateurs, tels que l'oxyde nitrique (NO) par la NO synthase inductible (iNOS). Ainsi, le NO est une molécule jouant le rôle de régulateur dans les réponses inflammatoires aiguës. Une production excessive du NO induit des processus divers d'inflammation et de cancérogenèse.

Dans la présente étude, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait lipidique MeTHF, qui s'est avéré être le meilleur solvant pour substituer l'hexane dans l'extraction de l'huile comestible de *Pistacia lentiscus*, a été évaluée in vitro en mesurant l'inhibition du relâchement d'oxyde nitrique dans les macrophages murins RAW 264,7 stimulés au LPS.

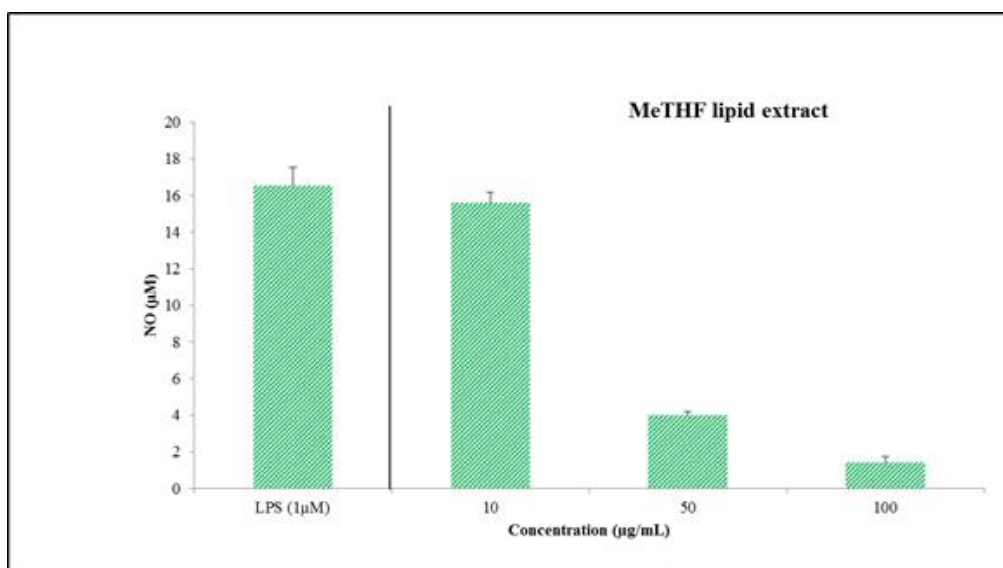
Tout d'abord, la cytotoxicité de l'extrait lipidique MeTHF a été évaluée. Les cellules RAW 267,4 ont été traitées avec des concentrations croissantes d'extrait lipidique MeTHF (de 10 à 200 µg/mL). Aucune cytotoxicité significative contre les cellules macrophages RAW 267,4 n'a été révélée à des concentrations variant de 10 à 100 µg/ml (Figure III. 7).



**Figure III.7.** La viabilité des cellules macrophage de murins Raw 264,7 traitées avec des concentrations croissantes (10, 50, 100 et 200 µg/mL) de l'extrait lipidique MeTHF.

### Chapitre III : Eco-extraction de l'huile végétale des fruits de *P. Lentiscus*

Ensuite, l'effet des extraits lipidiques MeTHF à des concentrations de 10, 50 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sur la sécrétion de nitrite a été évalué. Comme le montre la figure III.8, la production de NO a été significativement inhibée par les différentes concentrations de l'extrait lipidique MeTHF, et ce de manière dose-dépendante. En effet, la production de NO dans les cellules RAW 267,4 a diminué de 15,6  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) à 1,4  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Tandis que la production de NO dans les cellules stimulés par les LPS et non traités était plus élevée (16,5  $\mu\text{M}$ ).



**Figure III.8.** Effet du traitement des cellules macrophages de murins RAW 267,4, stimulé au LPS, par des concentrations croissantes d'extrait lipidique MeTHF sur la production de l'oxyde nitrique (NO).

Ces résultats montrent le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait MeTHF obtenu à partir des fruits de *P. lentiscus*. En fait, ce dernier était principalement composé d'acide oléique et d'acide linoléique (47,48% et 24,12%, respectivement). Ces deux acides gras insaturés ont des propriétés anti-inflammatoires jouant un rôle majeur dans le recrutement de cellules inflammatoires au site de l'inflammation (Ben Khedir et al., 2017). De plus, Mezni et al. (2018) ont signalé que l'huile de fruits de *P. lentiscus* était principalement composée d'acides phénoliques et de flavones, connus pour leur capacité à inhiber la production de NO et à réduire l'expression d'iNOS (Medni et al., 2015). D'autres travaux phytochimiques sur la composition de l'huile de *P. lentiscus* ont mis en évidence la présence de  $\beta$ -sitostérol, de campestérol, de cholestérol et de stigmastérol (Trabelsi et al., 2012). Ces phytostérols ont des activités oxydantes, anti-inflammatoires et antimutagènes (Ben khedir et al., 2017). Ainsi, l'activité anti-inflammatoire de l'huile de fruit de *P. lentiscus* peut être liée à sa richesse en acides gras, en antioxydants et en phytostérols.

#### V. Conclusion

Dans cette étude, le potentiel de dix agro-solvants pour remplacer l'hexane, solvant toxique pour l'homme et l'environnement, inflammable et d'origine non renouvelable, a été évalué. Deux approches ont été utilisées : une approche *in silico* basée sur les prédictions COSMO-RS et une approche expérimentale basée sur les analyses CPG-FID et HPTLC. Quelques différences ont été notées entre les prédictions COSMO-RS et les données expérimentales. En effet, selon les simulations COSMO-RS, parmi les dix solvants verts testés seulement le MeTHF, l'EtOAc et le CPME constituent des candidats potentiels pour substituer l'hexane dans l'extraction de l'huile des fruits de *P. lentiscus*. Cependant, les expérimentations ont montré que, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, seulement le MeTHF est le solvant le plus approprié pour remplacer l'hexane, conventionnellement utilisé pour l'extraction des lipides à partir des fruits oléagineux.

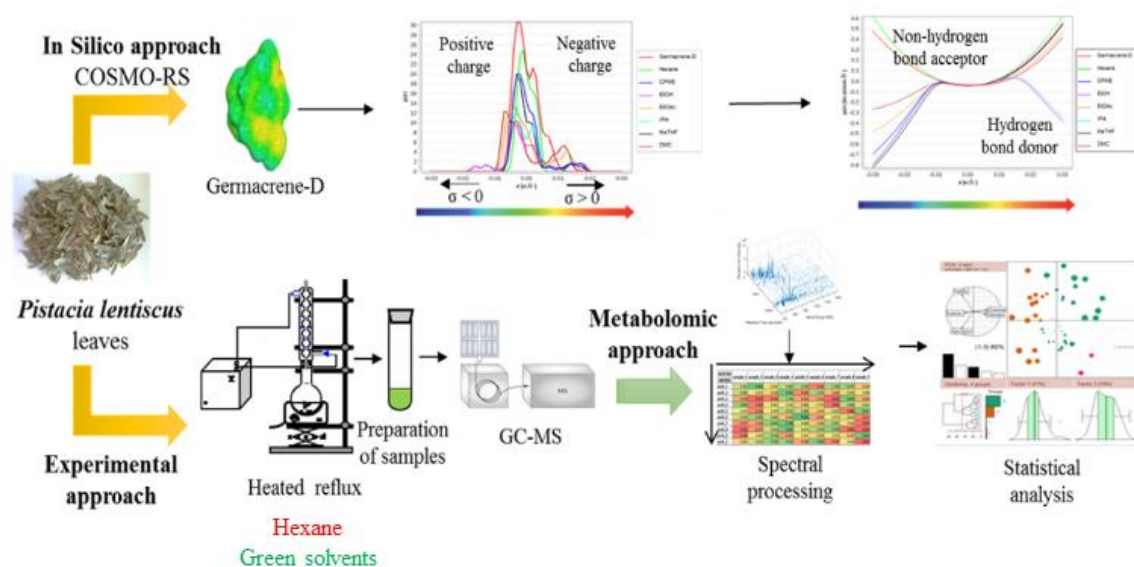
Les expérimentations ont montré également que l'huile des baies de *P. lentiscus* présente un grand intérêt nutritionnel grâce à sa richesse en acide oléique et linoléique et une forte activité anti-inflammatoire. L'ensemble de ces résultats ont souligné le potentiel des agro-solvants en particulier le MeTHF dans l'extraction de l'huile de fruits de *Pistacia lentiscus* et encourage ainsi l'utilisation de cette huile dans l'industrie alimentaire comme huile comestible, ainsi que sa valorisation dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

**Chapitre IV : Eco-extraction des arômes à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* en utilisant des agro-solvants : simulations COSMO-RS et analyse métabolomique.**

## I. Introduction

Parmi les solvants organiques, l'hexane est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des arômes, compte tenu de ses nombreux avantages tels que sa solubilité, sa sélectivité, sa volatilité et son faible coût (Filly et al., 2014). Cependant, l'utilisation de ce solvant d'origine pétrochimique est remise en question en raison de sa toxicité sur le système nerveux et de son inflammabilité (Fine et al., 2013).

Dans ce cadre, deux approches ont été mises en œuvre dans cette étude: l'approche *in silico* utilisant le modèle COSMO-RS et l'approche métabolomique associée à des analyses statistiques multivariées type ACP et PLS-DA afin d'évaluer l'efficacité de six agro-solvants (CPME, DMC, MeTHF, EtOAc, EtOH et IPA) dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* pour remplacer l'hexane (Figure IV.1).



**Figure IV.1.** Démarche utilisée pour la substitution de l'hexane par un agro-solvant.

Ensuite, l'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant le test DPPH et le test du blanchiment de la  $\beta$ -carotène.

Une partie de ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal '*Separation Science and Technology*' intitulée « **Extraction of aromas from *Pistacia lentiscus* L. leaves using alternative solvents: COSMO-RS assisted solvent screening and GC-MS metabolites profiling** ».

### II. L'approche *in silico* : les simulations COSMO-RS

Afin d'évaluer le potentiel des solvants alternatifs sélectionnés (CPME, DMC, MeTHF, EtOAc, EtOH et IPA) pour substituer l'hexane dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus*, une analyse *in silico* a été conduite en premier temps en utilisant le modèle COSMO-RS. En effet, le logiciel COSMOthermX permet de calculer le facteur de similarité des  $\sigma$ -potentiels ( $S_{i,j}^P$ ) de deux composés purs  $i$  et  $j$  et donc de prédire la solubilité des arômes dans les différents bio-solvants. Comme ce facteur  $S_{i,j}^P$  dépend de la température, les calculs COSMO-RS ont été réalisés à la température d'ébullition de chaque solvant. Les résultats de simulations COSMO-RS sont présentés dans le tableau IV.1. La probabilité de solvation des arômes dans les bio-solvants ainsi que dans l'hexane, pris comme référence peut être classée en trois groupes : faible si les valeurs de  $S_{i,j}^P$  sont comprises entre  $0 < S_{i,j}^P \leq 15$ , moyenne si  $15 < S_{i,j}^P \leq 50$  et élevée si  $50 < S_{i,j}^P \leq 100$ .

Les résultats montrent que l'hexane est le meilleur solvant pour l'extraction des sesquiterpènes hydrocarbonés ( $S_{i,j}^P$  compris entre 52 et 80) et des monoterpènes hydrocarbonés (à l'exception du camphène  $S_{i,j}^P = 7$ ). En revanche, il n'est pas un bon solvant pour l'extraction d'ester monoterpénique, des monoterpènes oxygénés et des sesquiterpènes oxygénés.

Parmi les six agro-solvants testés, le CPME semble être le solvant vert le plus approprié à l'extraction de tous les composés aromatiques présentés dans les feuilles de *P. lentiscus*. De plus, le CPME est théoriquement meilleur que l'hexane pour l'extraction d'isoamyl butyrate et l'isopentyle octanoate ( $S_{i,j}^P = 74$  et  $S_{i,j}^P = 59$ , respectivement avec le CPME alors qu'avec l'hexane  $S_{i,j}^P = 11$  et  $S_{i,j}^P = 16$ , respectivement), des monoterpènes oxygénés (Eucalyptol et  $\alpha$ -Terpinéol ont un  $S_{i,j}^P = 71$  et  $S_{i,j}^P = 64$ , respectivement avec le CPME alors qu'avec l'hexane  $S_{i,j}^P = 5$  et le  $S_{i,j}^P = 5$ , respectivement), et l'ester monoterpénique bornyl acétate ( $S_{i,j}^P = 76$  avec le CPME tandis qu'avec l'hexane le  $S_{i,j}^P = 10$ ).

Cependant, les autres solvants (MeTHF, DMC, IPA, EtOH et EtOAc) sont théoriquement des bons solvants pour l'extraction uniquement des monoterpènes oxygénés, des monoterpènes ester et d'autres composés tels que le butyrate d'isoamyle et le 2-undécane.

Ainsi, en se basant sur les résultats de simulation COSMO-RS et le principe de « like dissolve like », parmi les six agro-solvants testés, le CPME semble être le solvant vert le plus approprié pour substituer l'hexane, pour l'extraction des arômes à partir des feuilles de *Lentisque*.



## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

**Tableau IV.1.** Les valeurs SP  $i,j$  des calculs de similarités obtenues par COSMO-RS.

Boiling point	Hexane 69°C	MeTHF 80°C	CPME 106°C	DMC 90°C	IPA 82.8°C	EtOH 78°C	EtOAc 77.1°C
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>							
Tricyclene	85	5	16	9	2	2	6
$\beta$ -Pinene	65	7	21	7	3	3	9
Camphene	7	7	20	7	3	7	9
Limonene	50	9	26	9	4	4	11
p-Cymene	49	9	25	9	4	4	11
Sabinene	52	9	25	9	4	3	11
$\alpha$ -Phellandrene	58	8	23	8	4	3	10
$\alpha$ -Pinene	79	6	17	6	3	2	7
$\alpha$ -Terpinene	56	8	24	8	4	4	10
$\alpha$ -Terpinolene	58	8	23	8	4	3	10
$\alpha$ -Thujene	68	7	20	7	3	3	8
$\beta$ -Myrcene	51	91	25	9	4	3	11
$\beta$ -Ocimene	49	9	26	9	4	4	11
$\beta$ -Phellandren	56	8	24	8	4	3	10
$\gamma$ -Terpinene	60	8	22	8	3	3	9
<b>Oxygenated monoterpenes</b>							
1-Terpinen-4-ol	8	23	49	41	30	23	44
$\alpha$ -Terpineol	5	38	64	56	46	35	60
Eucalyptol	5	72	71	33	37	31	40
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>							
Allo-Aromadendrene	69	6	19	7	3	3	8
Cadina-1-4-diene	68	7	20	7	3	3	8
Copaene	80	6	17	6	3	2	7
Germacrene D	56	8	24	8	4	3	10
$\alpha$ -Amorphene	69	7	20	7	3	3	8
$\alpha$ -Caryophyllene	57	8	23	8	4	3	10
$\alpha$ -Copaene	80	6	17	6	3	2	7
$\alpha$ -Cubebene	73	6	19	6	3	2	8
$\alpha$ -Muurolen	69	7	20	7	3	3	8
$\beta$ -Cadinene	64	87	21	7	3	3	9
$\beta$ -Caryophyllene	61	7	22	8	3	3	9
$\gamma$ -Elemene	60	7	22	12	3	3	9
$\beta$ -Elemene	52	9	25	9	4	3	11
$\gamma$ -Cadinene	65	7	21	7	3	27	9
$\delta$ -Cadinene	74	6	19	6	3	2	8
$\beta$ -Gurjunene	80	6	17	9	3	2	7
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>							
$\alpha$ -cadinol	12	12	29	23	19	15	22
<b>Monoterpene ester</b>							
Bornyl acetate	10	39	76	35	21	16	51
<b>Other compound</b>							
Isoamyl butyrate	11	37	74	34	20	16	49
Isopentyl octanoate	16	26	59	24	14	11	9
2-undecanone	8	50	88	44	27	21	65

0-15   
 15-50   
 50-100  
 Low            Medium            High  
 Probability of solvation

### III. L'approche expérimentale : les analyses GC-MS

#### III.1. Analyse de la composition de l'huile essentielle et des extraits aromatiques des feuilles de *Pistacia lentiscus*

##### III.1.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Afin de déterminer la composition chimique des composés volatils des feuilles de *P. lentiscus*, l'huile essentielle a été extraite par hydro-distillation et a été analysée par GC-MS. 33 composés volatils ont été identifiés (Tableau IV.2).

Les résultats montrent que l'huile essentielle de Lentisque est caractérisée par sa richesse en sesquiterpènes hydrocarbonés avec 60,09%, suivi des monoterpènes hydrocarbonés (18,37%), des monoterpènes oxygénés (8,34%) et des monoterpènes ester (7,52%).

Les principaux constituants de l'huile essentielle sont le Germacrène D (16,58%), le  $\delta$ -cadinène (13,60%), le  $\beta$ -caryophyllen (11,06%), le Bornyl acétate (7,52%), le 1-terpinène-4-ol (5,43%), l' $\alpha$ -cadinol (4,24%) et l' $\alpha$ -pinène (3,53%). Ces résultats sont en accord avec ceux de Fernández et al. (2000) montrant que le  $\beta$ -caryophyllène, le  $\delta$ -cadinène et le Germacrène D sont les principaux constituants de l'huile essentielle de *P. lentiscus* provenant de l'Espagne. Néanmoins, des travaux antérieurs sur l'huile essentielle de Lentisque provenant de la Tunisie ne sont pas en accord avec nos résultats. En effet, Ben Doussia et al. (2005) ont rapporté que les principaux métabolites de l'huile essentielle de Lentisque sont l' $\alpha$ -pinène (17%), le  $\gamma$ -terpinène (9%) et le terpinène-4-ol (12%). En outre, Bachrouch et al. (2010) ont rapporté que le terpinène-4-ol,  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -terpinéol sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de Lentisque.

Ces variations dans la composition de l'huile essentielle pourraient être liées à de nombreux facteurs tels que l'âge de la plante, le stade de développement, l'origine géographique et la période de récolte (El Abed et al., 2014 ; Aissi et al., 2016).

##### III.1.2. Composition chimique des extraits aromatiques

Les arômes ont été obtenus par extraction solide/liquide en utilisant un système à reflux. L'efficacité des solvants alternatifs (CPME, DMC, MeTHF, EtOAc, EtOH et IPA) à extraire les arômes a été évaluée en comparant les profils métaboliques obtenus avec ces bio-solvants avec celui de l'hexane, pris comme référence.

#### Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

Ainsi, des différences significatives ont été observées entre les différents extraits en termes de profils métabolique et des teneurs relatives en composés aromatiques (Tableau IV.2). Cependant, les mêmes composés majeurs ont été identifiés dans tous les extraits mais dans des proportions différentes en fonction du solvant d'extraction.

En effet, les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la fraction la plus importante avec des taux variant de 65,73 à 92,1%, représenté essentiellement par le Germacrene D et le  $\beta$ -caryophyllène, suivi des monoterpènes hydrocarbonés (3,89 à 28,18%) représenté essentiellement par l' $\alpha$ -pinène.

Les alcools (IPA et EtOH) sont composés uniquement de sesquiterpènes hydrocarbonés (92,1 et 89,1%, respectivement) et de monoterpène ester (Bornyl acétate (7,90 et 10,89%, respectivement)).

En résumé, parmi les six agro-solvants testés, l'EtOAc montre un profil aromatique similaire à celui de l'hexane avec quelques fluctuations. Ainsi, il est intéressant de noter que les teneurs en Germacrene D et  $\beta$ -caryophyllène, constituants majeurs des extraits aromatiques, sont plus élevées dans l'extrait EtOAc (25,55% et 18,49%, respectivement) que dans l'extrait hexane (22,30% et 15,10%, respectivement).

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

**Tableau IV.2.** Composition de l'huile essentielle et des arômes des feuilles de *P. lentiscus* obtenus par les différents solvants testés.

No	RI	Essential oil	Hexane	MeTHF	CPME	DMC	IPA	EtOH	EtOAc
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>									
1	924	0.14	-	-	-	-	-	-	-
2	977	1.46	4.3±0.25	4.10±0.004	2.11±0.02	0.23±0.01	-	-	2.98±0.05
3	949	0.82	0.89±0.05	-	-	-	-	-	0.53±0.01
4	1029	1.92	2.35±0.14	-	2.41±0.02	0.89±0.03	-	-	2.36±0.03
5	1024	0.37	-	-	-	-	-	-	-
6	972	0.71	3.42±0.21	5.86±0.01	3.27±0.03	1.12±0.02	-	-	2.73±0.05
7	1006	0.72	0.69±0.04	-	-	-	-	-	0.39±0.01
8	932	3.53	9.28±0.56	6.01±0.14	3.65±0.04	-	-	-	3.90±0.08
9	1016	0.87	-	-	-	-	-	-	-
10	1085	0.56	0.46±0.08	-	-	-	-	-	0.10±0.01
11	925	0.53	0.94±0.05	-	0.69±0.01	-	-	-	0.53±0.01
12	998	2.39	1.15±0.08	-	0.85±0.01	0.40±0.01	-	-	0.93±0.04
13	1046	0.1	-	-	-	-	-	-	-
14	1030	2.24	4.38±0.26	5.38±0.02	3.12±0.02	1.25±0.03	-	-	4.19±0.04
15	1058	2.01	0.31±0.01	-	0.43±0.002	-	-	-	0.36±0.004
<b>Oxygenated monoterpenes</b>									
16	1181	5.43	0.25±0.01	0.49±0.004	0.44±0.008	0.48±0.01	-	-	0.39±0.003
17	1195	2.02	-	-	-	-	-	-	-
18	1032	0.89	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>									
19	1462	1.57	-	-	2.14±0.07	1.56±0.03	-	-	-
20	1534	-	0.88±0.02	-	-	-	-	-	0.75±0.01
21	1371	0.14	-	-	-	-	-	-	-
22	1482	16.58	22.3±0.21	14.65±0.02	29.70±0.17	27.84±0.19	32.04±0.02	22.38±0.04	25.55±0.20
23	1458	4.17	3.57±0.06	-	4.93±0.01	4.84±0.03	6.04±0.005	7.50±0.005	4.36±0.04
24	1377	1.98	2.58±0.05	2.81±0.01	3.16±0.01	2.87±0.03	3.55±0.003	4.32±0.003	2.91±0.03
25	1348	0.39	2.44±0.05	1.37±0.002	2.38±0.01	2.30±0.02	2.37±0.002	-	2.07±0.04
26	1476	4.38	3.61±0.05	4.64±0.01	1.20±0.02	4.60±0.02	5.81±0.003	7.57±0.01	4.20±0.03
27	1499	4.8	-	-	-	-	-	5.72±0.01	-
28	1473	-	-	11.01±0.02	-	-	-	-	-
29	1422	11.06	15.1±0.24	17.47±0.07	18.77±0.06	22.06±0.17	16.29±0.009	20.29±0.10	18.94±0.14
30	1334	-	0.46±0.01	0.65±0.002	0.65±0.004	-	-	-	0.51±0.01
31	1391	1.42	5.03±0.09	11.64±0.02	5.47±0.022	6.11±0.09	4.38±0.002	-	4.42±0.04
32	1447	-	-	-	0.91±0.01	-	-	-	-
33	1515	-	1.85±0.03	2.7±0.01	4.43±0.01	0.88±0.04	2.60±0.001	2.99±0.005	1.34±0.01
34	1520	13.6	6.84±0.13	-	-	13.61±0.09	15.26±0.01	18.33±0.03	6.64±0.06
35	1432	-	1.07±0.04	3.01±0.01	3.25±0.011	3.22±0.02	3.76±0.001	-	1.04±0.002
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>									
36	1645	4.5	-	-	-	-	-	-	-
<b>Monoterpene ester</b>									

#### Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

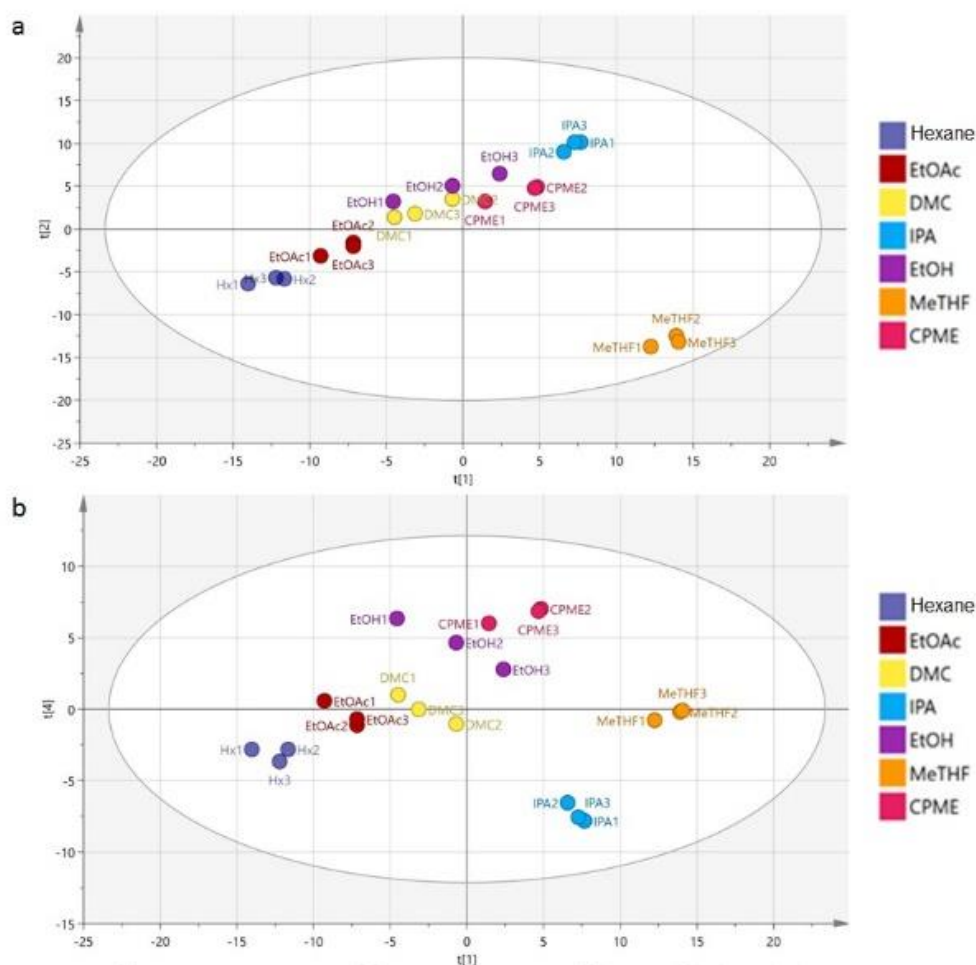
37	Bornyl acetate	1284	7.52	4.06±0.10	5.03±0.01	6.05±0.02	5.74±0.05	7.90±0.003	10.89±0.01	5.55±0.04
<b>Other compounds</b>										
38	Isoamyl butyrate	1055	0.4	-	-	-	-	-	-	0.56±0.05
39	Isopentyl octanoate	1250	0.78	0.78±0.02	-	-	-	-	-	0.91±0.01
40	2-undecanone <sup>a</sup>	1294	-	0.99±0.01	3.21±0.04	-	-	-	-	0.85±0.03
<b>∑ Monoterpene Hydrocarbons (%)</b>			18.37	28.18	21.35	16.53	3.89	-	-	19
<b>∑ Oxygenated monoterpenes (%)</b>			8.34	0.25	0.49	0.44	0.48	-	-	0.39
<b>∑ Sesquiterpene hydrocarbons (%)</b>			60.09	65.73	69.95	76.99	89.89	92.1	89.1	72.73
<b>∑ Other compound</b>			13.2	5.83	8.24	6.05	5.74	7.90	10.89	7.87

<sup>a</sup> Métabolites non identifiés dans l'huile essentielle de *P. lentiscus* mais identifiés dans les extraits aux solvants. RI: indice de rétention.

#### IV. L'approche métabolomique

Afin d'évaluer l'effet de solvant d'extraction sur l'ensemble des métabolites et d'évaluer les tendances de regroupement des extraits, la matrice de données normalisée (générée par la plateforme virtuelle Workflow4metabolomics) a été soumise à des analyses statistiques multivariées type ACP et PLS-DA. Après traitement des données, 250 signaux ont été extraits tandis que seulement 36 composés ont été identifiés avec l'approche ciblée.

Tout d'abord, une analyse non supervisée type ACP a été réalisée. Ce type d'analyse permet de visualiser la variabilité générale des données et les tendances des échantillons à former des groupes. Le modèle ACP montre que les deux premières composantes expliquent 51% de la variance initiale et 76% de la variance peut être expliqués avec quatre composantes. Ainsi, le modèle utilisé consiste à une ACP à quatre composantes avec  $R^2$  et  $Q^2$  de 0,76 et 0,594, respectivement (Figure IV.2). Comme le montre la figure IV.2, les extraits hexane et EtOAc sont discriminés par la composante 1 des extraits MeTHF et des autres échantillons (CPME, DMC, EtOH et IPA) par la composante 2. Ainsi, les extraits hexane et EtOAc sont regroupés ensemble alors que les extraits CPME, DMC, EtOH et IPA forment un deuxième groupe. Les extraits MeTHF sont étroitement séparés de tous les autres extraits.

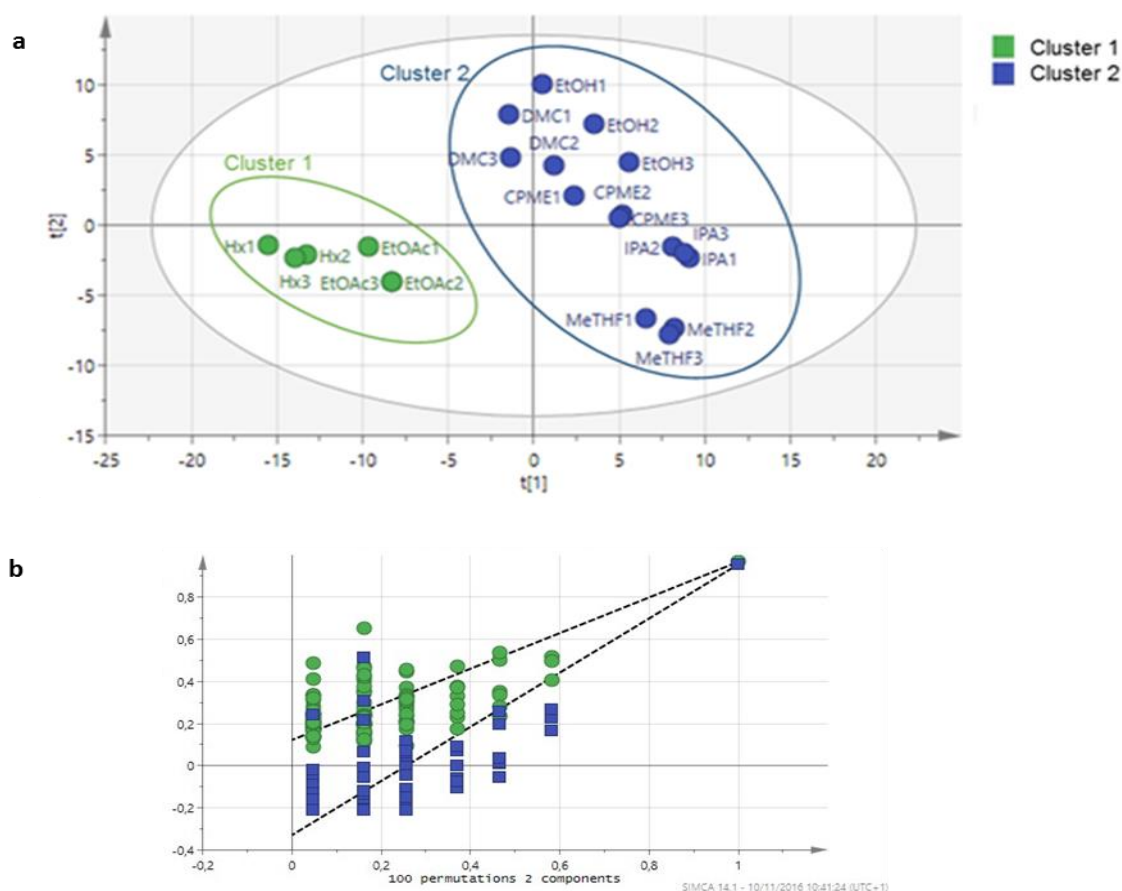


**Figure IV.2.** ACP basée sur les résultats GC-MS. (a) ACP scores plot: CP1 vs CP2; (b) ACP scores plot: CP1 vs CP4.

Ensuite, une analyse supervisée type PLS-DA a été réalisée. En effet, la PLS-DA est une méthode d'analyse utilisée pour regrouper des données multivariées en maximisant la variance entre les différents groupes d'échantillons (Gromski et al., 2015). Les résultats de ce test doivent être vérifiés statistiquement afin de s'assurer qu'ils ne sont pas dus au hasard et de valider la robustesse du modèle discriminant PLS-DA. Pour ces fins, certains paramètres doivent être examinés comme la performance descriptive ( $R^2$ ) du modèle et la performance prédictive du modèle ( $Q^2$ ). Les valeurs de la variance calculée cumulée  $R^2$  (cum) de X et Y et  $Q^2$  (cum) sont de l'ordre 1 dans un modèle parfait. Néanmoins, des valeurs supérieures à 0,5 sont acceptées. Deux tests sont également effectués afin de valider la robustesse du modèle : le test de validation croisée CV-ANOVA (seuil de signification = 0,05) et le test de permutation.

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

Ainsi, le modèle PLS-DA construit à partir des observations de l'ACP, considérant 3 groupes d'échantillons : groupe 1 (Hexane-EtOAc); groupe 2 (CPME, DMC, EtOH et IPA); groupe 3 (MeTHF), n'est pas valide. Un nouveau modèle, regroupant d'une part les extraits d'Hexane-EtOAc et d'autre part les extraits CPME, DMC, EtOH, IPA et MeTHF, a été construit (Figure IV.3). Ce modèle, à deux composante, est statistiquement valide avec  $R^2 X$  (cum) = 0,436,  $R^2 Y$  (cum) = 0,931,  $Q^2$  (cum) = 0,854 et CV-ANOVA  $p = 2,65 \times 10^{-6}$ . De plus, le test de permutation montre que le modèle est valide ( $R^2 = 0,453$  et  $Q^2 = -0,374$ ).



**Figure IV.3. a.** Scores plot du modèle PLS-DA. Le cercle vert représente le groupe 1 (Hexane-EtOAc) et le cercle bleu représente le groupe 2 (EtOH, IPA, CPME, DMC et MeTHF). **b.** Test de permutation validé.

Le modèle PLS-DA montre la séparation des extraits du groupe 1 (Hexane-EtOAc) à ceux du groupe 2 (CPME, DMC, MeTHF, IPA et EtOH) par la composante 1 et la composante 2. En outre, des informations supplémentaires peuvent être obtenues, à partir du modèle PLS-DA, sur les métabolites contribuant le plus à la discrimination des groupes d'échantillons en utilisant les valeurs de VIP scores (Variable Importance in Projection). Ainsi, les métabolites



#### **Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus***

avec des valeurs de VIP scores supérieure à 1,5 ont été sélectionnées et les valeurs de coefficient correspondantes pour chaque groupe de solvants ont été évaluées afin de comparer la variabilité de teneurs en métabolites aromatiques. Le tableau IV.3 regroupe les métabolites ayant des valeurs de VIP supérieur à 1,5 et leurs coefficients correspondants.

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

**Tableau IV.3.** Liste des métabolites identifiés ayant un VIP supérieur à 1,5 selon le modèle PLS-DA et les coefficients correspondants pour chaque groupe. Les valeurs avec un coefficient positif indiquent des teneurs élevés, tandis que les valeurs avec un coefficient négatif indiquent des teneurs plus bas.

o.	Compounds	Characteristic ions	RT	LRI	VIP	Coefficient cluster 1	Coefficient cluster 2
1	p-Cymene	119	10.19	1024	1.964	0.0263528	-0.0263528
2	Phtalate	149	31.33		1.85058	0.0178752	-0.0178752
3	Siloxane of column	73	29.8		1.83163	0.0142374	-0.0142374
4	Oxygenated sesquiterpene 1	137	22.78	1480	1.82791	0.0136806	-0.0136806
5	$\beta$ -Caryophyllene	161	21.33	1422	1.79729	0.0128054	-0.0128054
6	Oxygenated sesquiterpene 2	121	23.2		1.72475	0.0174768	-0.0174768
7	Bornyl acetate	95	17.63	1284	1.70244	0.0239978	-0.0239978
8	$\delta$ -Cadinol	119	26.4	1630	1.69509	0.0134278	-0.0134278
9	Nonanal	98	12.41	1098	1.63736	0.011299	-0.011299
10	$\alpha$ -pinene	93	7.73	932	1.63715	0.0136102	-0.0136102
11	Siloxane of column	266	12.28		1.63031	0.00958751	-0.00958751
12	Unknown 1	69	10.88	926	1.61928	0.0128712	-0.0128712
13	Unknown 2	103	6.8	915	1.61418	0.014283	-0.014283
14	Germacrene-D	161	22.56	1482	1.59922	0.0182199	-0.0182199
15	Siloxane of column	73	13.38		1.59752	0.0176061	-0.0176061
16	$\beta$ -Caryophyllene	93	21.31	1422	1.59061	0.0175409	-0.0175409
17	Tetradecane	43-55-196	20.5	1392	1.58245	0.023419	-0.023419
18	$\alpha$ -Caryophyllene	93	22.21	1458	1.58018	0.0174144	-0.0174144
19	Hexylene glycol	59	10.08		1.57862	0.0202476	-0.0202476
20	Unknown 3	139	18.62	1356	1.57374	0.021141	-0.021141
21	$\delta$ -Cadinene	161	23.82	1520	1.5685	0.016157	-0.016157
22	$\beta$ -Myrcene	93	9.25	998	1.56666	0.0131882	-0.0131882
23	$\beta$ -Cedrene	161	21.26	1420	1.56269	0.0177419	-0.0177419
24	Oxygenated terpene	79	11.54	1076	1.55717	0.0152889	-0.0152889
25	Siloxane of column	73	35.5		1.54654	0.00778946	-0.00778946
26	Sabinene	93	7.19	972	1.54259	0.00891225	-0.00891225
27	Unkown 4	120	23.32		1.53273	0.021504	-0.021504
28	Isoamy butyrate	71	10.95	1055	1.52852	0.0183469	-0.0183469
29	Xylene	91	5.88	881	1.52836	0.0159167	-0.0159167
30	Siloxane of column	73	26.43		1.52464	0.0154596	-0.0154596

RT: temps de rétention (min); LRI: indice de rétention linéaire; VIP: variable influence on projection.

#### **Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus***

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

Ainsi, le modèle PLS-DA construit renferme 30 métabolites dont les valeurs de VIP sont supérieures à 1,5. Ces métabolites discriminants ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (LRIs) avec ceux de la bibliothèque NIST et de la base de données phérobases. Les résultats indiquent que certains composés abondants dans les extraits (identifiés précédemment par l'approche ciblée) n'ont pas été identifiés par l'analyse non ciblée parce qu'ils ne sont pas discriminants. Cependant, l'approche non ciblée a permis d'identifier des métabolites discriminants mais non identifiées par l'approche ciblée tels que le p-cymène, le  $\delta$ -cadinol, le nonanal, le tétradécane, le  $\beta$ -cédrene et le xylène. En outre, l'analyse non ciblée a révélé la présence d'impuretés telles que le phtalate et les siloxanes de colonne qui doivent être filtrées et éliminées. Le groupe 1 (Hexane-EtOAc) présente des coefficients de VIP plus élevés dans la majorité des cas, montrant des taux plus élevés de ces métabolites par rapport aux autres solvants de groupe 2.

En résumé, pour affiner le screening de solvants alternatifs, les deux matrices générées par l'analyse ciblée et non ciblée pourraient être combinées. Les résultats d'analyses ciblée et non ciblée indiquent que l'EtOAc a un profil métabolique similaire à celui de l'hexane et donc un pouvoir de solvation similaire. Donc parmi les six agro-solvants testés, l'EtOAc semble être le solvant le plus approprié pour remplacer l'hexane dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus*.

### V. L'approche *in silico* versus l'approche expérimentale

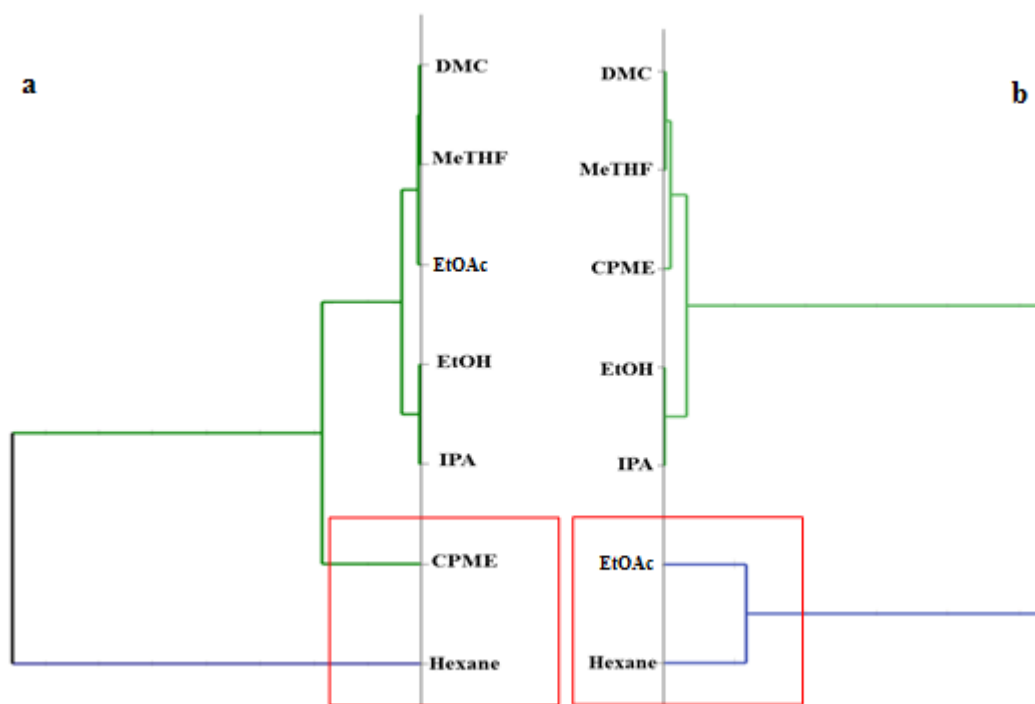
Les expérimentations ne sont pas en accord avec les prédictions COSMO-RS. Selon les simulations COSMO-RS, le meilleur bio-solvant pour substituer l'hexane est le CPME. Néanmoins, les résultats expérimentaux ont révélé que l'EtOAc est le solvant vert le plus prometteur pour remplacer l'hexane dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus*.

Le dendrogramme résultant de la classification ascendante hiérarchique basée sur les prédictions COSMO-RS montre que les agro-solvants peuvent être classés en deux groupes en fonction de leurs pouvoirs solvant (Figure IV.4).

Le premier groupe est composé d'Hexane et de CPME et le deuxième groupe est composé par le DMC, le MeTHF, l'IPA, l'EtOH et l'EtOAc. Une faible dissimilarité entre l'hexane et le CPME a été observée montrant que le CPME a un pouvoir de dissolution des arômes similaire à celui de l'hexane. Ceci montre que le CPME est théoriquement le meilleur solvant pour remplacer l'hexane. En revanche, le dendrogramme basé sur les résultats GC-MS

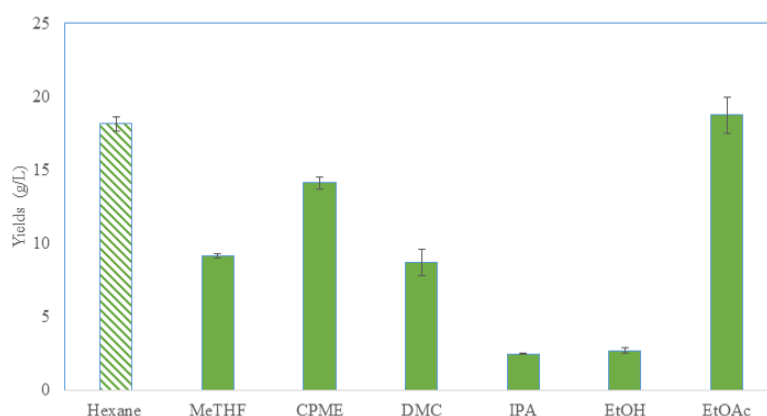
## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

montre une grande dissimilarité entre l'hexane et le CPME et donc un profil métabolique différent. Par contre, le solvant le plus proche de l'hexane est l'EtOAc, ce qui indique que ce dernier présente un pouvoir de solubilisation des arômes similaire à celui de l'hexane.



**Figure IV.4.** Dendrogramme résultant de l'analyse hiérarchique de Ward. a. Dendrogramme basé sur les simulations COSMO-RS. b. Dendrogramme basé sur l'analyse GC-MS.

De plus, l'extrait EtOAc exhibe le rendement d'extraction le plus élevé par rapport aux autres solvants (18,74 g/l). Tandis que le rendement d'extraction de CPME est inférieur à celui de l'hexane (14,12 g/l et 18,14 g/l, respectivement) (Figure IV.5).



**Figure IV.5.** Rendements d'extraction obtenus avec les différents solvants testés.

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

Ces différences entre l'approche *in silico* et l'approche expérimentale peuvent être expliquées par le fait que certains paramètres, qui peuvent modifier la composition chimique de l'extrait aromatique, comme le temps d'extraction et l'enthalpie de vaporisation de molécules d'intérêts, ne sont pas pris en considération lors des calculs COSMO-RS (Cascant et al., 2017). En outre, d'autres paramètres peuvent affecter l'efficacité d'extraction, comme les caractéristiques physico-chimiques du solvant (la viscosité, la densité, la volatilité, la chaleur spécifique, la tension superficielle, etc) et son pouvoir de pénétration à l'intérieur de la matrice, qui doivent être étudiés (Sicaire et al., 2015a ; Sicaire et al., 2015b). Ainsi, outre la solubilité, le choix d'un solvant alternatif doit prendre en compte d'autres paramètres tels que le log P, la toxicité et l'énergie nécessaires à l'évaporation du solvant, qui ne sont pas pris en compte dans les calculs théoriques COSMO-RS (Chemat et al., 2014 ; Cascant et al., 2017) (Tableau IV.4).

**Tableau IV.4.** Propriétés des solvants utilisés obtenues à partir du logiciel ACD LAB et Hansen.  $\delta_d$ ,  $\delta_p$ ,  $\delta_h$  : paramètres de solubilité de Hansen ; CMR : toxicité à long terme selon la législation européenne ; Itox : classe de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner.

	Hexane	MeTHF	CPME	DMC	IPA	EtOH	EtOAc	Water
<b>Solvents properties</b>								
Mass molecular (g/mol)	86.2	86.1	100.2	90.1	60.1	46.1	88.1	18.02
Density (g/mL)	0.66	0.86	0.86	1.00	0.78	0.78	0.90	1.00
Log P	3.94	0.82	1.41	0.15	0.16	-0.19	0.71	-1.38
Flash point (°C)	-23.3	-11.1	-1	18.3	11.7	8.9	-3.30	-
$\delta_d$ (MPa <sup>1/2</sup> )	15.00	16.4	16.2	15.9	15.8	16.2	15.7	15.5
$\delta_p$ (MPa <sup>1/2</sup> )	0.00	4.8	3.6	8.7	6.6	8.4	5.6	16.0
$\delta_h$ (MPa <sup>1/2</sup> )	0.00	4.6	3.9	7.1	14.3	17.6	7.0	42.3
<b>Energy efficiency</b>								
Boiling point (°C)	69	80	106	90	82.8	78	77.1	100
$\delta H_{vap}$ (KJ/mol)	28.9	30.7	33	33	39.8	38.6	31.9	40.7
Cp,liquid (KJ/mol*K)	0.195	0.151	0.2	0.101	2.6	0.112	0.170	0.075
<b>Toxicity</b>								
CMR	2	No	No	No	No	No	No	No
Itox	5	4	4	5	5	5	5	6
Resource	Petroleum	Cereal crop	Chemical synthesis	Chemical synthesis	Cereal crop	Cereal crop	Cereal crop	-

## VI. L'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante de l'huile essentielle et des extraits aromatique des feuilles de *P. lentiscus* obtenus par les six agro-solvants testés ainsi que l'hexane, conventionnellement utilisé pour l'extraction des arômes, a été évaluée par deux tests : le test DPPH et le test de blanchiment de la  $\beta$ -carotène.

### VI.1. Activité antiradicalaire contre le DPPH

L'activité antioxydante contre le radical synthétique DPPH a été exprimée en  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), concentration efficace pour dégrader 50% du radical DPPH. En effet, l'extrait le plus actif montre la  $CI_{50}$  la plus faible.

**Tableau IV.5.** L'activité antiradicalaire et l'activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène des différents extraits. Les valeurs représentées dans ce tableau sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  ET.

	DPPH	$\beta$ -carotène
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Huile essentielle	$47,21 \pm 0,17$	$158 \pm 0,09$
Hexane	$38,54 \pm 0,01$	$297,19 \pm 0,14$
MeTHF	$5,31 \pm 0,12$	$487,33 \pm 0,02$
CPME	$21,35 \pm 0,13$	$396,20 \pm 0,09$
DMC	$11,59 \pm 0,02$	$475,56 \pm 0,05$
EtOAc	$5,82 \pm 0,00$	$229,49 \pm 0,02$
IPA	$5,15 \pm 0,02$	$743,60 \pm 0,04$
EtOH	$3,79 \pm 0,00$	$766,69 \pm 0,03$
BHT	$11,51 \pm 0,07$	$70,00 \pm 0,06$

Les résultats (Tableau IV.5) montrent que l'hexane présente l'activité antiradicalaire la plus faible avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de  $38,54 \mu\text{g/ml}$ . En revanche, parmi les 6 bio-solvants testés, l'EtOH exhibe la meilleure activité antiradicalaire présentant ainsi la plus faible valeur de la  $CI_{50}$  ( $3,79 \mu\text{g/ml}$ ) suivi de l'IPA, le MeTHF et l'EtOAc qui ont montré presque la même activité antiradicalaire ( $CI_{50}$  de l'ordre de  $5,15$ ,  $5,31$  et  $5,82 \mu\text{g/ml}$ , respectivement).

Néanmoins, le CPME exhibe la plus faible activité antiradicalaire avec une  $CI_{50}$  six fois supérieur à l'extrait EtOH ( $CI_{50} = 21,35 \mu\text{g/ml}$ ). L'extrait DMC s'est avéré moins actifs que les autres agro-solvants, par contre il présente une activité antiradicalaire plus intéressante que l'hexane avec une  $CI_{50}$  trois fois inférieur à l'hexane ( $CI_{50} = 11,59 \mu\text{g/ml}$ ).

## Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. Lentiscus*

Cette variabilité peut être liée à la différence de polarité des solvants utilisés. Ainsi, Pérez-Jiménez et Saura-Calixto (2006), ont rapporté que le type et la polarité de solvant peuvent affecter le transfert d'électron et le transfert d'atome d'hydrogène impliqué dans les réactions d'oxydo-réductions et qui présentent des aspects essentiels de la mesure de la capacité antioxydante des échantillons.

L'huile essentielle exhibe une activité antiradicalaire inférieure à celle de l'hexane ( $CI_{50} = 47,21 \mu\text{g/ml}$ ). Ainsi, Bachrouch et al. (2013) ont rapporté que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par une faible activité antiradicalaire contre le DPPH.

### VI.2. Activité inhibitrice du blanchiment de la $\beta$ -carotène

L'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* exhibe une faible capacité d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène ( $CI_{50} = 158 \mu\text{g/ml}$ ) (Tableau IV.5).

Quant aux extraits aromatiques, l'évaluation de la capacité d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène des différents solvants testés montre que l'extrait EtOAc présente une activité inhibitrice ( $CI_{50} = 229,49 \mu\text{g/ml}$ ) supérieure à l'hexane ( $CI_{50} = 297,19 \mu\text{g/ml}$ ) et aux autres bio-solvants. Pour les alcools, la capacité d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène est très faible. En effet, l'EtOH et l'IPA ont des valeurs de la  $CI_{50}$  respectivement de 766,69 et 743,60  $\mu\text{g/ml}$ .

L'huile essentielle ainsi que les extraits aromatiques des feuilles de *Pistacia lentiscus* présentent une faible capacité d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène comparés à l'antioxydant de synthèse le BHT ( $IC_{50} = 70 \mu\text{g/ml}$ ). En effet, ces résultats sont en accord avec les travaux de Bachrouch et al. (2013) qui ont rapporté que l'huile essentielle de *P. lentiscus* présente une faible capacité d'inhibition du blanchiment de la  $\beta$ -carotène.

## VII. Conclusion

Dans ce chapitre, le potentiel de six agro-solvants à substituer l'hexane, solvant toxique pour l'homme et l'environnement, dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* a été étudié. Pour ce faire, deux approches ont été mises en œuvre : une approche in silico basée sur les simulations COSMO-RS et une approche métabolomique basée sur les analyses GC-MS. Ensuite, l'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée via deux tests : le test DPPH et le test de blanchiment de la  $\beta$ -carotène.



#### Chapitre IV : Eco-extraction des arômes des feuilles de *P. lentiscus*

Des différences entre les prédictions COSMO-RS et les expérimentations ont été constatés. En effet, le CPME est théoriquement le candidat potentiel pour remplacer l'hexane. Néanmoins, les expérimentations et l'analyse métabolomique ont montré que l'extrait d'EtOAc a un profil aromatique similaire à celui de l'hexane avec une efficacité d'extraction élevée. En se basant sur ces résultats, on peut conclure que l'EtOAc est le solvant vert le plus approprié pour remplacer l'hexane, conventionnellement utilisé, pour l'extraction des arômes des feuilles de *P. lentiscus*. En outre, l'EtOAc permet d'obtenir un extrait possédant une activité antiradicalaire intéressante contre le DPPH ( $IC_{50} = 5,82 \mu\text{g/ml}$ ), presque deux fois plus forte que l'antioxydant de synthèse le BHT ( $11,51 \mu\text{g/ml}$ ) et qui est de loin supérieur à celle de l'hexane ( $IC_{50} = 38,54 \mu\text{g/ml}$ ). Ce solvant est biodégradable, non toxique, on le trouve naturellement en petites quantités dans le rhum et les raisins endommagés par la grêle et peut être synthétisé à partir de la deshydrogénation du bio-éthanol (Filly et al., 2015).

**Chapitre V : Effet du solvant d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et sur l'activité antioxydante des fruits de *Pistacia lentiscus***

### I. Introduction

Les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention de nombreuses maladies comme les maladies cardiovasculaires, les cancers et le vieillissement cellulaire, en inhibant les enzymes qui sont à l'origine de la production des radicaux libres ou en piégeant les radicaux formés (Xu et al., 2017). Ces substances peuvent être obtenues par synthèse chimique ou bien isolées à partir de source naturelle.

Ces dernières années, l'utilisation d'antioxydant de synthèse est remise en question en raison des risques de toxicité potentiels. Par conséquent, la recherche de nouvelles sources naturelles d'antioxydants, des techniques efficaces d'extraction et de caractérisation de ces molécules sollicite de plus en plus l'intérêt des grands laboratoires (Karray, 2013).

En effet, les plantes médicinales et les aliments d'origine végétale, tels que les fruits, les légumes, les céréales, les épices, les herbes médicinales et également la valorisation des co-produits végétaux constituent une source potentielle d'antioxydants naturels. Ces substances bioactives sont principalement représentées par les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes, lignanes et stilbènes), les caroténoïdes (xanthophylles et carotènes) et les vitamines (vitamines E et C).

Les parties aériennes de Lentisque (feuilles et fruits) constitue une source importante d'antioxydants, en effet, des travaux antérieurs ont conduit à l'identification de différentes classes chimiques telles que les flavonoïdes, les anthocyanes, les acides phénoliques et les tanins (Remila et al., 2015).

Ainsi, la plupart des polyphénols, des flavonoïdes et des anthocyanes sont hydrosolubles (Xu et al., 2017) et sont généralement obtenus par extraction solide-liquide en utilisant des solvants polaires ou moyennement polaires tels que l'eau, l'éthanol, le méthanol, le propanol, l'acétone et leurs mélanges aqueux (Xu et al., 2017). Par ailleurs, l'extraction solide liquide, mettant en jeu des mélanges hydro-alcooliques, est la technique la plus pratiquée. En effet, parmi les alcools, l'éthanol est le solvant le plus utilisé en raison de sa disponibilité, son faible prix, sa pureté, son caractère non toxique et parfaitement biodégradable (Chemat et al., 2011). Ce solvant vert, est généralement utilisé à des proportions très élevés (entre 70 et 90%) dans les mélanges hydro-alcooliques (Jacotet-Navarro et al., 2017). Ainsi, le rapport éthanol/eau va dépendre de la nature chimique des composés à extraire mais aussi des conditions d'extraction tels que le temps, la température et la vitesse d'agitation.

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

Dans ce cadre, la présente étude vise à étudier l'effet du rapport éthanol/eau, d'une part sur les rendements d'extraction et la sélectivité d'extraction des antioxydants à partir des graines de *Pistacia lentiscus* et d'autre part sur l'activité antioxydante de ces métabolites. Ainsi, deux approches ont été utilisées : une approche *in silico* utilisant le modèle COSMO-RS pour la prédiction de la solubilité des métabolites d'intérêts dans les différents systèmes de solvants et une approche expérimentale basée sur l'évaluation des teneurs en composés phénoliques, l'activité antioxydante et l'analyse par CLHP des différents extraits.

### II. Etude *in silico*: simulation COSMO-RS

Afin de déterminer le meilleur ratio EtOH/H<sub>2</sub>O pour l'extraction des antioxydants à partir des fruits de *Pistacia lentiscus*, une analyse *in silico* a été conduite en premier temps en utilisant le logiciel COSMOthermX (version 17.02).

Les simulations COSMO-RS ont permis de déterminer l'indice de solubilité des différents solutés dans l'EtOH, l'eau et les différents systèmes de solvants EtOH/H<sub>2</sub>O (10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 et 90/10). Ainsi, les solutés ont été sélectionnés après une recherche bibliographique exhaustive. Ces derniers correspondent aux acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, acide benzoïque et l'acide salicylique), flavonoïdes (catéchine et lutéoline) et anthocyanes (delphinidine 3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside et cyanidin-3-O-rutinoside) identifiées précédemment dans les fruits de *Pistacia lentiscus* (Mehenni et al., 2017; Longo et al., 2007). Les valeurs de solubilité sont illustrées dans le tableau V.1 et peuvent être classées en 3 catégories. En effet, la couleur verte correspond à des indices de solubilité élevés (entre 0 et -1), la couleur orange correspond à des indices de solubilité moyens (entre -1 et -2) et la couleur rouge correspond à des indices de solubilité faible (> -2).

Tableau V.1. Solubilité relative des antioxydants dans les différents systèmes de solvant.

Solvent systems	Gallic acid	Caffeic acid	Benzoic acid	Salicylic acid	Luteolin	Catechin	Delphinidine 3-O-glucoside	Cyanidin-3-O-glucoside	Cyanidin-3-O-rutinoside
EtOH 100%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH/H2O (90/10)	-0.16	-0.02	-0.07	-0.11	-0.2	-0.22	-0.57	-0.43	-0.54
EtOH/H2O (80/20)	-0.34	-0.06	-0.16	-0.24	-0.42	-0.45	-1.18	-0.9	-1.12
EtOH/H2O (70/30)	-0.55	-0.097	-0.26	-0.39	-0.69	-0.71	-1.89	-1.46	-1.8
EtOH/H2O (60/40)	-0.77	-0.14	-0.39	-0.57	-0.97	-0.99	-2.63	-2.06	-2.5
EtOH/H2O (50/50)	-1.03	-0.2	-0.54	-0.79	-1.32	-1.31	-3.49	-2.72	-3.3
EtOH/H2O (40/60)	-1.31	-0.28	-0.73	-1.03	-1.72	-1.17	-4.4	-3.45	-4.3
EtOH/H2O (30/70)	-1.66	-0.39	-0.98	-1.36	-2.22	-2.08	-5.51	-4.33	-5.44
EtOH/H2O (20/80)	-2.06	-0.56	-1.3	-1.74	-2.83	-2.58	-6.76	-5.34	-6.78
EtOH/H2O (10/90)	-2.61	-0.84	-1.73	-2.28	-3.67	-3.26	-8.36	-6.65	-8.52
H2O 100%	-3.34	-1.25	-2.3	-2.96	-4.74	-4.134	-10.25	-8.19	-10.65

High Solubility index  
( $0 < \text{Log}x_{\text{sol}} \leq -1$ )

Medium Solubility index  
( $-1 < \text{Log}x_{\text{sol}} \leq -2$ )

Low Solubility index  
( $\text{Log}x_{\text{sol}} > -2$ )

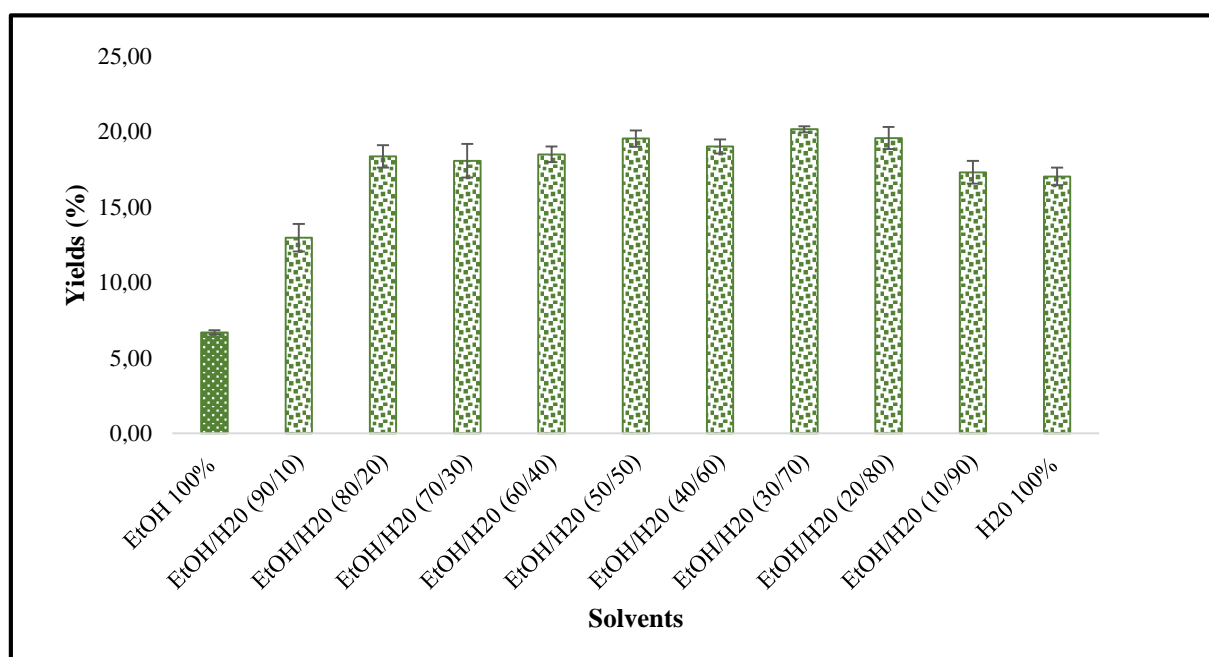
## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

Les résultats montrent que l'EtOH 100% et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10) sont les meilleurs solvants pour l'extraction de l'ensemble de métabolites. En revanche, les travaux de Jacotet-Navarro et al. (2018) portant sur l'effet du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O sur l'extraction des antioxydants à partir du romarin ont montré que seulement l'EtOH (100%) est théoriquement le meilleur solvant. En outre, une autre étude portée sur l'effet du ratio (EtOH/H<sub>2</sub>O) sur l'extraction des antioxydants de myrtille, utilisant le modèle COSMO-RS, a montré que l'EtOH (100%) est le meilleur solvant pour l'extraction des antioxydants (Ravi et al., 2018).

D'autre part, les acides phénoliques et les flavonoïdes présentent des indices de solubilités élevés dans les mélanges EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20), (70/30) et (60/40).

### III. Rendements d'extraction

Les rendements d'extractions varient en fonction du solvant d'extraction et sont compris entre 6,68 et 20,14% (Figure V.1). Contrairement aux prédictions COSMO-RS, l'EtOH (100%) donne le rendement le plus faible (6,68%). Par ailleurs, l'ajout de l'eau et donc la modification de la polarité du solvant à entrainer une amélioration des rendements d'extraction pour atteindre une valeur maximale de l'ordre de 20,14% avec le système EtOH/H<sub>2</sub>O (20/80). L'eau 100% exhibe un rendement supérieur à celui de l'éthanol 100% (17,01 et 6,68%, respectivement). Les résultats révèlent également qu'il n'y pas de différence significative entre le rendement d'extraction de l'eau pure et du mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (10/90).



**Figure V.1.** Variation des rendements d'extraction en fonction du solvant d'extraction.

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

En effet, selon Cacace et Mazza (2003) la solubilité d'un soluté et en particulier des composés phénoliques peut être améliorée avec l'utilisation de solvants mixtes. Ainsi, la variation de la concentration en éthanol provoque une modification des propriétés physique du solvant d'extraction tel que sa densité, sa viscosité et sa constante diélectrique.

### IV. Variabilité des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en anthocyanes en fonction du solvant d'extraction

Les antioxydants des graines de *Pistacia lentiscus* ont été extraits à l'aide d'un broyeur Ultra Turrax Tube drive (UTTD, IKA WERKE, Germany) en utilisant différents systèmes de solvants (EtOH/H<sub>2</sub>O) à différentes ratios (100:0 ; 90:10 ; 80:20 ; 70:30 ; 60:40 ; 50:50 ; 40:60 ; 30:70 ; 20:80 ; 10:90 ; 0:100). Ensuite, le contenu des différents extraits en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en anthocyanes a été évalué par des dosages colorimétriques.

#### IV.1. Teneurs en polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux de différents extraits a été déterminé via le test de Folin-Ciocalteu. L'analyse des résultats obtenus (Figure V.2) montre une variabilité significative des teneurs en polyphénols en fonction du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O.

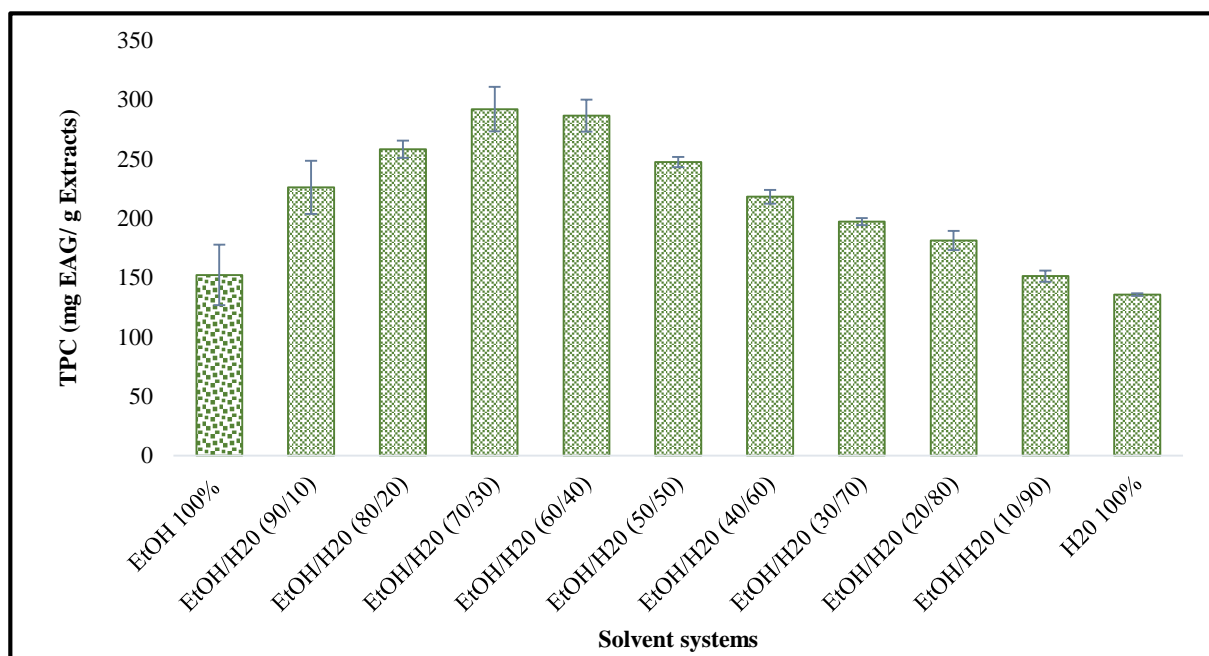


Figure V.2. Influence du rapport EtOH/H<sub>2</sub>O sur les teneurs en polyphénols totaux.

En effet, l'addition de l'eau à des proportions variant de 10% à 30% à l'EtOH permet d'améliorer son pouvoir extractant et ainsi d'augmenter les teneurs en polyphénols totaux. Ces

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

teneurs restent constantes à des proportions variant de 30% à 40%. Néanmoins, l'ajout de l'eau à des proportions élevées (50%, 60%, 70%, 80% et 90%) suit une diminution des teneurs en polyphénols totaux. La même tendance a été observée par d'autres auteurs (Yilmaz et Toledo, 2006, Spigno et al., 2007).

Le système EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présente le meilleur pouvoir extractant exhibant la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (292,04 mgEAG/g Extrait). Sur la figure V.1 on remarque que pour les solvants purs (H<sub>2</sub>O et EtOH), les teneurs en polyphénols totaux (152,22 et 135,69 mgEAG/g Extrait, respectivement) sont inférieures aux mélanges hydro-alcooliques (EtOH/H<sub>2</sub>O) utilisés à différentes proportions. Par ailleurs, les mélanges EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10), (80/20), (60/40), (50/50), (40/60), (30/70) et (20/80) exhibent des teneurs moyennes en polyphénols totaux. Ainsi, Mohammedi et Atik (2011) ont rapporté que l'utilisation de solvants mixtes permet l'enrichissement des extraits en polyphénols. En effet, selon Trabelsi et al. (2010) l'efficacité des solvants mixtes pourrait être liée à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans ces solvants en comparaison avec les solvants purs.

### IV.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

Comme pour les polyphénols totaux, les résultats montrent une variabilité des teneurs en flavonoïdes totaux (de 5,97mg EC/g Extraits à 11,25 mg EC/g Extraits) en fonction du rapport EtOH/H<sub>2</sub>O (Figure V.3).

En effet, une augmentation des teneurs en flavonoïdes totaux est observée avec l'ajout de l'eau à des proportions variant de 10 à 30% (de 9,58 à 11,07 mg EC/g Extraits). Ensuite, on remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les systèmes EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) et (60/40). En revanche, les teneurs en flavonoïdes totaux diminuent d'une manière significative à des proportions d'eau supérieures à 40%. L'EtOH pur et l'H<sub>2</sub>O pure présentent des teneurs comparables en flavonoïdes totaux et qui sont inférieures à ceux obtenus par les solvants mixtes (6,87 mg EC/g Extraits et 6,22 mg EC/g Extraits, respectivement).

Parmi les différents solvants testés, le mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux. Ces résultats sont en accord avec les simulations COSMORS, qui ont montré que les flavonoïdes (catéchine et lutéoline) présentent des indices de solubilité élevés dans ce mélange de solvant.



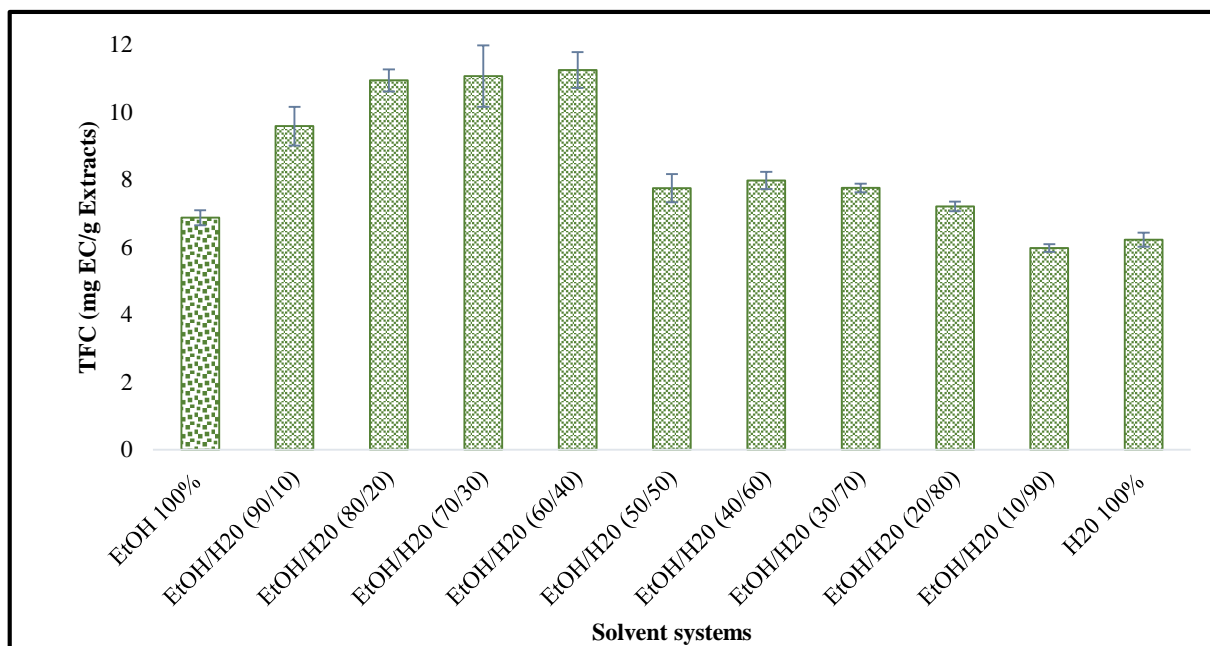


Figure V.3. Influence du rapport EtOH/H<sub>2</sub>O sur les teneurs en flavonoïdes totaux.

#### IV.3. Teneurs en anthocyanes totaux

Le contenu en anthocyanes totaux des différents extraits a été déterminé par la méthode du pH différentiel (Figure V.4).

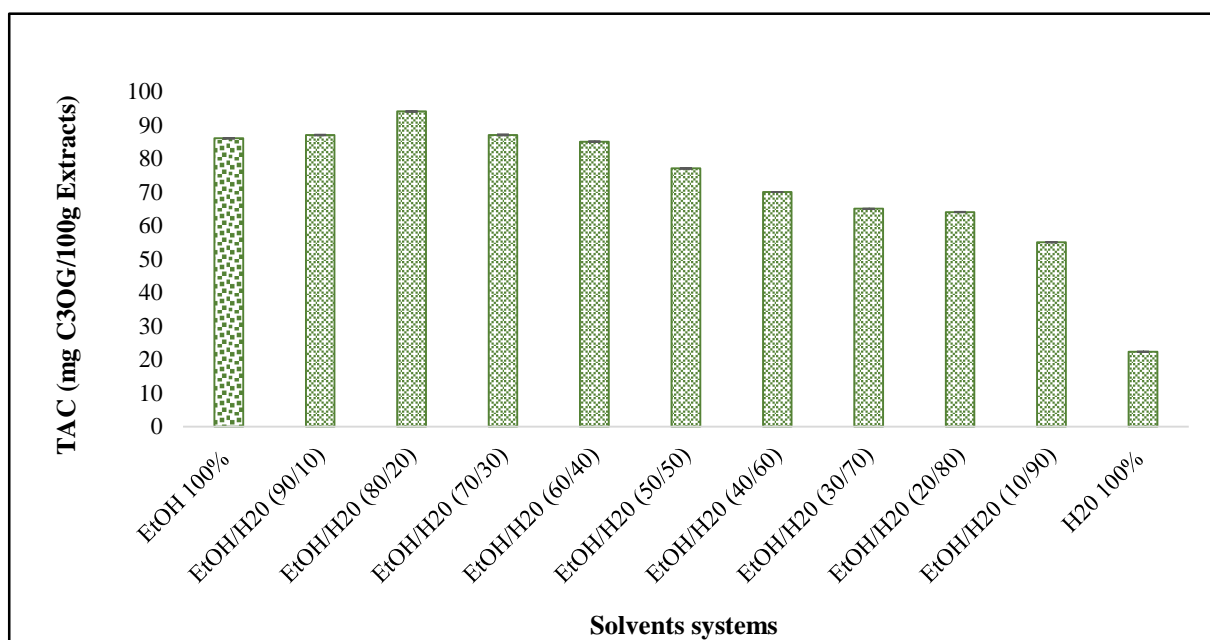


Figure V.4. Influence du rapport EtOH/H<sub>2</sub>O sur les teneurs en anthocyanes totaux.

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

Les résultats montrent que l'extrait le plus riche en anthocyanes est celui obtenu avec le mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) (94 mg C3OG/100g Extrait). En revanche, la teneur la plus faible (22,35 C3OG/100g Extrait) a été enregistrée dans l'extrait aqueux H<sub>2</sub>O (100%). Les résultats montrent également qu'au-delà de 20% de H<sub>2</sub>O, la concentration en anthocyanes diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O de 87 mg C3OG/100g Extrait (EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30)) à 22,35 mg C3OG/100g Extrait (EtOH/H<sub>2</sub>O (100/0)). En effet, Cacace et Mazza (2003) ont trouvé que l'extraction des anthocyanes à partir du cassis est affectée par la concentration d'EtOH utilisée et que 85% d'EtOH est la meilleure concentration pour l'extraction de ces métabolites.

En se basant sur les résultats des 3 tests colorimétriques, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) apparaît comme le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes totaux, alors que l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) est le meilleur système de solvant pour l'extraction des anthocyanes à partir des fruits de *P. lentiscus*.

### V. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Pistacia lentiscus* a été évaluée in vitro en utilisant le radical libre DPPH. Le tableau V.2 présente le pourcentage d'inhibition du radical DPPH pour les différents systèmes de solvant utilisés et du Trolox, pris comme un contrôle positif.

**Tableau V.2.** Variabilité du pouvoir antiradicalire (IC<sub>50</sub>) des fruits de *Pistacia lentiscus* en fonction du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O.

Solvent systems	DPPH (IC <sub>50</sub> µg/mL)
EtOH 100%	8.94 ± 0.00
EtOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	4.13 ± 0.00
EtOH/H <sub>2</sub> O (80/20)	4.12 ± 0.00
EtOH/H <sub>2</sub> O (70/30)	<b>2.39 ± 0.02</b>
EtOH/H <sub>2</sub> O (60/40)	2.42 ± 0.01
EtOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	2.41 ± 0.02
EtOH/H <sub>2</sub> O (40/60)	2.85 ± 0.01
EtOH/H <sub>2</sub> O (30/70)	3.44 ± 0.01
EtOH/H <sub>2</sub> O (20/80)	5.98 ± 0.01
EtOH/H <sub>2</sub> O (10/90)	6.46 ± 0.04
H <sub>2</sub> O 100%	8.35 ± 0.01
<b>Trolox</b>	<b>2.56 ± 0.00</b>

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

Les résultats montrent que les différents extraits de *P. lentiscus* exhibent une forte capacité à piéger le radical libre DPPH avec des valeurs de la  $CI_{50}$  variant de 2,39 à 8,94  $\mu\text{g/ml}$ . Par ailleurs, l'extrait EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présente l'activité antioxydante la plus forte avec la  $CI_{50}$  la plus faible (2,39  $\mu\text{g/ml}$ ) suivie de l'EtOH/H<sub>2</sub>O (60/40) (2,42  $\mu\text{g/ml}$ ) et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (50/50) (2,41  $\mu\text{g/ml}$ ). En outre, la capacité à piéger le radical libre DPPH de l'extrait EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) est comparable à celle du Trolox ( $CI_{50}=2,56 \mu\text{g/ml}$ ).

L'EtOH 100% et l'H<sub>2</sub>O 100% affichent les valeurs de la  $CI_{50}$  les plus élevées (8,94 et 8,35  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement) reflétant ainsi l'activité antiradicalaire la plus faible.

En résumé, les solvants mixtes présentent une activité antioxydante plus intéressante que les solvants purs (EtOH et H<sub>2</sub>O). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bourgo et al. (2016). De plus, l'activité antioxydante des fruits de *P. lentiscus* varie en fonction du solvant d'extraction. En effet, selon Boeing et al. (2014) les capacités antioxydantes des extraits ont une forte relation avec le solvant utilisé, principalement en raison du potentiel antioxydant différent des composés de polarités différentes. Wijekoon et al. (2011) ont montré également que la modification de la polarité du solvant, entraîne une modification du type d'antioxydant dissout dans celui-ci.

### VI. Analyse statistique

Afin d'étudier la relation entre le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir des fruits de *P. lentiscus* une analyse en composante principale a été réalisée en utilisant le logiciel XL-STAT (2017). Cette méthode permettrait d'établir des corrélations mathématiques entre les différents facteurs et de mettre en évidence les relations entre les variables et les phénomènes à l'origine de ces relations.

#### VI.1. Matrice de corrélation

L'analyse statistique a été effectuée sur une matrice de données formée de 5 variables et 10 observations. La matrice de corrélation, présentée dans le tableau V.3, permet de mettre en évidence les relations existantes entre les différentes variables prises deux à deux et le degré de liaison entre ces derniers. Ainsi, les corrélations significatives entre les paramètres étudiés sont marquées en gras dans la table de corrélation. Des corrélations positives entre deux paramètres montrent que ces derniers évoluent de la même façon et dans le même sens, tandis que des corrélations négatives entre deux paramètres montrent que ces derniers évoluent de façon différente et dans des sens contraires.

**Tableau V.3.** Coefficient de corrélation (Pearson (r)) entre les différentes variables.

Variables	Extraction Yields	TPC	TFC	TAC	IC <sub>50</sub>
Extraction Yields	<b>1</b>				
TPC	0,361	<b>1</b>			
TFC	0,170	<b>0,920</b>	<b>1</b>		
TAC	-0,223	<b>0,704</b>	<b>0,720</b>	<b>1</b>	
IC <sub>50</sub>	<b>-0,611</b>	<b>-0,872</b>	<b>-0,679</b>	-0,497	<b>1</b>

*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05 et correspondent aux corrélations les plus significatives. TPC : teneurs en polyphénols totaux, TFC : teneurs en flavonoïdes totaux, TAC : teneurs en anthocyanes totaux.*

## VI.2. Choix des composantes principales

Dans une ACP, les axes exprimant le maximum de variabilité sont sélectionnés (valeur propre >1). L'idéale est de travailler avec une ACP à 2 composantes car la multiplication d'axes rend l'interprétation des données plus complexes.

**Tableau V.4.** Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes factoriels.

	F1	F2	F3	F4	F5
<b>Valeur propre</b>	3,32	1,33	0,24	0,1	0,02
<b>Variabilité (%)</b>	66,33	26,50	4,70	1,98	0,49
<b>% cumulé</b>	66,33	92,84	97,53	99,51	100

Le tableau V.4 montre que 92,84 % de la variance totale est exprimé seulement par les deux premières composantes F1 et F2 présentant des valeurs propres de l'ordre de 3,32 et 1,33, respectivement. Ainsi, la composante F1 exprime 66,3 % et la composante F2 exprime 26,50 % de la variance totale. Ces deux axes sont retenus pour la construction de l'ACP.

## VI.3. Définition des composantes principales

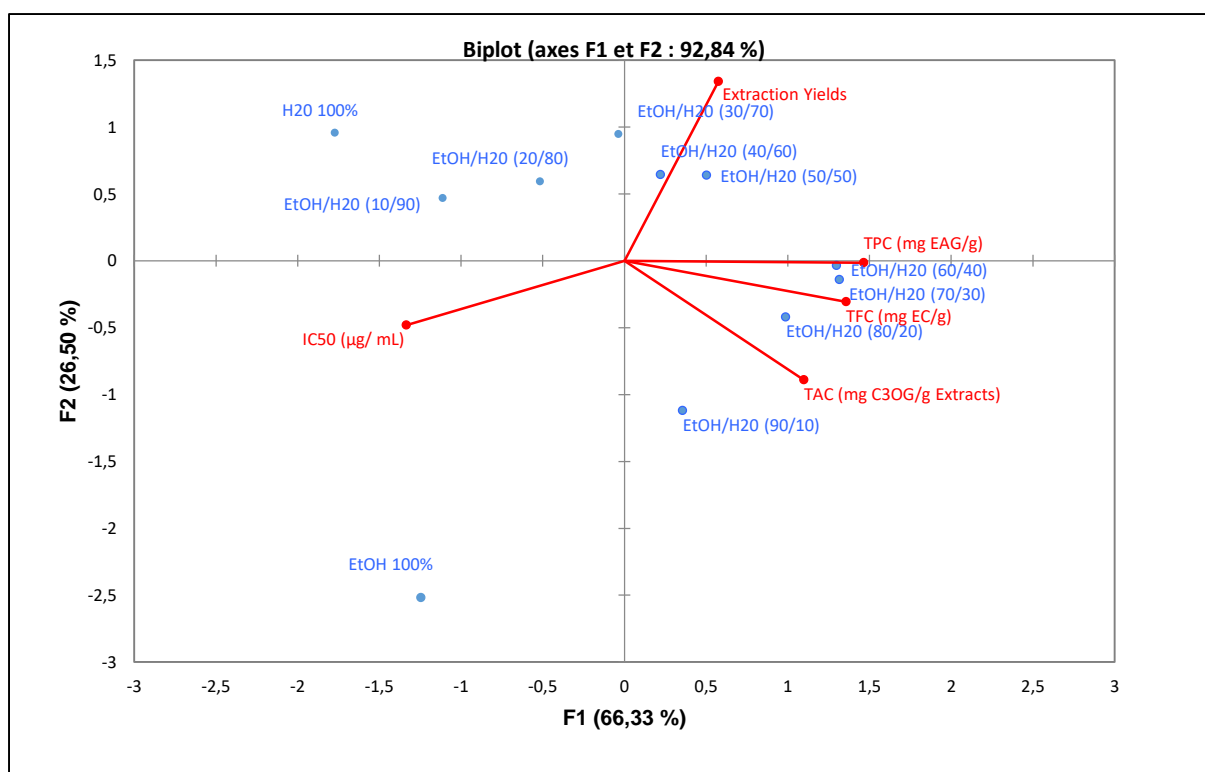
La contribution de chaque variable dans l'expression des axes factoriels retenus est illustrée dans le tableau V.5. Ces données présentent le rapport de corrélation entre les variables et les axes factoriels. Plus ce rapport est important, plus la variable contribue à l'expression de l'axe. En effet, les résultats montrent que l'ensemble des variables sont corrélées à la composante F1 à l'exception des rendements d'extraction qui sont plus corrélés à la composante F2.

**Tableau V.5.** Corrélations entre les variables et les axes factoriels.

	F1	F2
<b>Extraction Yields</b>	0,387	<b>0,904</b>
<b>TPC</b>	<b>0,987</b>	-0,009
<b>TFC</b>	<b>0,914</b>	-0,206
<b>TAC</b>	<b>0,740</b>	-0,600
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>-0,900</b>	-0,325

#### VI.4. Analyse de l'ACP

Le graphique résultant de l'analyse factorielle (Figure V.5) illustre des regroupements, des oppositions et des tendances directionnelles. En effet, les systèmes de solvants peuvent être classés en 4 groupes différents en fonction de leur richesse en composés phénoliques et leur pouvoir antiradicalaire.



**Figure V.5.** Biplot de l'ACP : projection des variables et des individus dans le plan factoriel F1-F2.

Ainsi, les mélanges EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10), (80/20), (70/30) et (60/40) sont regroupés ensemble et forment le premier groupe. Ces derniers sont caractérisés par leur richesse en

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

polyphénols totaux (TPC), en flavonoïdes totaux (TFC) et en anthocyanes totaux (TAC). L'EtOH/H<sub>2</sub>O (50/50), (40/60) et (30/70) forment le deuxième groupe. Ces systèmes de solvant sont caractérisés par des rendements d'extraction élevés mais par des teneurs faibles en composés phénoliques.

Le troisième groupe est formé par l'EtOH/H<sub>2</sub>O (20/80), (10/90) et H<sub>2</sub>O (100%) et le quatrième groupe est formé par l'EtOH seule. Ces solvants (du groupe 3 et 4) sont les moins efficaces pour l'extraction des composés phénoliques à partir des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Par ailleurs, on remarque qu'il existe une corrélation positive entre les teneurs en composés phénoliques, en particulier TPC et TFC, et l'activité antiradicalaire (IC<sub>50</sub>). En effet, la puissante activité antioxydante des extraits de *Pistacia lentiscus* peut être attribuée à leurs richesses en composés phénoliques. Ainsi, comme il a été montré précédemment, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présentent l'activité antiradicalaire la plus élevée et également les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui ont montré qu'il existe une corrélation positive entre le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante de certaines plantes (Bratu et al., 2018 ; Jacotet-Navarro et al., 2018 ; Ben Jannet et al., 2017 ; Mehenni et al., 2016 ; ksouri et al., 2012).

## VII. Identification des composés phénoliques par CLHP

L'identification et la quantification des composés phénoliques des différents extraits des fruits de *P. lentiscus*, obtenus avec des mélanges EtOH/H<sub>2</sub>O à des proportions variant de 0 à 100%, a été réalisée par CLHP. Les composés phénoliques des différents extraits ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des standards.

Ainsi, l'analyse CLHP a permis d'identifier sept composés phénoliques dont 5 acides phénoliques : l'acide gallique, l'acide cinnamique, l'acide benzoïque, l'acide salicylique et l'acide caféique, et deux flavonoïdes : la lutéoline et la catéchine (Tableau V.6). Ces composés ont été identifiés dans les fruits de *P. lentiscus* auparavant (Mehenni et al., 2016).

Pour les différents systèmes de solvants, l'acide gallique et la lutéoline sont les composés majoritaires avec des quantités variant de 1,5 mg/g d'extraits à 5,6 mg/g d'extraits et de 2,9 mg/g d'extraits à 0,8 mg/g d'extraits, respectivement. En effet, Mehenni et al. (2016) ont rapporté que les espèces de *Pistacia* sont caractérisées par la présence de l'acide gallique. Ce dernier présente un effet de piégeage des radicaux libres (Romani et al., 2002).

## Chapitre V : Eco-extraction des antioxydants des fruits de *P. Lentiscus*

Le système EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présente les quantités les plus élevées en composés phénoliques (9,61 mg/g d'extraits). Ceci pourrait justifier le pouvoir antiradicalaire important de cet extrait. En effet, Baratto et al. (2003) ont rapporté que l'activité antioxydante de *P. lentiscus* est due à la présence d'acide gallique et de ses dérivés polygalloyl (5-O-galloyl, 3,5-di-O-galloyl). En outre, les composés phénoliques identifiés dans les fruits de *P. lentiscus* sont connus pour être de puissants agents antioxydants (Mehenni et al., 2016), ce qui leur confère de fortes propriétés biologiques encourageant leur valorisation dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Ces résultats sont en accord avec les prédictions COSMO-RS, montrant que l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) présente des indices de solubilité élevés pour l'ensemble des acides phénoliques et des flavonoïdes.

**Tableau V.6.** Profils en composés phénoliques des fruits de *Pistacia lentiscus* en fonction du solvant d'extraction obtenus par HPLC.

	Composés phénoliques identifiés							$\Sigma$ (mg/gExtrait)
	Acide gallique (mg/gExtrait)	Acide cinnamique (mg/gExtrait)	Acide Benzoïque (mg/gExtrait)	Acide salicylique (mg/gExtrait)	Acide caféique (mg/gExtrait)	Luteoline (mg/gExtrait)	Catéchine (mg/gExtrait)	
$\lambda_{\max}$ (nm)	280	280	250	315	280	250	280	
EtOH 100%	2,18	0,03	0,23	0,08	tr	1,14	0,08	3,74
EtOH/H <sub>2</sub> O (90/10)	3,43	0,04	0,36	0,13	tr	1,80	0,12	5,89
EtOH/H <sub>2</sub> O (80/20)	2,4	0,03	0,25	0,09	tr	1,26	0,08	4,12
EtOH/H <sub>2</sub> O (70/30)	5,6	0,07	0,59	0,22	tr	2,93	0,20	9,61
EtOH/H <sub>2</sub> O (60/40)	4,21	0,05	0,45	0,16	tr	2,21	0,15	7,22
EtOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	3,52	0,04	0,37	0,14	tr	1,84	0,12	6,04
EtOH/H <sub>2</sub> O (40/60)	3,8	0,05	0,40	0,15	tr	1,99	0,13	6,52
EtOH/H <sub>2</sub> O (30/70)	2,6	0,03	0,28	0,10	tr	1,36	0,09	4,46
EtOH/H <sub>2</sub> O (20/80)	2,4	0,03	0,25	0,09	tr	1,26	0,08	4,12
EtOH/H <sub>2</sub> O (10/90)	1,8	0,02	0,19	0,07	tr	0,94	0,06	3,09
H <sub>2</sub> O 100%	1,5	0,02	0,16	0,06	tr	0,79	0,05	2,57

tr : trace.

## VIII. Conclusion

Dans ce chapitre, l'effet du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O sur l'extraction des antioxydants à partir des fruits de *Pistacia lentiscus* a été évalué. Deux approches ont été utilisées : une approche *in silico* basée sur les prédictions COSMO-RS et une approche expérimentale basée sur des tests colorimétriques et des analyses CLHP. Quelques différences ont été notées entre les simulations COSMO-RS et les données expérimentales. En effet, selon les prédictions COSMO-RS l'EtOH 100% et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10) se sont révélés être les meilleurs solvants pour l'extraction des acides phénoliques, des flavonoïdes et des anthocyanes à partir des fruits de *P. lentiscus*. Cependant, les expérimentations ont montré que l'EtOH 100% exhibe les quantités les plus faibles en ces métabolites. Par ailleurs, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) est le meilleur solvant pour l'extraction des acides phénoliques et des flavonoïdes. Alors que l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) est le meilleur solvant pour l'extraction des anthocyanes. Ceci peut être dû à la différence d'affinité de chaque système solvant à une gamme particulière de composés phénoliques.

Les résultats ont permis également de mettre en évidence la richesse des fruits de *Pistacia lentiscus* en antioxydants. Ces derniers sont dotés d'une activité antiradicalaire (IC<sub>50</sub> = 2,39 µg/ml) comparable à celle de l'antioxydant de synthèse le Trolox (IC<sub>50</sub> = 2,56µg/ml), encourageant son utilisation dans l'industrie agroalimentaire comme antioxydant naturel ainsi que sa valorisation dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.



### Conclusion générale et perspectives

La préparation d'échantillon constitue une étape très importante dans le domaine de l'extraction du végétal qui va influencer la qualité et la quantité des résultats obtenus. Elle consiste généralement en quatre étapes : l'échantillonnage, le séchage, l'extraction du végétal et la préparation d'échantillon pour analyse. Parmi ces quatre opérations unitaires, l'extraction constitue l'étape la plus importante. Ainsi, l'efficacité d'extraction dépend de la taille des particules, la vitesse d'agitation, la température, le temps d'extraction, le rapport solvant/échantillon, la nature et la composition du solvant d'extraction.

Le choix du solvant d'extraction le plus adéquats pour l'extraction des métabolites d'intérêts est très important et doit tenir compte des caractéristiques physico-chimiques du solvant comme : la sélectivité, la polarité, la volatilité et la toxicité. En effet, les solvants conventionnellement utilisés pour l'extraction des substances naturelles sont issus de sources pétrochimiques non renouvelables et sont généralement toxiques pour l'homme et l'environnement.

Ainsi, dans le contexte actuel de développement durable et les contraintes réglementaires, la recherche de nouvelles alternatives aux solvants pétrochimiques est devenue une nécessité.

Dans ce contexte, nous avons évalué, dans un premier lieu, la performance de dix solvants alternatifs (EtOH, IPA, EtOAc, ethyl lactate, DMC, p-cymene,  $\alpha$ -pinene, limonene, MeTHF et CPME) afin de substituer l'hexane, solvant toxique pour l'homme et l'environnement, inflammable et d'origine non renouvelable, pour l'extraction de l'huile végétale à partir des graines de *Pistacia lentiscus*. Deux approches ont été utilisées pour le criblage des solvants : une approche théorique en utilisant des outils de prédiction tels que COSMO-RS et une approche expérimentale basée sur les analyses CPG-FID et HPTLC. Ensuite, les données CPG-FID et HPTLC ont été soumises à des analyses multivariées. Théoriquement et expérimentalement, le MeTHF était le meilleur biosolvant pour remplacer l'hexane. De plus, l'extrait MeTHF présentait une bonne activité anti-inflammatoire, inhibant de 91,9 % la libération de NO dans les macrophages RAW 264.7. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le potentiel des solvants verts, en particulier du MeTHF dans l'extraction lipidique et ont montré que l'huile de *P. lentiscus* présentait une activité anti-inflammatoire potentielle et une grande valeur nutritionnelle, notamment une teneur élevée en acide oléique et linoléique.

## Conclusion et perspectives

En deuxième lieu, le potentiel de six agro-solvants (CPME, DMC, MeTHF, EtOAc, EtOH et IPA) à remplacer l'hexane pour l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus* a été évalué. La solubilité relative des arômes de Lentisque a été prédite dans les six biosolvants testés en utilisant le modèle COSMO-RS. Par la suite, une analyse métabolomique a été réalisée afin de comparer les profils métaboliques des bio-solvants avec ceux de l'hexane, pris comme référence. Des différences entre les données théoriques et expérimentales ont été révélées. Expérimentalement, l'EtOAc est le biosolvant le plus prometteur pour remplacer l'hexane dans l'extraction des arômes à partir des feuilles de *P. lentiscus*. En effet, l'EtOAc a montré un profil aromatique similaire à celui de l'hexane et exhibe le rendement d'extraction le plus élevé. En outre, l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits aromatiques a montré que l'EtOAc exhibe une intéressante activité antiradicalaire contre le DPPH ( $IC_{50} = 5,82 \mu\text{g/ml}$ ), presque deux fois plus forte que l'antioxydant de synthèse le BHT ( $11,51 \mu\text{g/ml}$ ) et qui est de loin supérieur à celle de l'hexane ( $IC_{50} = 38,54 \mu\text{g/ml}$ ). De plus, l'EtOAc présente une activité inhibitrice du blanchiment de la  $\beta$ -carotène supérieure à l'hexane.

En troisième lieu, l'effet du ratio EtOH/H<sub>2</sub>O sur l'extraction des antioxydants à partir des fruits de *P. lentiscus* et sur l'activité antioxydante de ces métabolites a été étudié en utilisant deux approches : une approche *in silico* basée sur les simulations COSMO-RS et une approche expérimentale basée sur des tests colorimétriques et des analyses CLHP. Quelques différences ont été révélées entre les données théoriques et les expérimentations. En effet, selon les prédictions COSMO-RS l'EtOH 100% et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (90/10) sont les meilleurs solvants pour l'extraction des acides phénoliques, des flavonoïdes et des anthocyanes à partir des fruits de *P. lentiscus*. Cependant, les expérimentations ont montré que l'EtOH 100% exhibe les quantités les plus faibles en ces métabolites. Par ailleurs, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) est le meilleur solvant pour l'extraction des acides phénoliques et des flavonoïdes. Alors que l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) est le meilleur solvant pour l'extraction des anthocyanes. Cette étude a permis également de mettre en évidence la richesse des fruits de *Pistacia lentiscus* en antioxydants. Ces derniers sont dotés d'une activité antiradicalaire ( $IC_{50} = 2,39 \mu\text{g/ml}$ ) comparable à celle de l'antioxydant de synthèse le Trolox ( $IC_{50} = 2,56 \mu\text{g/ml}$ ), encourageant son utilisation dans l'industrie agroalimentaire comme antioxydant naturel ainsi que sa valorisation dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le potentiel des solvants vert pour la substitution des solvants toxiques, utilisés conventionnellement dans le domaine de l'extraction du végétal, à l'échelle laboratoire. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer

## Conclusion et perspectives

l'efficacité de ces agro-solvants à l'échelle pilote et d'évaluer leurs coûts d'utilisation à l'échelle industrielle.

**En perspectives** nous envisagerons également :

1. L'évaluation de l'effet de combinaison des agro-solvants en mélanges binaires ou ternaires sur l'efficacité d'extraction des molécules d'intérêts.
2. La recherche de méthodes innovantes pour la séparation des métabolites d'intérêts outre la distillation et l'évaporation classique du solvant afin de contourner les problèmes de volatilité et de viscosité des agro-solvants.
3. L'évaluation d'autres activités biologiques (activité anti-cancéreuse, anti-tyrosinase, etc) des biomolécules isolées à partir des différentes parties de *P. lentiscus*.
4. La séparation et la purification des principes actifs (PA) à l'aide des techniques chromatographiques innovantes comme la Chromatographie de Partage Centrifuge.
5. Et la modélisation des relations PA-cibles afin d'une éventuelle utilisation dans la formulation de nouveaux produits pharmaceutiques.

## Références bibliographiques

- Abbas, C., Rammelsberg, A.M., Beery, K. 2003. Extraction of phytosterols from corn fiber using green solvents. US Patent 20,030,235,633.
- Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman R, Mariotte A.M, Ghedira K, Laporte F, Dijoux-Franca, M.G Chekir-Ghedira, L. 2007. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. *Chemico-Biological Interactions*. 165:1-13.
- Abouraa, I., Nani, A., Belarbi, M., Murtaza, B., Fluckiger, A., Dumont, A., Benammar, C., Saidani Tounsi, M., Ghiringhelli, F., Rialland, M., Akhtar Khan, N., Hichami, A., 2017. Protective effects of polyphenol-rich infusions from carob (*Ceratonia siliqua*) leaves and cladodes of *Opuntia ficus-indica* against inflammation associated with diet-induced obesity and DSS-induced colitis in Swiss mice. *Biomed. Pharmacother.* 96, 1022-1035.
- Adams, R.P. (1995) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream.
- Aissi, O., Boussaid, M., Messaoud, C., 2016. Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Ind. Crops. Prod.* 91: 56-65.
- Alfos, C., 2003. Lipochimie et innovations. Oléagineux, Corps gras, Lipides. 10(5-6) : 344-347.
- Alma, M.H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F. T., Yilmaz, N. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.52: 3911-3914,
- AL-Saghir M.G. 2006. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Thèse de doctorat. Blacksburg, Virginia.

## Références bibliographiques

- Al-Said, M. S., Ageel, A. M., Parmar, N. S., Tariq, M. 1986. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 15: 271-278.
- Amhamdi, H., Aouinti, F., Jean Paul Wathelet, J.P., Elbachiri, Ali. 2009. Chemical Composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from eastern Morocco. *Records of Natural Products*. 3:90- 95.
- Anastas, P.T., Warner, J.C. 1998. *Green chemistry: theory and practice*. New York: Oxford University Press. 148 p.
- Angles, E., Jaouen, P., Pruvost, J., Marchal, L., 2017. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. *Algal. Res.* 21, 27-34.
- Antonucci, V., Coleman, J., Ferry, J. B., Johnson, N., Mathe, M., Scott, J. P., Xu, J. (2011). Toxicological assessment of 2-Methyltetrahydrofuran and Cyclopentyl Methyl Ether in support of their use in pharmaceutical chemical process development. *Organic Process Research & Development*. 15: 939-941.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. 2005b. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomedical Chromatography*. 19: 586–605.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. 2011. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. 112: 303-309.
- Azizan, K.A., Ghani, N.H.A., Nawawi, M.F., 2015. GC-MS based metabolomics and multivariate statistical analysis of *Wedelia Trilobata* extracts for the identification of potential phytochemical properties. *Plant. Omics*. 8: 537-543.
- Bachrouch, O., Mediouni Ben Jemâa, J., Aidi Waness, W., Taloud, T., Marzouk, B.M., 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored. Prod. Res.* 46: 242-247.

## Références bibliographiques

- Bajkacz, S., Adamek, J. 2017. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*. 168: 329-335.
- Bajkacz, S., Adamek, J. 2018. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Analytical Methods*. 11: 1330-1343.
- Balasubramanian, R.K., Doan, T.T.Y., Obbard, J.P.H., 2013. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chem. Eng. J.* 215: 929-936.
- Baldasseroni, A., Bavazzano, P., Buiatti, E., Lanciotti, E., Lorini, C., Toti, S., Biggeri, A. 2003. Occupational exposure to n-hexane in Italy-analysis of a registry of biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health*. 76: 260-6.
- Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R., Pogni, R., 2003. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free. Radic. Res.* 37: 405-412
- Barbouchi, M., Elamrani, K., El Idrissi, M., Choukrad, M., 2018. A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of different solvent extracts from various parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of King Saud University – Science*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.010>.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A. 2007. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7093-7098.
- Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira L., Mohamed Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G. 2005. New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L.(Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*.20: 410-414.
- Ben Jannet, S., Hymery, N., Bourgou, S., Jdey, A., Lachaal, M., Magné, C., Ksouri, R., 2017. Antioxidant and selective anticancer activities of two *Euphorbia* species in human acute myeloid leukemia. *Biomed. Pharmacother*, 90, 375-385. doi:10.1016/j.biopha.2017.03.072

## Références bibliographiques

- Ben Khedir, S., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., Rebai, T., 2017. The healing effect of *Pistacia lentiscus* fruit oil on laser burn. *Pharm. Biol.* 55, 1407-1414.
- Ben Khedir, S., Mzid, M., Bardaa, S., Moalla, D., Sahnoun, Z., Rebai, T. 2016. In vivo evaluation of the anti-inflammatory effect of *Pistacia lentiscus* fruit oil and its effects on oxidative stress. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2016: 1-12.
- Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., Marouf A. 2010. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Biological Sciences.* 10: 1-9.
- Benazzouz. A., Moity. L., Pierlot, C., Molinier, V., Aubry, J.M. 2014. Hansen approach versus COSMO-RS for predicting the solubility of an organic UV filter in cosmetic solvents. *Colloids Surf A: Physicochem eng aspects.* 458: 101-109.
- Ben-Youssef, S., Fakhfakh, J., Breil, C., Abert-Vian, M., Chemat, F., Allouche, N., 2017. Green extraction procedures of lipids from Tunisian date palm seeds. *Ind. Crop. Prod.* 108, 520-525.
- Bertouche, S., Tomao, V., Hellal, A., Boutekedjiret, C., Chemat, F. 2013. First approach on edible oil determination in oilseeds products using  $\alpha$ -pinene. *J Essent Oil Res.* 25:439-443.
- Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., B-Sghaier M., Kilani, S., Mariotte A.M., Dijoux-Franca M.G., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2010. Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro.* 24: 509-515.
- Boeing, J.S., Barizão, É.O., e Silva, B.C., Montanher, P.F., de Cinque Almeida, V., Visentainer, J.V., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent. J.* 8, 48. doi:10.1186/s13065-014-0048-1.
- Boelens, M.H., Jimenez, R. 1991. Chemical composition of the essential oil from the gum and various parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic Gum Tree). *Flavour and Fragrance Journal.* 6: 271-275.

## Références bibliographiques

- Bonnier, G., Douin, R, 1934. Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Librairie Générale de l'Enseignement. Paris. 12 tomes. 120 fasc. 721 p.
- Boulebda, N., Belkhiri, A., Belfadel, F., Bensegueni, A., Bahri, L. 2009. Dermal Wound Healing Effect of *Pistacia Lentiscus* Fruit's Fatty Oil. *Pharmacognosy Research*. 1:66-71.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R. 2013. Five *Pistacia species* (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*. 2013: 33.
- Bratu, M.M., Birghila, S., Popescu, A.S., Negreanu-Pirjol, B., Negreanu-Pirjol, T., 2018. Correlation of antioxidant activity of dried berry infusions with the polyphenols and selected microelements contents. *B. Chem. Soc. Ethiopia*. 32, 1. doi:10.4314/bcse.v32i1.1
- Breil, C., Meullemiestre, A., Vian, M., Chemat, F., 2016. Bio-based solvents for green extraction of lipids from oleaginous yeast biomass for sustainable aviation biofuel. *Molecules*. 21:196. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020196>
- Bundeasomchok, K., Filly, A., Rakotomanomana, N., Panichayupakaranant, P., Chemat, F., 2016. Extraction of  $\alpha$ -mangostin from *Garcinia mangostana* L. using alternative solvents: Computational predictive and experimental studies. *LWT. Food. Sci. Technol*. 65: 297-303.
- Cacace, J. E., Mazza, G., 2003. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *J. Food. Sci*. 68, 240-248. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x
- Campos Molina, M.J., Mariscal, R., Ojeda, M., Lopez Granados, M. 2012. Cyclopentyl methyl ether: A green co-solvent for the selective dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural. *Bioresource Technology*. 126: 321-327.



## Références bibliographiques

- Cascant, M. M., Breil, C., Miguel de la Guardia, S. G., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F., 2017. A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Anal. Bioanal. Chem.* DOI 10.1007/s00216-017-0323-9.
- Chaabani, E., Abert Vian, M., Bott, R., Ginies, C., Defoort, C., Ksouri, R., Chemat F. 2019. Extraction of aromas from *Pistacia lentiscus* L. leaves using alternative solvents: COSMO-RS-assisted solvent screening and GC-MS metabolites profiling. *Separation Science and Technology*. DOI: 10.1080/01496395.2019.1574821.
- Chemat, F. 2015. *Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Technique et ingénierie*, Dunod. 336 p.
- Chemat, F., Abert Vian, M., 2014. *Alternative solvents for natural products extraction*; Springer: Heidelberg, New York, Dordrecht, London.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G., 2019. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *Trends in Analytical Chemistry*. 118: 248-263.
- Cho, Y.H., Spronsen, J.V., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Isabel, W.C.E.A., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. 2011. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*.156: 1701-1705.
- Choi, S.A., Lee, J.S., Oh, Y.K., Jeong, M.J., Kim, S.W., Park, J.Y. 2014. Lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by moltensalt/ionic-liquid mixtures. *Algal Res.* 3: 44-48.
- Choi, Y.H., Verpoorte, R. 2014. Metabolomics: what you see is what you extract. *Phytochemical Analysis*. 25: 289-290.
- Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Michael, K. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*. 107: 1120-1130.
- Clarke, C. J., Tu, W. C., Levers, O., Bröhl, A., Hallett, J. P., 2018. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.* 118, 747-800.

## Références bibliographiques

- Codex Alimentarius. 1993. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Vingtième session, Genève, 28 juin–7 juillet 1993.
- Dakiche, H., Khali, M., Boutoumi, H., 2017. Phytochemical Characterization and in vivo anti-inflammatory and wound-healing activities of *Argania spinosa* (L.) seeds seed oil. Rec. Nat. Prod. 11, 171-184.
- De Lanfranchi, F., Mai, B.T., Girard, M. 1999. La fabrication d'huile de lentisque (Linsticu ou chessa) en Sardaigne. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée. 41: 81-100
- De Morais, S. M., Teles do Nascimento, J. E., De Sousa Silva, A. A., Ribeiro Honório Junior, J. E., Nunes Pinheiro, D. C. S., Vasconcelos de Oliveira, R., 2017. Fatty acid profile and anti-inflammatory activity of fixed plant oils. Acta. Sci. Vet. 45, 1437.
- Dejoye, T.C., Abert Vian, M., Chemat, F. 2013. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process. Bioresour Technol. 134: 271-275.
- Dellai, A., Souissi, H., Borgi, W., Bouraoui, A., Chouchane, N. 2013. Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. Industrial crops and products. 49: 879 -882.
- Dhifi, W., Jelali, N., Chaabani, E., Beji, M., Fatnassi, S., Omri, S., Mnif, W., 2013. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. Afr. J. Agric. Res. 8, 1395-1400.
- Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., Roncalés, P. 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Control. 22: 1046 -1053.
- Djerafi, R., Masmoudi, Y., Crampon, C., Meniai, A.H., Elisabeth Badens, E., 2015. Supercritical anti-solvent precipitation of ethyl cellulose. Journal of Supercritical Fluids. 105: 92-98.
- Djerrou, Z., Hamdi-Pacha, Y., Belkhiri, A. M., Djaalab, H., Riachi, F., Serakta, M., Boukeloua, A., Maameri, Z., 2011. Evaluation of *Pistacia lentiscus* fatty oil effects on glycemic

## Références bibliographiques

- index, liver functions and kidney functions on New Zealand rabbits. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8, 214-219.
- Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C. 2006. Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research.* 18: 335-338.
- Dorvault F.L.M. 1928. *L'officine ou répertoire général de pharmacie pratique.* 17ème édition. Vigot frères Ed. Paris. 2012 p.
- Durand, M., Molinier, V., Kunz, W., Aubry, J.M. 2011. Classification of organic solvents revisited by using the COSMO-RS approach. *Chemistry-A European Journal*, 17: 5155-5164.
- El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M.I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Marzouki, M.N., Ben Hadj Ahmed, S., 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in Minced Beef Meat. *J. Evid. Based. Complementary. Altern. Med.* 2014: 1-11.
- Engler, A. 1883. Anacardiaceae, in *Monographie Phanerogamarum*, Vol. 4, eds de Candolle A. P., de Candolle A. C., editors. Paris: G. Masson.171–54
- Ernst, M., Silva, D. B., Silva, R. R., Vêncio, R. Z. N., Lopes, N. P., 2014. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Nat. Prod. Rep.* 31, 784-806.
- Fernández, A., Camacho, A., Fernández, C., Altarejos, J., Pérez, P., 2000. Composition of the Essential Oils from Galls and Aerial Parts of *Pistacia lentiscus* L.. *J. Essent. Oil. Res.* 12 :19-23.
- Fernandez, X., Chemat, F. 2012. *La chimie des huiles essentielles – Tradition et innovation.* Vuibert, Paris.

## Références bibliographiques

- Filly, A., Fabiano-Tixier, A.S., Fernandez, X., Chemat, F., 2015. Alternative solvents for extraction of food aromas. Experimental and COSMO-RS study. *Food. Sci. Technol.* 61: 33-40.
- Filly, A., Fabiano-Tixier, A.S., Lemasson, Y., Roy, C.; Fernandez, X., Chemat, F. 2014. Extraction of aroma compounds in blackcurrant buds by alternative solvents: Theoretical and experimental solubility study. *C. R. Chim.* 17: 1268-1275.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B. Jr., Nacy, C.A., 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology.* 144, 278-283.
- Gromski, P.S., Muhamadali, H., Ellis, D.I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M.L., Goodacre, R., 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta.* 879: 10-23.
- Halim, R., Rupasinghe, T.W.T., Tull, D.L., Webley, P.A., 2014. Modelling the kinetics of lipid extraction from wet microalgal concentrate: A novel perspective on a classical process. *Chem. Eng. J.* 242 : 234–253.
- Hayder, N., Ammar, R.B., Abdelwahed, A., Kilani, Soumaya., Mahmoud, Amor., Ben Chibani, Jemni, Mariotte, A. M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L. 2005. Antibacterial and antimutagenic activity of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus*. *Toxicological and Environmental Chemistry.* 87: 567-573.
- Hepper, F.N. 1990. Pharaoh's flowers. The botanical treasures of Tutankhamun, Ed. HSMO, Londres. 80 p.
- Herms, D. A., Mattson, W. J., 1992. "The dilemma of plants: to grow or defend". *The quarterly Review of Biology.* 67, 283-335.
- Ismail, A., Lamia, H., Mohsen, H., Samia, G., Bassem, J. 2013. Chemical composition and antifungal activity of three Anacardiaceae species grown in Tunisia. *Science International.* 1:148-154.

## Références bibliographiques

- Jacotet-Navarro, M., Laguerre, M., Fabiano-Tixier, A.S., Tenon, M., Feuillère, N., Bily, A., Chemat, F., 2018. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis*. 39, 1946-1956.doi:10.1002/elps.201700397.
- Karray M.H., 2013. Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive: une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse de doctorat. 181p.
- Kerton, F. M., Mariotte, R., 2013. *Alternative Solvents for Green Chemistry*, 2nd ed. Royal society of chemistry, Croydon.
- Khiari, K., Aawad, S., Loubar, K., Tarabet, L., Mahmoud, R., Tazerout, M., 2016. Experimental investigation of *Pistacia lentiscus* biodiesel as a fuel for direct injection diesel engine. *Energy. Convers. Manag.* 108, 392-399.
- Kim, H.K., Verpoorte, R. 2009. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*. 21: 4-13.
- Klamt, A., 2003. Prediction of the mutual solubilities of hydrocarbons and water with COSMO-RS. *Fluid. Phase. Equilib.* 206, 223-235.
- Koleva, I., Teris, A., Beek, V., Linssen, H., Groot, A., Lyuba, N., Evstatieva, LN., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13: 8-17.
- Kosmides, A.K., Kamisoglu, K., Calvano, S.E., Corbett, S.A., Androulakis, I.P., 2013. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 41: 205-221.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 7681-7685.
- Ksouri, R., Ksouri, W.M., Jallali, I., Debe, A., Magné, C., Hiroko, I., Abdelly, C., 2012. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical: nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32, 289-326.

## Références bibliographiques

- Kua, Y. L., Gan, S., Morris, A., Ng, H. K. 2016. Ethyl lactate as a potential green solvent to extract hydrophilic (polar) and lipophilic (non-polar) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 4:21-31.
- Le Cloirec, P., 1998. Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 734 p.
- Le Floch, E., Nabli, M.A. 1983. Programme flore et végétation Tunisiennes. In: Contribution à une étude ethnobotanique de la flore Tunisienne. Tunis. Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, imprimerie officielle de la république Tunisienne. 144-145 p.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y, Oh, H.M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 101:575–577.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. 2014a. Essential oils as green solvents, springer, pp 55- 61.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Ginies, C., Chemat, F., 2014. Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT. Food. Sci. Technol*. 59: 724-731.
- Li, Y., Fine, F., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., Carre, P., Pages, X., Chemat, F. 2014b. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *Comptes Rendus Chimie*.17: 242-251.
- Liu, S.K., Mamidipally, P.K. 2005. Quality Comparison of Rice Bran Oil Extracted with d-Limonene and Hexane. *Cereal chemistry*. 82: 209-215.
- Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G. 2007. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L.. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8: 360-364.
- Mamidipally, P.K., Liu, S.X. 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 106:122-125.
- Manini, P., Andreoli, R., Niessen, W.M.A. 2004. Liquid chromatography–mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *J Chromatogr A*. 1058: 21-37.

## Références bibliographiques

- Mardirossian, A., 2009. Les alcools ED 4225. INRS. 2<sup>ème</sup> édition. 6p.
- Martin, A.C., Pawlus, A.D., Jewett, E.M., Wyse, D.L., Angerhofer, C.K., Hegeman, A.D., 2014. Evaluating solvent extraction systems using metabolomics approaches. *R. S. C. Advances*. 4: 26325-26334.
- Meddour, A., Yahia. M., Benkiki. N., Ayach. A., 2013. Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L.. *Lebanese Science Journal*. 14: 49-60.
- Medini, F., Bourgou, S., Lalancette, K., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., Abdelly, C., Legault, J., Ksouri, R., 2015. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *S. Afr. J. Bot.* 99, 158–164.
- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., Atmani, D. 2016. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24: 653-669.
- Mekni, N., 2011. GC/MS Chemical Analysis of *Pistashia lentiscus* fatty oil from the north of Tunisia. *Int. J. PharmTech. Res.* 3, 2245-2248.
- Meullemiestre, A., Breil, C., Vian, M., Chemat, F. 2015. *Modern Techniques and Solvents for the Extraction of Microbial Oils*. Springer International Publishing AG, Switzerland. 61 p.
- Mezni, F., Aouadhi, C., Khouja, M. L., Khaldi, A., Maaroufi, A. 2015. In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. *Natural Product Research*. 29: 565-570.
- Mezni, F., Labidi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja, M. L., Khaldi, A., 2014. Influence of harvest date on fatty acid composition and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oils. *J. Mater. Environ. Sci.* 5, 1703-1708.
- Mezni, F., Shili, S., Ben Ali, N., Larbi Khouja, M., Khaldi, A., Maaroufi, A., 2016. Evaluation of *Pistacia lentiscus* seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharm. Biol.* 54, 747-751.

## Références bibliographiques

- Mezni, F., Slama, A., Ksouri, R., Hamdaoui, G.H., Larbi Khouja, M., Khaldi, A., 2018. Phenolic profile and effect of growing area on *Pistacia lentiscus* seed oil. Food Chem. 257, 206-210.
- Mishur, R.J., Rea, S.L. 2012. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging and of age-related diseases. Mass Spectrometry Reviews. 31: 70-95.
- Mohammedi, Z., Atik, F., 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. Inter. J. Pharma. Bio. Sci. 2: 609-615.
- Moity, L., Durand, M., Benazzouz, A., Pierlot, C., Molinier, V., and Aubry, J.-M. 2012. Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach. Green Chemistry. 14: 1132-1145.
- Morrison, W. R., Smith, L. M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. J. Lipid Res. 5, 600-608.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Ayora-Cañada, M. J., 2005. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. Chem. Phys. Lipids. 134,173-82.
- Naouar, M. S., Zouiten Mekki, L., Charfi, L., Boubaker, J., Filali, A., 2016. Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. Biomed. Pharmacother. 83, 577-583.
- Olfach Bachrouch, O., Mediouni-Ben Jemâa, J., Aidi Waness, W., Talou, T., Marzouk, B., Abderraba, M. 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidea). Journal of Stored Products Research. 46: 242-247.
- Pankaj, D. 2004. Ethyl Acetate: A Techno-Commercial Profile. Chemical Weekly Bombay. 49: 179-186.
- Patrascu, C., 2012. Les agrosolvants ED 4230. INRS. 3<sup>ème</sup> édition. Impression Groupe Corlet S.A. 8p.



## Références bibliographiques

- Pereira, C.S.M., Rodrigues, A.E. 2014. Ethyl lactate main properties, production processes, and applications. In *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*. Chapter 12, Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 107-323 p.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food. Res. Int.* 39: 791– 800.
- Pottier Alapetite, G., 1979. Flore de la Tunisie. Angiospermes-dicotyledones: Apétales-Dialypétales. Ouvrage publié par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l' Agriculture - Tunisie, 651p.
- Pozarska, A., Mathews, C.C., Wong, M., Pencheva, K. 2013. Application of COSMO-RS as an excipient ranking tool in early formulation development. *European journal of pharmaceutical sciences.* 49: 505-511.
- Raj Joshi, D., Adhikari, N, 2019. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International.* 28: 1-1.
- Rameau, J.C., Mansion, D., Dumé, G. 2008. Flore forestière française, Région méditerranéenne Tome 3. Institut pour le développement forestier France. Direction de l'espace rural et de la forêt. 2426 p.
- Rapinel, V., Rombaut, N., Rakotomanomana, N., Vallageas, A., Cravotto, G., Chemat, F., 2016. An original approach for lipophilic natural products extraction: Use of liquefied n-butane as alternative solvent to n-hexane. *LWT- Food Science and Technology.* 85:524-533.
- Rapinel, V., Santerre, C., Hanaei, F., Belay, J., Vallet, N., Rakotomanomana, N., Vallageas, A., Chemat, F. 2018. Potentialities of using liquefied gases as alternative solvents to substitute hexane for the extraction of aromas from fresh and dry natural products. *Comptes rendus Chimie.* 21: 590-605.
- Rauf, A., Patelb, S., Uddin, G., Siddiqui, Bina.S., Ahmad, B., Muhammad, N., Mabkhotg, Y., Ben Haddah, T. 2017. Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 86: 393-404.
- Ravi, H. K., Breil, C., Vian, M. A., Chemat, F., Venskutonis, P. R., 2018. Biorefining of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Pomace Using Microwave Hydrodiffusion and Gravity, Ultrasound-Assisted, and Bead-Milling Extraction. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 6, 4185–4193.

## Références bibliographiques

- Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. 2015. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*. 7: 274-286.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini M. 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia Lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*. 13: 79-86.
- Ryckebosch, E., Muylaert K., Foubert I., 2011. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J Am Oil Chem Soc*. 10: 1-10.
- S. Bourgou, S., Serairi Beji, R., Medini, F., Ksouri, R., 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *J. New. Sci. Agri & Biotech*. 28, 1649-1655.
- Sakagami, H., Kishino, K., Kobayashi, M., Hashimoto, K., Iida, S., Shimetani, A., Nakamura, Y., Takahashi, K., Ikarashi, T., Fukamachi, H., Satoh, K., Nakashima, H., Shimizu, T., Takeda, K., Watanabe, S., Nakamura, W. 2009. Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In Vivo*. 23: 215-224.
- Santos, B.A.V., Silva, V.M. T.M., Loureiro, J.M., Rodrigues, A.E. 2014. Review for the Direct Synthesis of Dimethyl Carbonate. *Chem Bio Eng Reviews*. 1: 214-229.
- Scott, M., P, J., Xu, J., 2011. Toxicological Assessment of 2-Methyltetrahydrofuran and Cyclopentyl Methyl Ether in support of their use in pharmaceutical chemical process development. *Org. Process Res. Dev*. 15, 939-941.
- Sharifi, M.S., Hazell, S.L. 2012. Isolation, analysis and antimicrobial activity of the acidic fractions of mastic, Kurdica, Mutica and Cabolica gums from Genus *Pistacia*. *Global Journal of Health Science*. 4: 217-228.
- Sicaire, A. G., Abert Vian, M., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F., 2015a. Experimental approach versus COSMO-RS assisted solvent screening for predicting the solubility of rapeseed oil. *O. C. L*. 22, D404, DOI: 10.1051/ocl/2015010.
- Sicaire, A. G., Vian, M., Fine, F., Joffre, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F., 2015b. Bio-Based Solvents for Extraction of Fat and Oils: Solubility Prediction, Global Yield,

## Références bibliographiques

- Extraction Kinetics, Chemical Composition and Cost of Manufacturing. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8430-8453.
- Sicaire, A.G., Abert Vian, M., Filly, A., Li, Y., Bily, A., Chemat, F. 2014. 2-Methyltetrahydrofuran: Main Properties, Production Processes, and Application in Extraction of Natural Products. In *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*. Chapter 12, Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 253-323 p.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food. Eng.* 8, 200-208. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., Moulin, A. 2004. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie.* 86: 919-925.
- Takeuchi, K., Shiroyama, H., Saitō, O., Matsuura, M. 2018. *Biofuels and sustainability : holistic perspectives for policy-making*. Tokyo: Springer Japan. 265p.
- Tambellini, N.P., Aremberg, V.Z., Turner, R.J., Weljie, A.M. 2013. Evaluation of extraction protocols for simultaneous polar and non-polar yeast metabolite analysis using multivariate projection methods. *Metabolites.* 3: 592-605.
- Tej Yaakoubi, M., Dhaou, S., 2007. Extraction et analyse de la composition acide des huiles fixes de *Pistacia lentiscus* L. *Revue des Régions Arides.* 1, 30-9.
- Tingshuang, Y. I., Jun, W., Avi, G. G., Dan, E. P. 2008. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany.* 95: 241-251.
- Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., Boukchina, S., Mayer, P. 2012. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food Chemistry.* 131: 2-6.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C., 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food. Sci. Tech.* 43: 632-639.

## Références bibliographiques

- Tundo, P., Arico, F., Rosamilia, A., Grego, S., Rossi, L., 2006. Dimethyl carbonate: Green solvent and ambident reagent. In: Green Chemical Reaction. Springer. 241p.
- US Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, 2005. The code of federal regulations, Title 21. Food and Drugs. Government printing office, Washington, DC.
- USFDA, 1997, Eligibility for classification as generally recognized as safe (GRAS) Code of Federal Regulation Title 21, Section 170.30. United States Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Washington, DC.
- Vaya, J., Mahmood, S. 2006. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia Lentiscus* L.). *Biofactors*, 28: 169-175.
- Veillet, S., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F. 2010. Green procedure using limonene in the Dean Stark apparatus for moisture determination in food products. *Anal Chim Acta*. 674:49-52.
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., Mustafa, N. R., Kim, H. K., 2008. Metabolomics: back to basics. *Phytochem Rev*. 7, 525-537.
- Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F. 2008. Total lipid extraction of food using d - limonene as an alternative to n -hexane. *Chromatographia* 68: 311-313.
- Watanabe, K., Yamagiwa, N., Torisawa, Y. 2007. Cyclopentyl Methyl Ether as a new and alternative process solvent. *Org Process Res Dev*. 11: 251-258.
- Wijekoon, M.M.J.O., Bhat, R., Karim, A.A., 2011. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etligeria elatior* Jack.) inflorescence. *J. Food Compos. Anal*. 24, 615-619.doi:10.1016/j.jfca.2010.09.018
- Workflow4metabolomics. <http://workflow4metabolomics.org>.
- Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.J., Li, H.B., 2017. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci*. 18, 96. doi:10.3390/ijms18010096.
- Yara-Varon, E., Fabiano-Tixier, A.S., Bacells, M., Canela-Garayoa, R., Bily, A., Chemat, F., 2016. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of

## Références bibliographiques

carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. R. S. C. Advances. 6: 27750-27759.

Yilmaz, Y., Toledo, R. T., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. J. Food Compos. Anal. 19, 41-44.

## Résumé

Le développement de la chimie verte, l'épuisement des ressources pétrolières et la prise de conscience des risques liée à l'utilisation des solvants pétroliers ont conduit à la recherche de nouvelles alternatives pour réduire l'utilisation des solvants nocifs non renouvelables tels que l'hexane. L'objectif de cette thèse a donc consisté en la recherche de solvants alternatifs plus respectueux de la santé et de l'environnement pour l'éco-extraction des composés phénoliques et des acides gras à partir des graines de *Pistacia lentiscus* et des arômes à partir de ces feuilles. Pour ce faire, une première approche *in silico* basée sur des outils de prédictions tels que COSMO-RS a été complétée par une approche expérimentale associée à des traitements chimiométriques. Cette démarche a conduit à la sélection de quatre solvants verts, le MeTHF pour l'extraction des acides gras, l'EtOAc pour l'extraction des arômes, l'EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes et l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) pour l'extraction des anthocyanes. Par la suite, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait lipidique obtenu par le MeTHF et l'activité antioxydante des extraits aromatiques et des extraits phénoliques de *P. lentiscus* ont été évaluées *in vitro*. Ces travaux ont montré que l'huile végétale a présenté une activité anti-inflammatoire potentielle, inhibant de 91,9% la libération d'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>) dans les macrophages RAW 264,7. De plus, les résultats ont permis de mettre en évidence la richesse des fruits en antioxydants. En effet, l'extrait obtenu par l'EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) a montré une activité antiradicalaire (IC<sub>50</sub> = 2,39 µg/ml) comparable à celle de l'antioxydant de synthèse le Trolox (IC<sub>50</sub> = 2,56 µg/ml). En outre, l'extrait aromatique de *P. lentiscus* obtenu avec l'EtOAc a présenté une activité antiradicalaire intéressante contre le DPPH (IC<sub>50</sub> = 5,82 µg/ml).

**Mots clés :** *Pistacia lentiscus*, solvants alternatifs, éco-extraction, COSMO-RS, huile végétale, arômes, antioxydants, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante.

## Abstract

The development of Green chemistry, the depletion of petroleum resources and the awareness of the risks associated to the use of petroleum solvents have led to search a new alternatives to reduce the use of non-renewable petrochemical harmful solvents such as hexane. The objective of this thesis has consisted in the research of alternative solvents more respectful of health and environment for the eco-extraction of fatty acids and phenolic compounds from *Pistacia lentiscus* fruits and aromas from these leaves. A first *in silico* approach using the COSMO-RS predictions was supplemented by an experimental approach paired with chemometrics analysis. This led to selection of four alternative solvents, MeTHF for oil extraction, EtOAc for aromas extraction, EtOH/H<sub>2</sub>O (70/30) for polyphenols and flavonoids extraction and EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) for anthocyanins extraction. Subsequently, the anti-inflammatory activity of MeTHF lipid extract and the antioxidant activity of aromatic and phenolic extracts of *P. lentiscus* were evaluated *in vitro*. Results showed that vegetable oil exhibited a potential anti-inflammatory activity, inhibiting by 91.9% the release of (nitric oxide) NO in RAW 264.7 macrophages. In addition, results highlighted the richness of the fruits in antioxidants. In fact, EtOH/H<sub>2</sub>O (80/20) extract showed a good antiradical activity (IC<sub>50</sub> = 2.39 µg/ml) comparable to that of the synthetic antioxidant Trolox (IC<sub>50</sub> = 2.56 µg / ml). In addition, the aromatic extract obtained with EtOAc showed an interesting anti-radical activity against DPPH (IC<sub>50</sub> = 5.82 µg/ml).

**Keywords:** *Pistacia lentiscus*, alternative solvents, eco-extraction, COSMO-RS, vegetable oil, aromas, antioxidants, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.