



HAL
open science

Impact de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'extraction des molécules bioactives de rhizomes de *Rheum ribes* L.

Elizabeth Abi Aad

► To cite this version:

Elizabeth Abi Aad. Impact de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'extraction des molécules bioactives de rhizomes de *Rheum ribes* L.. Génie des procédés. Université de La Rochelle; Université Libanaise, 2023. Français. NNT : 2023LAROS008 . tel-04297689

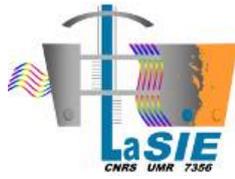
HAL Id: tel-04297689

<https://theses.hal.science/tel-04297689v1>

Submitted on 21 Nov 2023

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.



LA ROCHELLE UNIVERSITÉ

Et

L'UNIVERSITÉ LIBANAISE

L'ÉCOLE DOCTORALE *EUCLIDE*

Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE)

UMR CNRS 7356

Et

L'ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES ET DE TECHNOLOGIE

Plateforme de Recherches et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (PRASE)

THÈSE

Présentée par

Elizabeth ABI AAD

Soutenue le 19 avril 2023

Pour l'obtention du grade de

Docteur de La Rochelle Université et de l'Université Libanaise

Discipline : Génie des procédés

Impact de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'extraction des molécules bioactives de rhizomes de *Rheum ribes* L.

Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Encadrante de thèse

Encadrante de thèse

M. Youssef EL RAYESS

M. Abdellah ARHALIASS

Mme. Nathalie BOURGOUNON

Mme. Samar AZZI

M. Karim ALLAF

M. Joseph HADDAD

Mme. Colette BESOMBES

Mme. Racha KARAKY

Professeur, Université Saint Esprit de Kaslik

Professeur, Université de Nantes

Professeure, Université Bretagne Sud

Maître de conférences, Université Saint Esprit de Kaslik

Professeur émérite, La Rochelle Université

Professeur, Université libanaise

Maître de conférences, La Rochelle Université

Maître de conférences, Université Libanaise

*« Our Greatest Weakness Lies In Giving Up. The Most Certain
Way To Succeed Is Always To Try Just One More Time »*

Thomas Edison

Remerciements

Ce travail de thèse a été mené au sein du Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE) et la Plateforme de Recherche et d'Analyses en Sciences de l'Environnement (PRASE) dans le cadre d'une cotutelle entre La Rochelle Université et l'Université Libanaise. Je souhaite en premier temps remercier La Rochelle Université et l'Université Libanaise ainsi que les laboratoires LaSIE et PRASE, particulièrement leur directeurs Monsieur Xavier Feugas et Monsieur Fouad El Hajj Hassan respectivement. Je tiens à remercier ainsi l'Ecole Doctorale Euclide et l'Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie dirigées par Monsieur Karim Aït-Mokhtar et Monsieur Nazih Moubayed. Je suis également reconnaissante pour l'aide des secrétaires Madame Jennifer De La Corte Gomez, Madame Isabelle Hirsch, Madame Zeinab Ibrahim et Madame Fatima Naser.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Campus France et à l'Université Libanaise pour leur précieuse contribution en tant que financeurs de ma thèse de doctorat dans le cadre du programme « SAFAR ». Votre soutien financier a été d'une importance capitale pour la réalisation de mes travaux de recherche et l'accomplissement de cette étape cruciale de ma carrière académique.

A mes deux chers directeurs de thèse Monsieur Karim Allaf et Monsieur Joseph Haddad, je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements pour votre soutien et votre guidance tout au long de mon parcours de thèse de doctorat. Votre expertise, votre patience et votre dévouement ont été d'une valeur inestimable, et je suis profondément reconnaissante de vous avoir eu comme directeurs de thèse. Je tiens également à remercier infiniment mes deux co-directrices Madame Colette Besombes et Madame Racha Karaky. Votre mentorat a été essentiel pour mon développement académique et professionnel. Vos conseils éclairés, vos encouragements constants et votre volonté de pousser mes limites m'ont permis de repousser les frontières de mes connaissances et de réaliser un travail de recherche solide et significatif. Votre capacité à susciter ma curiosité et à stimuler ma réflexion critique a été une source d'inspiration constante.

Merci également à tous les docteurs, enseignants-chercheurs et techniciens du LaSIE (Madame Armelle Nouviaire, Madame Christelle Rebere et Monsieur Antony GELICUS), du LIENSs (Monsieur Laurent Picot et Monsieur Pierre-Edouard Bodet), de la faculté d'agronomie-UL (Madame Hélène RIZK et Monsieur Ghassan ABDEL MENHEM) et de la

faculté de pharmacie-UL (le doyen Monsieur Assem El-kak, Madame Rola Matta et Monsieur Ali Jaber), qui par leurs précieuses expériences, ont contribué à la réussite de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers les membres du jury de ma thèse pour leurs précieux commentaires. Leurs expertises complémentaires ont grandement amélioré et enrichi mon travail. Je remercie Monsieur Abdellah Arhaliass et Monsieur Youssef El Rayess pour avoir accepté de rapporter mon travail, Madame Nathalie Bourgougnon pour avoir accepté de présider ce jury et Madame Samar Azzi pour avoir examiné mon manuscrit de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à mes très chers parents Nabil et Joumana, mes deux frères Elias et Charbel, ma belle-sœur Pamela et mon fiancé Imad, qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours exigeant. Leur amour, leurs encouragements et leur soutien indéfectible ont été une source d'énergie et de motivation dans les moments les plus difficiles.

Je souhaite rendre un hommage sincère à la mémoire de ma grand-mère Aida Daou. Ta présence a été un cadeau précieux et je suis reconnaissante d'avoir eu une grand-mère aussi merveilleuse et aimante. Ta lumière continuera de briller en moi et ton amour restera gravé dans mon cœur.

La réalisation d'une thèse de doctorat est une entreprise ardue qui demande une grande résilience et une force mentale. Dans ce contexte, avoir des cousins tel que les miens a été une véritable bénédiction. La présence bienveillante de Romy Daou, Alfred Daou et Charbel Daou ainsi que celle de mes amies Norly Wannes, Reine Abi Khalil, Larissa Bachour et Ghadeer Mattar a été une source de réconfort et de motivation lorsque j'en avais le plus besoin.

Je souhaite également remercier tous mes collègues et camarades de l'ADocs notamment Alexandre Nehme, Julien Sayet, Alain Makhour, Nour El Din Afyouni, Hiba Souifan, Rama Ayoub, Noura Joudieh, Georges Costantine, Ahmad Deeb, Caroline Marais, Ismail Kada, Clément Genin et Mohamed Sawadogo pour leur soutien. Leur amitié et leur camaraderie ont rendu cette expérience de recherche plus agréable et ont contribué à mon épanouissement personnel et professionnel. En ajoutant une pensée spéciale à mon très cher ami Alexandre. Je tiens à souligner son rôle précieux dans mon parcours de thèse de

doctorat. Son soutien moral et émotionnel a été d'une importance capitale pour traverser les moments de doute et les périodes de stress auxquels j'ai pu faire face.

Je tiens également à prendre un moment pour me remercier moi-même pour mes efforts personnels tout au long de mon parcours de thèse de doctorat. J'ai consacré de nombreuses heures de travail, de recherches et de réflexions à ce projet ambitieux, et je suis fier du chemin parcouru. J'ai dû faire preuve de discipline, de persévérance et de détermination pour mener à bien cette thèse. J'ai surmonté des obstacles, fait face à des échecs temporaires et relevé des défis importants. Aujourd'hui, je me félicite de mes efforts personnels. J'ai dû faire preuve d'adaptabilité pour continuer à avancer malgré la crise sanitaire mondiale du COVID-19, ainsi que les crises économiques et sécuritaires au Liban.

Résumé

Rheum ribes L. (la rhubarbe) est l'une des plantes médicinales méditerranéennes les plus importantes. La préparation des décoctions aqueuses des rhizomes de cette plante est devenue une pratique courante chez les patients souffrant de diverses maladies. La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) est un traitement à haute température et à courte durée (HTST high-temperature/short-time) suivi d'une chute brutale de pression vers le vide (Pression absolue de 5 kPa environ). Le traitement par DIC induit l'expansion et réduit la tortuosité de la matrice traitée, et assure ainsi une meilleure diffusivité des solvants d'extraction et par la suite une plus grande disponibilité des molécules actives.

D'une part, nos travaux de recherche ont visé l'identification de l'impact du traitement par DIC des rhizomes d'une espèce libanaise de *R. ribes* L. Les évaluations ont été basées sur les teneurs en polyphénols totaux (TPC) et en flavonoïdes (TFC) ainsi que sur les pouvoirs antioxydants des extraits aqueux de rhizomes traités. Les résultats ont montré qu'une corrélation négative existe entre la pression de vapeur saturée appliquée et les valeurs de TPC, TFC et les activités antioxydantes des échantillons traités. Cependant, il n'y avait pas d'influence significative du temps de traitement par DIC sur les variables réponses. A ces deux facteurs opératoires de la DIC, pression et temps de traitement, s'ajoute la teneur en eau (W) des rhizomes. Les résultats ont montré qu'une augmentation ne provoque pas des meilleurs rendements en composés phénoliques.

D'autre part, ce travail inclut également l'étude de l'impact du traitement par DIC sur les activités biologiques (effets antibactériens et antiprolifératifs) des extraits de rhizomes. Les résultats ont mis en évidence que les extraits aqueux de rhizomes traités par DIC présentent, aux concentrations testées, de très faibles pouvoirs antibactériens sur *E. coli* et *S. aureus*, avec des résultats légèrement supérieurs au niveau de l'inhibition de la croissance de *S. aureus*. En ce qui concerne le test de viabilité des cellules cancéreuses du mélanome, les résultats ont montré que le traitement par DIC a un impact positif sur le pouvoir antiprolifératif des échantillons traités en comparaison avec une matrice non-traitée par DIC et extraite par voie aqueuse. En particulier, deux échantillons parmi ceux testés, ont enregistré un pouvoir antiprolifératif de 60%.

Les dosages par HPLC et UHPLC ont révélé la présence de trois anthraquinones (l'émodyne, le chrysophanol et le physcion) dans les extraits de rhizomes ainsi qu'une vingtaine de composés de la famille des flavonoïdes. Cependant, les quantités d'anthraquinones détectés ne sont pas significativement plus élevées dans les extraits traités par DIC que dans ceux non-traités.

Finalement, il a été constaté que la teneur phénolique totale d'un échantillon aqueux traité avec les paramètres optimaux de la DIC est égale à celle d'un point hydroalcoolique non traité. Des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour la validation de ce résultat.

Mots-clés : *Rheum ribes* L., Détente Instantanée Contrôlée, polyphénols, flavonoïdes, activités antioxydante, température de transition vitreuse, activités antibactériennes, activités antiprolifératives, Dosages chromatographiques.

Abstract

Rheum ribes L. (rhubarb) is one of the most essential Mediterranean medicinal plants. Preparing its rhizomes' aqueous decoctions has become common among patients suffering from various diseases. Instant Controlled Pressure Drop (DIC) is a High-Temperature Short-Time treatment (HTST) followed by an abrupt pressure drop towards the vacuum (approximately 5 kPa). This technology increases the expansion and reduces the tortuosity of the treated matrix to ensure better diffusivity of the extraction solvents and greater availability of the active molecules.

On the one hand, our research aimed at the impact of DIC treatment on the rhizomes of a Lebanese species of *R. ribes* L. The evaluations were based on the contents of total phenolics (TPC) and flavonoids (TFC) as well as the antioxidant capacities of aqueous extracts of the treated rhizomes. The results showed a negative correlation between the saturated steam pressure applied and the values of TPC, TFC, and the antioxidant activities of the samples. However, DIC treatment time had no significant influence on the response variables. In addition to these two DIC operating factors (pressure and treatment time), the effect of the rhizomes water content (W) was also studied. The results showed that the increase of "W" does not lead to better yields of phenolic compounds.

On the other hand, this study presents the impact of DIC treatment on the biological activities (antibacterial and antiproliferative effects) of rhizome extracts. The results revealed that the aqueous extracts of DIC-treated rhizomes show weak antibacterial powers on *E. coli* and *S. aureus*, with slightly superior results in inhibiting the growth of *S. aureus*. Regarding the viability test of melanoma cancer cells, the results showed that the DIC treatment positively impacts the antiproliferative power of the treated samples compared with the untreated point (aqueous MP). In particular, two samples among those tested recorded an antiproliferative power of 60%.

The HPLC and UHPLC assays revealed the presence of three anthraquinones (emodin, chrysophanol, and physcion) in the rhizome extracts and about twenty compounds from the flavonoid family. However, the amounts of anthraquinones detected are not significantly higher in the extracts treated with DIC than in the untreated ones.

Finally, it was found that the total phenolic content of an aqueous sample treated with the optimal DIC parameters is equal to that of an untreated hydroalcoholic sample. Further experiments will be necessary to validate this result.

Keywords: *Rheum ribes* L., Instant Controlled Pressure Drop (DIC), polyphenols, flavonoids, antioxidant activities, glass transition temperature, antibacterial activities, antiproliferative activities, chromatographic assays.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	v
Abstract	vii
Liste des figures	xvii
Liste des tableaux	xxiii
Liste des abréviations et des nomenclatures	xxv
Introduction générale	1
Chapitre I Étude bibliographique	7
1. Introduction	8
2. Les polyphénols naturels	8
2.1. Présentation des polyphénols	8
2.2. Classification par structure des polyphénols.....	10
2.2.1. Flavonoïdes.....	10
2.2.1.1 Les flavonols	11
2.2.1.2 Les flavones.....	12
2.2.1.3 Les isoflavones.....	12
2.2.1.4 Les flavan-3-ols ou flavanols	12
2.2.1.5 Les flavanones.....	13
2.2.2. Non-flavonoïdes.....	13
2.2.2.1 Les acides phénoliques	13
2.2.2.2 Les stilbènes.....	14
2.2.2.3 Les anthraquinones.....	15
2.3. Les bioactivités des polyphénols	15
2.3.1. Flavonoïdes.....	16
2.3.1.1 Les flavonols	16

2.3.1.2 Les flavones.....	16
2.3.1.3 Les isoflavones.....	17
2.3.1.4 Les flavan-3-ols ou flavanols.....	17
2.3.1.5 Les flavanones.....	18
2.3.2. Les non-flavonoïdes.....	19
2.3.2.1 Les acides phénoliques.....	19
2.3.2.2 Les Stilbènes.....	20
2.3.2.3 Les Anthraquinones.....	20
3. Étude de la plante de <i>Rheum ribes</i> L.	21
3.1. Généralités sur l'espèce de <i>Rheum ribes</i> L.	21
3.1.1. Présentation botanique : Taxonomie et systématique végétale.....	21
3.1.2. Identification de l'espèce <i>Rheum ribes</i> L.	22
3.1.3. Habitat et répartition géographique de l'espèce <i>Rheum ribes</i> L.	22
3.1.4. Noms vernaculaires.....	23
3.2. La composition du <i>Rheum ribes</i> L.....	23
3.2.1. Composition non-phénolique.....	23
3.2.2. Composition phénolique.....	23
3.3. Propriétés pharmacothérapeutiques et usages ethnobotaniques des extraits des différentes parties de <i>Rheum ribes</i> L.	29
3.3.1. Effets antibactériens.....	29
3.3.2. Effets anticancéreux.....	40
3.3.3. Effet antioxydant.....	47
3.3.4. Autres effets thérapeutiques.....	55
4. La technologie de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC).....	56
5. Conclusion.....	57
Chapitre II Matériel et méthodes expérimentales.....	59
1. Introduction.....	60

2. Matériel	60
2.1. Matière première.....	60
2.1.1. Matière première de l'étude.....	60
2.1.2. Détermination botanique de la plante.....	60
2.1.3. Détermination de la teneur en eau initiale.....	60
2.1.4. Préparations préliminaires de la matière première.....	61
2.2. Réactifs, solvants et standards chimiques.....	62
2.2.1. Criblage phytochimique et activité antioxydante.....	62
2.2.2. Tests de sensibilité aux antimicrobiens.....	62
2.2.3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-UV) et ultra haute performance (UHPLC-MS).....	62
2.2.4. Culture cellulaire.....	62
3. Méthodes expérimentales	63
3.1. La technologie de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC).....	63
3.1.1. Présentation de l'équipement de la Détente Instantanée Contrôlée.....	63
3.1.2. Le principe de fonctionnement de la Détente Instantanée Contrôlée DIC... 64	64
3.2. La méthodologie des plans d'expériences.....	66
3.2.1. Plan d'expériences central composite.....	67
3.2.2. Outils analytiques et statistiques des plans d'expériences.....	68
3.2.2.1 Diagramme de Pareto pour les effets standards.....	68
3.2.2.2 Tracé des effets principaux.....	69
3.2.2.3 Méthode de surface de réponse.....	69
3.2.3. Plan d'expériences dans le traitement et l'extraction des molécules bioactives des rhizomes de <i>Rheum ribes</i> L.....	70
3.3. Les méthodes de caractérisation de la matière et évaluation de l'impact de la DIC.....	75
3.3.1. Étalonnage d'une solution aqueuse de rhizomes broyés de <i>R. ribes</i> L.....	75

3.3.2. Protocoles d'extractions de l'étude	76
3.3.2.1 Extraction aqueuse.....	76
3.3.2.2 Extraction alcoolique et hydroalcoolique	76
3.3.3. Détermination de la teneur totale en polyphénol (TPC).....	77
3.3.3.1 Principe de la méthode.....	77
3.3.3.2 Protocole adopté	77
3.3.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes (TFC)	78
3.3.4.1 Principe de la méthode.....	78
3.3.4.2 Protocole adopté	78
3.3.5. Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH	79
3.3.5.1 Principe de la méthode.....	79
3.3.5.2 Protocole adopté	80
3.3.6. Tests de sensibilité aux antimicrobiens	81
3.3.6.1 Choix des souches bactériennes.....	81
3.3.6.2 Méthode de macro-dilution en bouillon	81
3.3.6.3 Méthode de dilution en gélose.....	83
3.3.7. Analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-UV) ...	84
3.3.7.1 Appareillage et conditions chromatographiques	85
3.3.7.2 Choix des molécules ciblées.....	86
3.3.7.3 Préparation des solutions standards	86
3.3.7.4 Protocoles expérimentaux de l'HPLC.....	86
3.3.7.5 Protocole expérimental du dosage des molécules d'intérêt dans les extraits de <i>R. ribes</i> L.....	91
3.3.8. Analyses par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS)	92
3.3.8.1 Principe de la UHPLC.....	92
3.3.8.2 Principe de la MS.....	93

3.3.8.3 Description de l'appareillage utilisé.....	95
3.3.8.4 Préparation des solutions injectées.....	96
3.3.8.5 Conditions analytiques de l'UHPLC.....	97
3.3.8.1 Paramètre de détection de la MS	97
3.3.9. Culture cellulaire	98
Chapitre III Criblage phytochimique des deux premiers plans d'expériences	
101	
1. Le premier plan d'expériences (DoE 1) : un plan préliminaire.....	102
1.1. Rappel du dispositif expérimental.....	102
1.2. Criblage phytochimique et activité antioxydante	102
1.2.1. Teneur phénolique totale.....	102
1.2.2. Teneur totale en flavonoïdes	105
1.2.3. Activité antioxydante.....	107
2. Le deuxième plan d'expériences (DoE 2)	110
2.1. Rappel du dispositif expérimental.....	110
2.2. Criblage phytochimique et activité antioxydante	111
2.2.1. Teneur phénolique totale.....	111
2.2.2. Teneur totale en flavonoïdes	115
2.2.3. Activité antioxydante.....	117
2.3. Cinétique d'extraction des rhizomes traités et non traités (MP).....	120
3. Conclusion	121
Chapitre IV Le troisième plan d'expériences : un plan à trois paramètres	
opératoires 123	
1. Rappel du dispositif expérimental	124
2. Variation de l'humidité initiale de la matière première	124
2.1. Notion de la température de transition vitreuse	124

2.1. Traitement DIC : Positionnement par rapport à la courbe de la transition vitreuse	124
2.2. Détermination de la teneur en eau du matériel traité à chaque stade du traitement DIC.....	126
2.3. Estimation de la température de transition vitreuse des rhizomes de <i>Rheum ribes</i> L.	127
3. Criblage phytochimique et activité antioxydante	129
3.1. Teneur phénolique totale	129
3.2. Teneur totale en flavonoïdes.....	133
3.3. Activité antioxydante	137
4. Activité antimicrobienne des extraits de rhizomes de <i>R. ribes</i> L.....	143
4.1. Macro-dilution en bouillon	143
4.1.1. Macro-dilution en bouillon des extraits aqueux	143
4.1.1.1 Effet des extraits aqueux sur <i>S. aureus</i>	143
4.1.1.2 Effet des extraits aqueux sur <i>E. coli</i>	145
4.1.2. Macro-dilution en bouillon de l'extrait alcoolique	147
4.1.2.1 Effet sur <i>S. aureus</i> de l'extrait alcoolique.....	147
4.1.2.2 Effet sur <i>E. coli</i> de l'extrait alcoolique.....	149
4.2. Dilution en milieu gélosé	151
4.2.1. Résultats de la dilution en milieu gélosé des extraits aqueux	151
4.2.1.1 Effet sur <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	151
4.2.2. Résultats de la dilution en milieu gélosé des extraits alcooliques	151
4.2.2.1 Effet sur <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	151
5. Activité antiproliférative des extraits de <i>R. ribes</i> L.	153
6. Dosage des molécules intéressantes par HPLC.....	156
6.1. Effet de l'extraction alcoolique sur la composition des extraits.....	157
6.2. Séparation en phase liquide	158

6.3. Validation de la méthode HPLC-DAD.....	160
6.4. Dosage des anthraquinones dans les échantillons de <i>Rheum ribes</i> L.....	161
7. Screening d'un extrait de <i>R. ribes</i> L. par UHPLC.....	163
7.1. Injection du mélange de molécules ciblées	164
7.2. Injection de l'extrait MP aqueux.....	165
7.2.1. Détection des composés ciblés.....	165
7.2.2. Détection des composés non-ciblés	165
7.1. Injection de l'extrait MP aqueux filtré à travers une cartouche SPE C18	169
8. Conclusions	172
Chapitre V Quatrième plan d'expériences : un plan prospectif	175
1. Rappel du dispositif expérimental	176
2. Teneurs phénoliques totales des échantillons du DoE 4.....	176
3. Teneurs phénoliques totales des échantillons alcooliques et hydroalcooliques	179
4. Conclusion	181
Conclusions générales et perspectives	183
Références bibliographiques	187
Annexe.....	221

Liste des figures

Figure 1- Structure de base et système de numérotation des flavonoïdes.....	10
Figure 2- Structure de base et formules de quelques flavonols.....	11
Figure 3- Structure de base et formules de quelques flavones	12
Figure 4- Structure de base et formules de quelques isoflavones	12
Figure 5- Structure de base et formules de quelques flavan-3-ols	13
Figure 6- Structure de base des flavanones et la formule de la naringénine.....	13
Figure 7- Structures de bases et formules de quelques acides phénoliques	14
Figure 8- Structure de base des stilbènes, du cis- et trans-resvératrol	15
Figure 9- Structure de base et formules de quelques anthraquinones.....	15
Figure 10- Illustration botanique de la <i>Rheum ribes</i> L.	22
Figure 11- Les rhizomes de <i>R. ribes</i> L. coupés en des rondelles (A) et broyés en fine poudre (B).....	61
Figure 12- Schéma de la DIC	63
Figure 13- Les différentes étapes thermodynamiques d'un traitement DIC	64
Figure 14- Modification des caractéristiques structurales de la matière traitée par DIC	66
Figure 15- Représentation d'un plan central composite à deux variables.....	68
Figure 16- Diagramme de Pareto pour les effets standards.....	68
Figure 17- L'ensemble des réponses aux points du domaine d'étude qui forme la surface de réponse.....	69
Figure 18- Photo du panier métallique perforé de la DIC	75
Figure 19- Concentration en matières sèches (g/100mL) de la solution aqueuse de <i>R. ribes</i> L. en fonction de l'indice de réfraction (°Brix).....	76
Figure 20- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	78
Figure 21- Formation d'un complexe stable de flavonoïde et chlorure d'aluminium.....	78
Figure 22- Courbe d'étalonnage de la quercétine	79
Figure 23- Variation de l'activité de piégeage des radicaux libres de l'acide L-ascorbique en fonction de sa concentration.....	81
Figure 24- Etapes de la macro-dilution en bouillon	82
Figure 25- Étapes de la dilution en milieu gélosé.....	84
Figure 26- Schéma simplifié de la HPLC.....	85

Figure 27- Les spectres d'absorption des cinq anthraquinones recherchées	88
Figure 28- Les spectres d'absorption de la rhein et du physcion (A), de l'émodyne et l'aloé-émodyne (B), du chrysophanol (C), du kaempferol (D) et de la raphonticine (E)	90
Figure 29- Protocole de séparation en phase liquide des solutions brutes d'extrait de <i>R. ribes</i> L.	92
Figure 30- Schéma de la technique d'ionisation de type electrospray (ESI)	94
Figure 31- Schéma de l'appareillage ESI-Q-TOF	96
Figure 32- Système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF, présent sur la plateforme d'Analyse Haute Résolution de Biomolécules du laboratoire LIENSs	98
Figure 33- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE1)	104
Figure 34- Diagramme de Pareto pour les teneurs totales en polyphénols des échantillons du DOE1	105
Figure 35- Teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC	106
Figure 36- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 1.....	106
Figure 37- Valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC et pour l'acide ascorbique	108
Figure 38- Régressions simples de TFC vs IC50 (A) et de TPC vs IC50 (B).....	109
Figure 39- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les valeurs de IC50 des échantillons du DOE1.....	110
Figure 40- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE2)	114
Figure 41- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs phénoliques totales des échantillons du DOE 2	115
Figure 42- Teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC du DOE 2	116
Figure 43- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 2.....	117
Figure 44- Valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC du DOE 2	118

Figure 45- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les valeurs de IC50 des échantillons du DOE 2	119
Figure 46- Suivi de la teneur en matières solubles (°Brix) des solutions d'extraction des échantillons traités et non-traités par DIC sur une durée de 24 heures.....	121
Figure 47- La position du traitement DIC par rapport à la phase de transition vitreuse dans le cas idéal (A) et dans le cas contraire (B).....	125
Figure 48- La variation de la température de transitions vitreuse « T_g » des rhizomes en fonction de leur teneur en eau « W »	128
Figure 49- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3)	131
Figure 50- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs phénoliques totales des échantillons du DOE 3	132
Figure 51- Position des traitements DIC des échantillons 11 et 18 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de <i>R. ribes</i> L.....	132
Figure 52- Les teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3)	134
Figure 53- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 3	135
Figure 54- Position des traitements DIC des échantillons 14 et 21 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de <i>R. ribes</i> L.....	136
Figure 55- Position des traitements DIC des échantillons 8 et 20 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de <i>R. ribes</i> L.....	136
Figure 56- Les valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3).....	138
Figure 57- Régression simple entre les valeurs de TPC et IC50 des échantillons traités par DIC.....	139
Figure 58- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 3	140
Figure 59- Effet des extraits aqueux de rhizomes de <i>R. ribes</i> L. traités et non traités (MP aqueuse) par DIC sur la croissance de <i>S. aureus</i>	144

Figure 60- Effet des extraits aqueux de rhizomes de <i>R. ribes</i> L. traités et non traités (MP aqueuse) par DIC sur la croissance de <i>E. coli</i>	146
Figure 61- Effet de l'extrait alcoolique de rhizomes de <i>R. ribes</i> L. non traités par DIC sur la croissance des <i>S. aureus</i>	148
Figure 62- Culture des solutions d'éthanol pur (à gauche) et de l'extrait alcoolique (à droite) de différentes concentrations sur des géloses Mueller-Hinton	149
Figure 63- Effet de l'extrait alcoolique de rhizomes de <i>R. ribes</i> L. non traités par DIC sur la croissance de <i>E. coli</i>	150
Figure 64- Résultats de la dilution en milieu gélosé des extrait aqueux à une concentration de 16 mg/mL	151
Figure 65- Résultats de la dilution en milieu gélosé de l'extrait MP alcoolique (série supérieure) et de l'éthanol (série inférieure).....	152
Figure 66- (A) Photos microscopiques (x400) représentatives des cellules de mélanome A2058 traitées par des extraits de rhizomes de <i>R. ribes</i> L. traités et non traités (MP aqueuse et MP alcoolique) par DIC (100 µg/mL) et incubées pour une durée de 72 h à 37°C. (B) Les résultats du test MTT montrant les effets des extraits de rhizomes (100 µg/mL) traités et non traités (MP aqueuse et MP alcoolique) par DIC sur la viabilité des cellules de mélanome.....	153
Figure 67- Position des traitements DIC des échantillons 6, 15 et 20 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de <i>R. ribes</i> L.....	155
Figure 68- Chromatogrammes enregistrés des diverses molécules standards.....	156
Figure 69- Chromatogrammes d'un mélange des sept molécules standards (en bleu) et d'un échantillon aqueux de <i>Rheum ribes</i> L. (en rouge).....	157
Figure 70- Superposition des chromatogrammes de MP aqueuse (en rouge) et MP alcoolique (en bleu).....	158
Figure 71- Superposition des chromatogrammes du mélange de standards (en bleu), de la fraction hexanique (en vert) et de la fraction aqueuse (en rouge) suite à 3 cycles de lavage	159
Figure 72- Superposition des chromatogrammes du mélange de standards (en bleu), de la fraction hexanique (en rouge) et de la fraction aqueuse (en vert) suite à 5 cycles de lavage	160

Figure 73- Les chromatogrammes des extraits de rhizomes testés montrant des pics correspondant à l'aloé émodine (1), l'émodine (2), le chrysophanol (3) et le physcion (4)	161
Figure 74- Les teneurs en quatre anthraquinones des extraits traités et non traités par DIC (MP aqueuse et alcoolique).....	163
Figure 75- Chromatogramme obtenu à partir du mélange de standards	164
Figure 76- Chromatogramme complet de l'extrait MP aqueux obtenue en polarité positive et l'extraction des rapports m/z de trois des molécules recherchées	167
Figure 77- Extraction des rapports m/z de trois des molécules recherchées dans l'extrait MP aqueux après une double élution dans une SPE C18	170
Figure 78- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE4)	177
Figure 79- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les valeurs de TPC des échantillons du DOE4	178
Figure 80- Teneurs phénoliques totales des échantillons 11 et MP suite à des extractions aqueuses, alcooliques et hydroalcooliques	179
Figure 81- Courbes d'étalonnage des molécules standards d'émodine (A), d'aloé-émodine (B), de chrysophanol (C) et de physcion (D)	223

Liste des tableaux

Tableau 1- Structure basique des principaux composés phénoliques et polyphénoliques	9
Tableau 2- Squelettes des principales sous-classes des flavonoïdes	11
Tableau 3- Composition non-phénolique du <i>Rheum ribes</i> L.	25
Tableau 4- Composition phénolique du <i>Rheum ribes</i> L.....	26
Tableau 5- Etudes sur les activités antibactériennes des différentes parties du <i>Rheum ribes</i> L.....	32
Tableau 6- Etudes sur les activités anticancéreuses des différentes parties du <i>Rheum ribes</i> L.....	42
Tableau 7- Etudes sur les activités antioxydantes des différentes parties du <i>Rheum ribes</i> L.....	49
Tableau 8- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 1.....	71
Tableau 9- Les essais expérimentaux du DoE 1.....	71
Tableau 10- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 2.....	72
Tableau 11- Les essais expérimentaux du DoE 2.....	72
Tableau 12- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 3.....	73
Tableau 13- Les essais expérimentaux du DoE 3.....	73
Tableau 14- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 4.....	74
Tableau 15- Les essais expérimentaux du DoE 4.....	74
Tableau 16- Programme du gradient d'élution du protocole 1.....	87
Tableau 17- Programme du gradient d'élution du protocole 2.....	88
Tableau 18- Programme du gradient d'élution du protocole 3.....	89
Tableau 19- Programme du gradient d'élution de la UHPLC	97
Tableau 20- Conditions expérimentales des différents essais du DoE1 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP) par DIC.....	103
Tableau 21- Conditions expérimentales des différents essais du DoE2 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP) par DIC.....	113

Tableau 22- Conditions expérimentales des différents essais du DoE 3 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP alcoolique et MP aqueuse) par DIC	142
Tableau 23- Données des régressions linéaires des molécules standards aux longueurs d'ondes optimales	161
Tableau 24- Tableau montrant la formule brute, le rapport m/z et le temps de rétention des composés ciblés	164
Tableau 25- Composés non ciblés détectés dans l'extrait MP aqueux en polarité positive	168
Tableau 26- Composés non ciblés détectés dans l'extrait MP aqueux en polarité positive après une double élution dans une SPE C.....	171
Tableau 27- Conditions expérimentales des différents essais du DoE4 avec le contenu phénolique total (TPC) des extraits traités et non traités (MP) par DIC	177
Tableau 28- Teneurs phénoliques totales de l'échantillon 11 macéré dans une solution hydroalcoolique EtOH : H ₂ O « 11 hydroalcoolique » et dans de l'éthanol pur « 11 alcoolique »	180
Tableau 29- Tableau présentant les molécules suspectées détectées dans l'échantillon MP aqueux par UHPLC-MS.....	225

Liste des abréviations et des nomenclatures

DIC	Détente Instantanée Contrôlée	-
DoE	Plan d'expériences	-
RSM	Méthodologie de Surface de Réponse	-
ANOVA	Analyse de la Variance	-
P	Pression de vapeur saturée	kPa
t	Temps de traitement	s
T	Température	°C
Y	Variable réponse mesurée	-
X	Facteur (variable opératoire)	-
$\beta_i, \beta_j, \beta_{ij}$	Coefficients de régression	-
i et j	Indices de facteurs	-
ε	Erreur aléatoire	-
k	Nombre de paramètres opératoires	-
$-\alpha, +\alpha$	Distances axiales	-
R^2	Coefficient de régression	-
R	Coefficient de corrélation	-
MS	Matière sèche ou db pour dry basis	-
m_{ms}	Masse de la fraction sèche	g
m_e	Masse de la fraction aqueuse	g
MP	Matière première	-
TPC	Teneur totale en phénols	mg EAG/ g extrait
EAG	Équivalente nt acide gallique	-
ER	Équivalent Rutine	-
TFC	Teneur totale en flavonoïdes	mg EQ/g extrait
EQ	Équivalent quercétine	-
CI50 ou IC50	Concentration de l'extrait provoquant 50% d'inhibition d'un processus chimique ou biologique	$\mu\text{g}/\text{mL}$

Liste des abréviations et des nomenclatures

Abs	Absorbance ou densité optique d'une solution	-
λ	Longueur d'onde d'absorption	nm
U	Ultrasons	-
S	Soxhlet	-
M	Macération	-
O	Agitateur orbital	-
EtOH	Ethanol	-
MeOH	Méthanol	-
ACN	Acétonitrile	-
ATCC	American type culture collection	-
PTCC	Persian type culture collection	-
UFC	Unité formant colonie	-
CMI	Concentration minimale inhibitrice	$\mu\text{g/mL}$
CMB	Concentration minimale bactéricide	$\mu\text{g/mL}$
BMH	Bouillon de Mueller-Hinton	-
GMH	Gélose de Mueller-Hinton	-
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance	-
UV	Ultra-violet	-
DAD	Détecteur à barrette de diodes	-
UHPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Ultra Haute Performance	-
MS	Spectrométrie de masse	-
rpm	Rotation par minute	-
ESI	Ionisation par électronébuliseur	-
Q	Quadripôle	-
TOF	Temps de vol	-
t_r	Temps de rétention	min
SPE	Extraction en Phase Solide	-
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	-

Liste des abréviations et des nomenclatures

XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium	-
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	-
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	-
DPPH•	Radicaux du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	-
ABTS+•	Radicaux du 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)	-
OH•	Radicaux hydroxyles	-
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	-
FBS	Sérum de veau fœtal	-
IC	Inhibition de la croissance	%
T _g	Température de transition vitreuse	K
W	Teneur en eau initiale	g H ₂ O/g MS
W'	Teneur en eau de la matière après l'injection de vapeur	g H ₂ O/g MS
W''	Teneur en eau après la chute de pression	g H ₂ O/g MS
C _{p(s)}	Chaleur spécifique du solide	J.kg ⁻¹ .K ⁻¹
C _{p(eau)}	Chaleur spécifique de l'eau	J.kg ⁻¹ .K ⁻¹
h	Coefficient de transfert thermique	W.m ⁻² .K ⁻¹
L	Chaleur latente de vaporisation ou de condensation de l'eau	J.kg ⁻¹
T _i	Température initiale de la matière	K
T _t	Température du traitement	K
T _e	Température de la matière à l'équilibre	K
SEM	Erreur Standard de la Moyenne	-
%m	Pourcentage massique	%

Introduction générale

À travers les âges, l'homme s'est appuyé sur la nature pour satisfaire ses besoins fondamentaux en matière de production de denrées alimentaires, d'abris, de vêtements, et, surtout, de médicaments. Les plantes sont à la base des systèmes sophistiqués de la médecine traditionnelle qui existent depuis des milliers d'années et qui continuent à fournir à l'humanité de nouveaux remèdes. En effet, la thérapie par les plantes médicinales repose sur les découvertes empiriques de centaines et de milliers d'années (Gurib-Fakim, 2006).

De nos jours, la grande majorité des habitants de la planète se base encore sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins quotidiens en matière de santé. Il est également avéré qu'un quart de toutes les prescriptions médicales sont des formulations incluant des substances à base de plantes ou d'analogues synthétiques dérivés de plantes (Salmerón-Manzano et al., 2020). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80 % de la population mondiale, principalement celle des pays en développement, dépendent de médicaments dérivés de plantes pour leurs soins de santé (Hishe et al., 2016).

Les populations qui utilisent des remèdes traditionnels ne comprennent peut-être pas le raisonnement scientifique qui sous-tend leurs médicaments, mais elles savent par expérience personnelle que certaines plantes médicinales peuvent être très efficaces si elles sont utilisées à des doses thérapeutiques (Gurib-Fakim, 2006). Comme nous comprenons mieux aujourd'hui le fonctionnement de l'organisme, nous sommes donc mieux à même de comprendre les pouvoirs de guérison des plantes et leur potentiel en tant qu'entités chimiques multifonctionnelles pour le traitement de problèmes de santé complexes.

Les plantes médicinales contiennent généralement des mélanges de différents composés chimiques qui peuvent agir individuellement, de manière additive ou en synergie, pour améliorer la santé (Vaou et al., 2022). Par exemple, les polyphénols naturels, connus aussi comme métabolites secondaires, font partie des composés chimiques ayant un potentiel thérapeutique.

Depuis quelques décennies, les études portant sur les composés phénoliques provenant d'espèces végétales médicinales ont considérablement augmenté. Ce constat s'explique par les nombreux avantages de ces composés pour la santé humaine, mais aussi en raison

de leurs efficacités en tant qu'agents antioxydants, anticancéreux, antibactériens, anti-inflammatoires, etc. (Tungmunnithum et al., 2018).

Rheum ribes L. est une plante sauvage de la famille des Polygonacées qui pousse dans les sous-régions d'Asie (Iran, Turquie et Liban), entre 1000 et 4000 mètres d'altitude sur des roches de dunite et entre les pierres (Demiray et al., 2022; Öztürk et al., 2007). La médecine traditionnelle accorde un grand intérêt à la plante de *Rheum ribes* L., en particulier à sa partie souterraine, en raison de son potentiel thérapeutique dans le traitement du diabète (Adham and Naqishbandi, 2015; Meydan et al., 2022; Ozbek et al., 2004; Raafat et al., 2014), de l'hypertension, des hémorroïdes, de l'obésité, de la diarrhée, des ulcères gastriques, de la toux et du psoriasis (Babak et al., 2012). Par ailleurs, diverses études ont reporté la détection de molécules phénoliques telles que les anthraquinones (Abdulla et al., 2014; Çınar Ayan et al., 2021; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003), les tannins (Abdulla et al., 2014) et les flavonoïdes (Abdulla et al., 2014; Çınar Ayan et al., 2021; Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003) dans les extraits des différentes parties de *R. ribes* L.. En effet, ces molécules sont les contributeurs aux pouvoirs antioxydants, antibactériens et antiprolifératifs caractéristiques de cette plante.

Au niveau national, les libanais ont adopté la consommation de décoctions aqueuses de rhizomes de *R. ribes*, puisqu'ils considèrent, depuis des décennies, que cette préparation possède des effets bénéfiques pour la santé, et qu'elle présente un pouvoir hypoglycémiant. Cette dernière propriété a été véritablement démontrée par les recherches scientifiques, en addition aux effets thérapeutiques déjà reportés, d'où l'importance de favoriser l'étude de l'extraction des molécules bioactives des rhizomes de *R. ribes* L. tout en respectant, autant que possible, la méthode traditionnelle locale. Or les rhizomes, comme la majorité des matrices végétales, présentent naturellement des structures rigides et compactes. Cette compacité est, par conséquent, le facteur limitant la diffusion des solvants vers l'intérieur du matériel végétal lors de l'extraction (Ranjbar et al., 2016) et du mélange solvant-molécules depuis le cœur de la matrice vers l'extérieur. En réponse à cette problématique, des modifications de la structure cellulaire rigide semblent alors nécessaires.

La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) est un traitement haute température de courte durée (**High-Temperature/Short-Time**), suivi d'une chute de pression brutale

($\Delta P/\Delta t > 500 \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}$) vers un vide (environ 5 kPa). Des études antérieures ont montré que la technologie DIC est capable d'intensifier le processus d'extraction en raison de l'expansion des tissus végétaux générée, qui réduit ainsi la résistance au transfert de masse (Allaf *et al.*, 2014). Lorsqu'il est appliqué aux plantes, le traitement par DIC accroît le potentiel antioxydant en augmentant la disponibilité des composés phénoliques. Ce comportement a été constaté dans le cas des fraises (Alonzo-Macías *et al.*, 2013), des pelures de grenade (Ranjbar *et al.*, 2016) et de nombreuses autres matrices végétales.

Dans le cadre de notre étude, les rhizomes d'une espèce libanaise de *R. ribes* L. ont été traités par la technologie DIC, selon la méthodologie des plans d'expériences et en réponse aux objectifs suivants :

- Étudier l'effet du traitement par DIC sur les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et sur les activités antioxydantes des extraits aqueux de rhizomes suivi par le choix des échantillons les plus prometteurs pour l'étude des activités biologiques.
- Évaluer l'effet du traitement par DIC sur le pouvoir antibactérien des extraits de rhizomes sur *E. coli* et *S. aureus*.
- Étudier l'effet du traitement par DIC sur le pouvoir antiprolifératif des extraits de rhizomes sur les cellules cancéreuses du mélanome.
- Comparer la teneur de quelques échantillons de rhizomes traités et non-traités par DIC en sept polyphénols, suivant un dosage chromatographique par HPLC.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés aux seins du Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE, France) et de la Plateforme de Recherches et d'Analyses en Sciences de l'Environnement (PRASE, Liban). Ils ont été co-financés dans le cadre de deux demi-bourses complémentaires, l'une accordée par l'Ambassade de France au Liban (programme SAFAR, Campus France) et l'autre par l'Université Libanaise.

Le document est composé de 5 chapitres.

Le **premier chapitre** introduit les éléments bibliographiques indispensables à la compréhension du document. Un état de l'art sur la plante de *Rheum ribes* L., en particulier sa classification botanique, sa composition non-phénolique et phénolique, et ses diverses

activités thérapeutiques, ont été détaillées. Ce chapitre présente également la capacité de la technologie de DIC, en tant qu'un process innovant de texturation, dans divers domaines d'activités.

Le **deuxième chapitre** décrit les dispositifs et les méthodes expérimentaux de l'étude, comprenant les étapes de préparation des divers extraits de rhizomes, le traitement par la technologie DIC, les méthodes du criblage photochimique des extraits, l'appareillage de détection et de quantification (HPLC-UV et UHPLC-MS) des molécules d'intérêt, ainsi que les protocoles expérimentaux adoptés pour l'évaluation des activités biologiques des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. En outre, ce chapitre présente une explication détaillée des plans d'expériences et des méthodes statistiques utilisées pour le traitement des résultats.

Dans le **troisième chapitre**, nous présentons les résultats (TPC, TFC et activité antioxydantes) des deux premiers plans d'expériences effectués dans notre étude. A la lumière des résultats du premier plan d'expériences (DoE1), l'état de la matière traitée et les paramètres expérimentaux du traitement DIC ont été optimisés dans le deuxième plan d'expériences (DoE2). Ainsi, nous avons décidé de broyer les rhizomes et d'appliquer des pressions de vapeur saturée moins élevées que celle adoptées dans le premier plan d'expériences. Enfin, un suivi de la teneur en matières solubles (exprimée en °Brix) des solutions d'extraction des échantillons traités et non-traités par DIC a été présenté.

Dans le **quatrième chapitre**, à l'aide d'un troisième plan d'expériences (DoE3), nous avons étudié l'impact de la variation de la teneur en eau (« W ») des rhizomes, en complément des deux paramètres expérimentaux de la DIC (« P » et « t »). Dans ce chapitre, nous avons déterminé les activités antibactériennes (contre la croissance de *S. aureus* et *E. coli*) et antiprolifératives (test de viabilité des cellules cancéreuses du mélanome humain) de certains échantillons (DIC6, DIC 15, DIC20, DIC22, matière première extraite par voie aqueuse (MP aqueuse) et matière première extraite par voie alcoolique (MP alcoolique). Sept molécules appartenant à la famille des polyphénols ont été également recherchées dans ces échantillons par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Enfin, un « screening » de l'extrait MP aqueux par UHPLC-MS a été réalisé.

Le **cinquième chapitre** présente les résultats du quatrième plan d'expériences adopté (DoE4). Là, avec une constante de teneur en eau (0,45 gH₂O/g MS), les paramètres

expérimentaux optimaux de la DIC issus des précédents plans d'expériences ont été adoptés. Par la suite, le dosage des polyphénols totaux des échantillons du DoE4, a conduit au meilleur point des extractions alcooliques et hydroalcooliques. Finalement, une comparaison des teneurs phénoliques des extraits provenant d'extractions alcoolique et hydroalcoolique a été établie.

Chapitre I
Étude bibliographique

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons les éléments bibliographiques nécessaires à la compréhension des travaux de recherche réalisés. En effet, l'objectif principal de notre étude était d'optimiser l'extraction des molécules bioactives provenant des rhizomes de *R. ribes* L. suite à leur traitement par la Détente Instantanée Contrôlée (DIC). Les évaluations des activités biologiques des rhizomes traités et non traités par DIC d'une part, et préparés dans divers solvants d'extraction d'autre part, ont été également visées.

Nous nous intéresserons plus particulièrement dans cette partie aux études qui ont élargi le spectre de connaissance sur les polyphénols et leurs sous-groupes, surtout ceux qui ont été déjà détectés dans les rhizomes de *R. ribes* L., ainsi que sur les activités antioxydantes, antibactériennes et anticancéreuses des divers types de molécules.

Finalement, la potentialité de la technologie de DIC, en tant qu'un process innovant de texturation, dans divers domaines d'activités a été brièvement présentée.

2. Les polyphénols naturels

2.1. Présentation des polyphénols

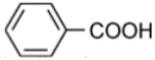
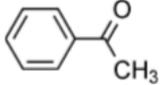
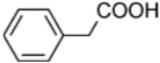
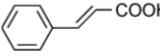
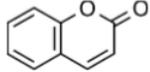
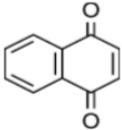
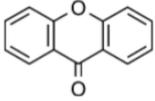
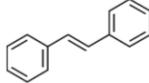
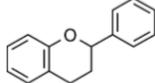
Les polyphénols sont des molécules abondamment présentes dans le règne végétal. Ils sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Le rôle principal des polyphénols est d'assurer un système de défense pour les plantes, tel que la protection contre les rayons UV (Harborne and Williams, 2000).

Chimiquement parlant, les polyphénols forment un groupe de composés naturels de caractéristiques structurales phénoliques (**Tableau 1**). Cependant, l'utilisation du terme "polyphénols" a été quelque peu ambiguë (Tsao, 2010). La communauté scientifique n'est pas en accord avec l'utilisation universelle d'un terme désignant les polyphénols végétaux, puisque certains les appellent "phénols végétaux" alors que d'autres utilisent le terme "polyphénols" (Belščak-Cvitanović et al., 2018). Selon Quideau et al., (2011), l'utilisation du terme "polyphénols" est toujours préférée principalement pour les communications commerciales. Au sens chimique strict, le terme "phénols" inclut un cycle benzénique et une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Selon ce concept, le terme "polyphénol" devrait être limité aux structures portant au moins deux fractions

phénoliques, indépendamment du nombre de fonctions hydroxyle qu'elles portent chacune (Quideau et al., 2011).

Les groupes phénoliques donnent aux polyphénols la capacité de réduire les radicaux libres et divers substrats organiques et minéraux. Ces propriétés redox expliquent l'intérêt considérable de leur utilisation dans la prévention contre plusieurs maladies chroniques associées au stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète de type II et l'ostéoporose (Scalbert et al., 2005).

Tableau 1- Structure basique des principaux composés phénoliques et polyphénoliques (Crozier et al., 2009)

Squelette	Classification	Structure basique
C6-C1	Acides phénoliques	
C6-C2	Acétophénonnes	
C6-C2	Acides phénylacétiques	
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	
C6-C3	Coumarines	
C6-C4	Naphtoquinones	
C6-C1-C6	Xanthones	
C6-C2-C6	Anthraquinones	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	

2.2. Classification par structure des polyphénols

Il est courant d'utiliser une classification simplifiée qui divise les composés phénoliques en deux groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Crozier et al., 2009). Vu leur grand nombre, seuls les polyphénols déjà détectés dans les extraits de *Rheum ribes* L. ont été cités dans cette partie.

2.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants du règne végétal (Pérez-Jiménez et al., 2010). Comme le montre la **Figure 1**, tous les flavonoïdes partagent la même structure de base des diphenyl-propanes (C6-C3-C6) dans lesquels les cycles phénoliques (cycle A et cycle B) sont généralement liés par un noyau hétérocyclique (cycle C) (Crozier et al., 2009).

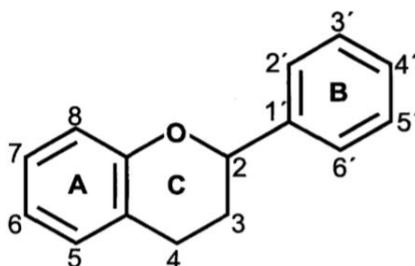
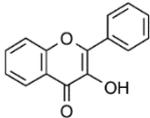
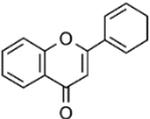
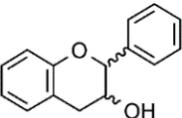
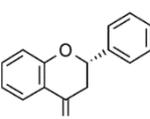
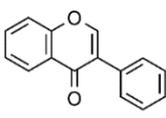


Figure 1- Structure de base et système de numérotation des flavonoïdes
(Bravo, 1998)

Les principales sous-classes de flavonoïdes sont les flavonols, flavones, flavan-3-ols (ou flavanol), flavanones et les isoflavones **Tableau 2**. Il existe également d'autres sous-classes secondaires et qui sont moins répandues dans la nature.

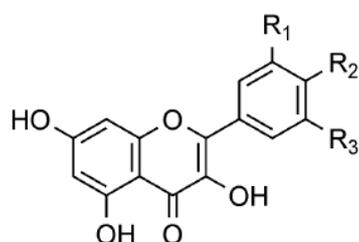
Cette diversité de molécules est le résultat de nombreuses substitutions que subit le squelette de base des flavonoïdes, à titre d'exemple la substitution par des sucres. D'ailleurs la majorité des flavonoïdes existent naturellement sous forme de glycosides dont la solubilité dans l'eau est relativement supérieure à celle des flavonoïdes non substitués (Crozier et al., 2009).

Tableau 2- Squelettes des principales sous-classes des flavonoïdes

Composé	Squelette
Flavonols	
Flavones	
Flavan-3-ols	
Flavanones	
Isoflavones	

2.2.1.1 Les flavonols

Les flavonols sont la sous-classe la plus répandue de la famille des flavonoïdes, ils existent dans tout le règne végétal à l'exception des algues et des champignons (**Figure 2**). Les variations structurales des flavonols sont importantes et sont bien documentées (Mata, 2007). Les principaux flavonols sont le kaempferol, la quercétine et la myricétine, qui se trouvent le plus souvent sous forme de O-glycosides (Crozier et al., 2009). Il est intéressant de noter que le kaempferol et la quercétine peuvent exister sous plus de 340 et 270 formes glycosidiques respectivement (Tsao, 2010).

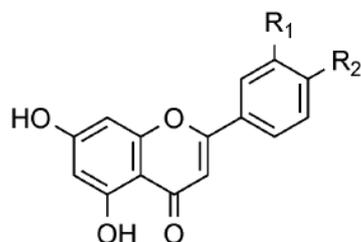


Composé	R1	R2	R3
Kaempférol	H	OH	H
Quercétine	OH	OH	H
Myricétine	OH	OH	OH

Figure 2- Structure de base et formules de quelques flavonols (Crozier et al., 2009)

2.2.1.2 Les flavones

Les flavones ne sont pas très répandues, mais quand même existent dans le céleri, le persil et certaines herbes. (Crozier et al., 2009). Les flavones les plus importants sont la lutéoline et l'apigénine (Singla et al., 2019) (**Figure 3**).

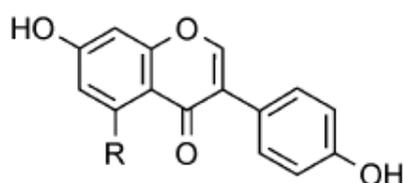


Composé	R1	R2
Apigénine	H	OH
Lutéoline	OH	OH

Figure 3- Structure de base et formules de quelques flavones (Crozier et al., 2009)

2.2.1.3 Les isoflavones

Les isoflavones sont présentes presque exclusivement dans les légumineuses, les concentrations les plus élevées se trouvant dans le soja. La daidzéine et la génistéine, deux dérivés d'isoflavone, également nommées phytoœstrogènes (**Figure 4**), présentent une activité œstrogénique capable d'affecter la reproduction des animaux de pâturage tels que les vaches et les brebis (Mennen et al., 2005).

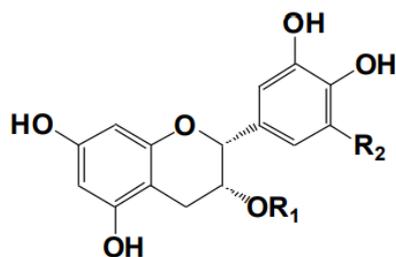


Composé	R
Daidzéine	H
Génistéine	OH

Figure 4- Structure de base et formules de quelques isoflavones (Crozier et al., 2009)

2.2.1.4 Les flavan-3-ols ou flavanols

Les flavanols se présentent dans la nature sous forme de monomères, appelés catéchines et épicatechines, et sous forme de polymères, appelés tanins (Singla et al., 2019) (**Figure 5**). Les tanins, que l'on trouve dans des complexes avec des alcaloïdes, des polysaccharides et des protéines, peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et tanins condensés (appelés aussi proanthocyanidines) (Singla et al., 2019).

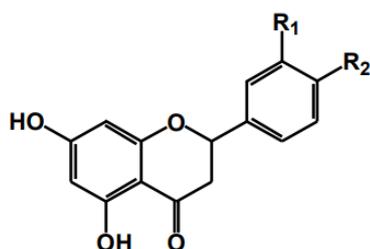


Composé	R ₁	R ₂
Epicatechine	H	H
Epigallocatechin	H	OH
Catéchine	H	H

Figure 5- Structure de base et formules de quelques flavan-3-ols
(Crozier et al., 2009; Nishiumi et al., 2011; Tsao, 2010)

2.2.1.5 Les flavanones

Les flavanones sont présentes dans les tomates et certaines plantes aromatiques comme la menthe mais elles ne sont présentes en forte concentration que dans les agrumes. La naringénine (**Figure 6**) est l'une des principales flavanones présente abondamment dans le pamplemousse. (Belščak-Cvitanović et al., 2018).



Composé	R ₁	R ₂
Naringénine	H	OH

Figure 6- Structure de base des flavanones et la formule de la naringénine
(Crozier et al., 2009)

2.2.2. Non-flavonoïdes

La structure de base des non-flavonoïdes comporte un ou plusieurs cycles aromatiques portant un ou plusieurs groupement hydroxyyles. Cette classe de polyphénols comprend les acides phénoliques, les stilbènes et les anthraquinones (Singla et al., 2019).

2.2.2.1 Les acides phénoliques

Il existe deux squelettes distincts d'acides phénoliques : les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques (Singla et al., 2019) (**Figure 7**).

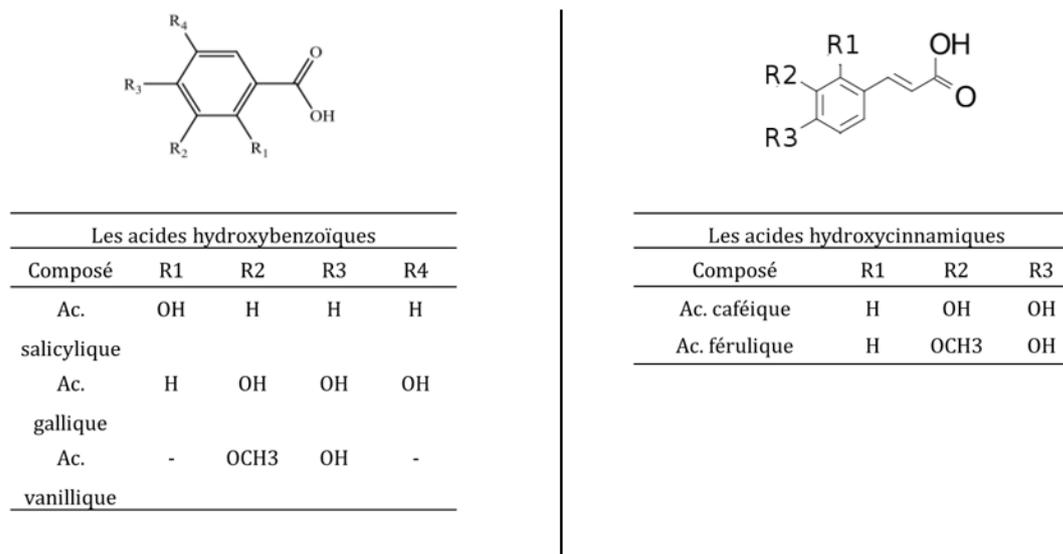


Figure 7- Structures de bases et formules de quelques acides phénoliques (Hmid, 2013; Tsao, 2010)

Les acides phénoliques sont parmi les composés phénoliques les plus répandus et qui se présentent sous des formes libres et conjuguées. Ils sont répandus dans plusieurs groupes d'aliments et sont abondants dans les céréales, les légumineuses, les graines oléagineuses, les fruits, les légumes et les herbes.

2.2.2.2 Les stilbènes

Les stilbènes sont des phytoalexines produites par les plantes en réponse à une maladie, à une blessure ou à un stress (Langcake and Pryce, 1977). L'un des stilbènes les plus connus est le resvératrol (3,5,4-trihydroxystilbène) provenant du vin rouge et des arachides (Balasundram et al., 2006), avec des quantités moindres dans les baies, le chou rouge, les épinards et certaines herbes. Le resvératrol existe dans la nature sous forme d'isomères cis et trans (Grippi et al., 2008) (**Figure 8**).

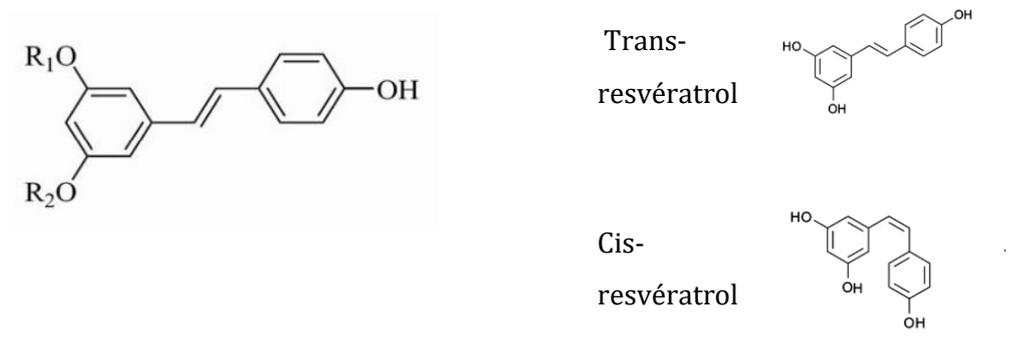
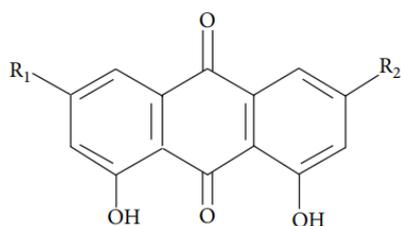


Figure 8- Structure de base des stilbènes, du cis- et trans-resvératrol (Dai and Mumper, 2010; Singla et al., 2019)

2.2.2.3 Les anthraquinones

Les anthraquinones constituent le plus grand groupe de pigments naturels, avec environ 700 composés décrits (**Figure 9**).



Composé	R1	R2
Emodine	CH ₃	OH
Aloe-émودية	CH ₂ OH	H
Rhein	COOH	H
Physcion	CH ₃	OCH ₃
Chrysophanol	CH ₃	H

Figure 9- Structure de base et formules de quelques anthraquinones (Ben Ghezala et al., 2015; Diaz-Muñoz et al., 2018)

Environ 200 d'entre eux ont été isolés à partir de plantes, tandis que les autres ont été isolés à partir de lichens et de champignons (Duval et al., 2016). Ces composés sont abondamment présents dans les aliments comme les pois, le chou, la laitue et les haricots, etc. (Diaz-Muñoz et al., 2018).

2.3. Les bioactivités des polyphénols

Les objectifs principaux de l'étude ont été d'évaluer l'effet du traitement par DIC sur les activités antioxydantes, antibactériennes et antiprolifératives des extraits de rhizomes de *Rheum ribes* L., en les comparant avec les extraits non-traités. Or, la littérature a largement

discuté le rôle des polyphénols dans les activités antioxydantes et biologiques des extraits de plantes (Shahidi and Yeo, 2018). Il a donc été intéressant d'avoir une idée des bioactivités déjà attribuées aux molécules détectées dans les extraits de *R. ribes* L.

2.3.1. Flavonoïdes

2.3.1.1 Les flavonols

Les flavonols constituent l'une des classes les plus prometteuses de composés bioactifs appartenant à la vaste famille des flavonoïdes (Barreca et al., 2021). Diverses études ont montré que les flavonols présentent une activité anticancéreuse par inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses en induisant leur apoptose ainsi qu'en inhibant l'angiogénèse (Lea, 2015).

Les effets anticancéreux de la myricétine, un flavonol, ont été démontrés sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses : le cancer du sein (lignée MCF-7) (Loizzo et al., 2009; Rodgers and Grant, 1998), le cancer cervical (lignée HeLa) (Mori et al., 1988), le cancer du côlon (lignées HCT116, COLO 205, COLO 320HSR, COLO 320DM, HT 29 et COLO 205-X) (Ko et al., 2005; Shiomi et al., 2013), le cancer de l'utérus (lignée RL95-2) (Master et al., 2012), la leucémie (HL-60) (Chang et al., 2007; Morales and Haza, 2012), et le cancer de la prostate (lignées LNCaP et 22Rv1) (Chaudhary and Willett, 2006; Loizzo et al., 2009).

En plus de ses activités cytotoxiques, la myricétine a prouvé son efficacité comme étant un agent antioxydant (Gendaram et al., 2011; Qu et al., 2006; Sim et al., 2007) et antibactérien. En effet, à une concentration de 0,5 mg/mL, la myricétine a produit des zones d'inhibition significatives contre divers bactéries à Gram positif et négatif (notamment *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumonia*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumonia*, etc...) (Naz et al., 2007).

2.3.1.2 Les flavones

Il a été démontré que les flavones naturelles présentent plusieurs activités biologiques, notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, antitumorales, antiallergiques, neuroprotectrices, cardioprotectrices et antimicrobiennes (Verma and Pratap, 2010). Les propriétés antioxydantes des flavones leur permettent d'être des agents de prévention et d'atténuation du stress oxydatif, une condition biologique étroitement associée à plusieurs maladies (D Catarino et al., 2015).

Imran et al., (2020), ont fait le point sur l'activité anticancéreuse de l'apigénine, une flavone. En raison de l'efficacité de l'apigénine dans l'inhibition de la croissance cellulaire de différentes lignées de cancers humains, à savoir les cellules cancéreuses de la leucémie (IC₅₀ = 50 nM) (Wang et al., 1999) et de la peau (IC₅₀ = 1,5 μM) (Caltagirone et al., 2000), elle est utilisée dans la prévention et la thérapie du cancer (Zhu et al., 2013).

Le potentiel antibactérien de l'apigénine a été testé contre de nombreuses espèces de bactéries et diverses souches au sein d'une même espèce (Wang et al., 2019). Par exemple, cette molécule a efficacement inhibé la croissance bactérienne de chacune des bactéries *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Acinetobacter baumannii* (RSKK 02026), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (RSKK 574), *Proteus mirabilis* (ATCC 7022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et les souches cliniques qui en correspondent (Özçelik et al., 2011).

2.3.1.3 Les isoflavones

Les isoflavones, principalement la daidzéine et la génistéine, peuvent être utilisés comme thérapie alternative pour un large éventail de troubles hormonaux, y compris l'ostéoporose et les symptômes de la ménopause (Křížová et al., 2019), ainsi que plusieurs types de cancer, à savoir le cancer du sein (Messina and Hilakivi-Clarke, 2009; Shu et al., 2009) et le cancer de la prostate (Messina et al., 2006).

Les isoflavones ont également des effets antioxydants (Kurzer and Xu, 1997). En effet, la génistéine et la daidzéine sont des antioxydants plus puissants que la vitamine C et la quercétine (Rüfer and Kulling, 2006).

Dans une étude de Dastidar et al. (2004), divers isoflavones, y compris la daidzéine et la génistéine, ont été testés pour leur éventuelle propriété antimicrobienne contre douze bactéries Gram positives et Gram négatives. La daidzéine n'a pas montré une activité antimicrobienne tandis que la génistéine a eu un effet antimicrobien modéré.

2.3.1.4 Les flavan-3-ols ou flavanols

Les flavan-3-ols présentent plusieurs effets bénéfiques pour la santé humaine à travers ses actions antioxydantes, anticancérigènes, cardio-préventives, antimicrobiennes, antivirales et neuroprotectrices (Aron and Kennedy, 2008).

En effet, plusieurs mécanismes d'action donnent à ce type de polyphénol le pouvoir antioxydant, notamment le piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux de transition (Cos et al., 2004). Grâce à leur configuration électronique, les flavan-3-ols libèrent facilement des électrons vers les espèces portant des radicaux libres extrêmement nocifs pour la santé. Suite à la libération d'électrons, le radical libre sera transféré au flavan-3-ol qui généralement est plus stable et moins nocif que l'espèce radicalaire initiale (Havsteen, 2002; Kitao et al., 2006).

Il a été démontré que la catéchine, un flavan-3-ol, possède un certain nombre d'effets bactéricides prometteurs sur les bactéries Gram positives et Gram négatives, y compris les souches résistantes aux médicaments (Wu and Brown, 2021). En effet, la catéchine a inhibé la croissance de *P. aeruginosa* et d'*E.coli* (Jeon et al., 2014) et de *S.mutans* (Bai et al., 2016). Cependant, et malgré ses nombreuses propriétés bénéfiques, la catéchine est confrontée à de nombreux défis dans son développement en tant qu'agent thérapeutique, notamment une mauvaise absorption au niveau de l'intestin, une faible biodisponibilité et une dégradation rapide (Wu and Brown, 2021).

2.3.1.5 Les flavanones

Les flavanones possèdent des activités anticancéreuses et antioxydantes à travers des effets sur la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'angiogenèse (Erlund, 2004; Gao et al., 2006; Kumar et al., 2019; Sakalli et al., 2018; Selvaraj et al., 2014). Parmi les flavanones, la naringénine a des capacités d'inhibition de la prolifération des cellules du cancer du côlon et de la peau (Frydoonfar et al., 2003; Türkkkan et al., 2012). Un certain nombre de propriétés ont été évaluées pour cette flavanone, comme l'inhibition de la migration des cellules du cancer de foie et du cancer du pancréas (Lentini et al., 2007; Tu et al., 2015). De plus, la naringénine inhibe de manière significative la migration des cellules cancéreuses de la vessie (Liao et al., 2014). Dans l'une des études, Song et al., (2020) ont découvert que la naringénine réduit la croissance bactérienne du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et son attribut isolé cliniquement.

2.3.2. Les non-flavonoïdes

2.3.2.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont de puissants antioxydants, piègeurs de radicaux libres tel que le radical hydroxyle, l'anion radical superoxyde et plusieurs autres radicaux organiques (Chandrasekara, 2019). Ils exercent également des activités de chélation des métaux (Soobrattee et al., 2005). Des études précliniques et cliniques ont prouvé que les acides phénoliques jouent un rôle positif dans la diminution du risque de certaines maladies chroniques tel que le cancer, et cela revient à leurs propriétés antioxydantes (Abotaleb et al., 2020). En effet, il a été démontré que trois parmi les acides phénoliques (l'acide caféique, coumarique et férulique) ont la capacité à inhiber la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules du cancer de côlon (HT29-D4) (Rosa et al., 2016).

Plusieurs chercheurs ont investigué l'effet de différentes molécules appartenant à la famille des acides phénoliques sur diverses lignées cellulaires dérivées du cancer colorectal (Rosa et al., 2016). Par exemple la cytotoxicité de l'acide caféique, un acide phénolique, a été testée sur les souches HT29 (Nasr Bouzaiene et al., 2015), HCT15 (Jaganathan, 2012), HCT116 (Chiang et al., 2014; Jayaprakasam et al., 2006; Wang, 2005; Xiang et al., 2006), SW480 (Chiang et al., 2014; Xiang et al., 2006) et CT26 (Weng and Yen, 2012). Parmi toutes ces études, certaines activités des acides phénoliques étaient communes, notamment l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et la suppression de la production des anions superoxyde. La cytotoxicité de l'acide férulique contre diverses lignées du cancer du côlon, a également été étudiée. Parmi ces lignées nous citons HCT116 (Chiang et al., 2014), HT29 (Nasr Bouzaiene et al., 2015), et Caco-2 (Janicke et al., 2011, 2005).

En plus de son effet cytotoxique, il a été signalé dans la littérature que l'acide caféique présente un potentiel antibactérien et/ou des effets synergiques avec les antibiotiques contre les souches de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* (Almajano et al., 2007; dos Santos et al., 2018; Vaquero et al., 2007). L'acide caféique a également prouvé son efficacité dans l'inhibition de la croissance de 20 souches cliniques de *S. aureus* (Kępa et al., 2018)

2.3.2.2 Les Stilbènes

Les composés contenant des stilbènes ont attiré l'attention des chimistes et des pharmacologues au fil des années, principalement en raison de leurs importantes propriétés biologiques, telles que les propriétés antioxydantes et anticancéreuses (De Filippis et al., 2017). Parmi ces composés, le resvératrol est l'un des plus étudiés pour ses activités antibactériennes (Vestergaard and Ingmer, 2019), antioxydantes (notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique, la chélation des métaux et l'activité de piégeage des radicaux libres) (Pervaiz and Holme, 2009) et anticancéreuses (Carter et al., 2014).

En effet, sa cytotoxicité a été prouvée sur plusieurs types de cancer tels que le cancer du sein (Banerjee et al., 2002; Bhat et al., 2001) et le cancer colorectal (Majumdar et al., 2009; Tessitore et al., 2000). En plus, le resvératrol présente une activité antimicrobienne contre un éventail excessivement large d'espèces bactériennes Gram positives et négatives (Vestergaard and Ingmer, 2019), parmi elles *S. aureus* (ATCC 25923) et *E.coli* (ATCC 25922) (Paulo et al., 2010).

2.3.2.3 Les Anthraquinones

Plusieurs activités biologiques ont été décrites dans la littérature pour ces composés (Malik and Müller, 2016), parmi lesquels nous soulignons leurs propriétés antitumorales (Huang et al., 2007), antibactériennes (Fosso et al., 2012), et antioxydantes (Diaz-Muñoz et al., 2018).

Un certain nombre d'études ont démontré que les principales anthraquinones qui sont l'émodyne, l'aloé-émodyne et la rhéine, inhibent la croissance et la prolifération de diverses cellules cancéreuses. L'émodyne a été signalée comme inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses du sein, du poumon, du col de l'utérus, du colon et de la prostate (Cha et al., 2005; Chan et al., 1993; Chang et al., 1996; Kuo et al., 2004; Zhang et al., 1995). L'aloé-émodyne a également été capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, y compris le cancer du poumon (Lee et al., 2001), le cancer du foie (Kuo et al., 2002; Yeh et al., 2003), et les lignées cellulaires de la leucémie (Chen et al., 2004). La rhéine a pareillement été signalée comme ayant un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein, du côlon et du poumon (Cichewicz et al., 2004; Floridi et al., 1991).

L'aloé-émodyne, le chrysophanol, l'émodyne, le physcion et la rhéine sont les anthraquinones de plus grand nombre d'études prouvant leur activité antimicrobienne, contre un ensemble de micro-organismes sensibles et résistants aux médicaments (Malmir et al., 2017). En général, les anthraquinones isolées étaient actifs contre l'inhibition de la croissance des bactéries Gram négatives, en particulier contre *Pseudomonas aeruginosa* (Kaithwas et al., 2008), *Helicobacter pylori* (Cellini et al., 2014) et *Neisseria gonorrhoeae* (Malmir et al., 2015) et contre les bactéries Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, notamment les souches MRSA et *S. epidermitis* (Liu et al., 2015). Les mécanismes antibactériens des anthraquinones sont divers, incluant la simple déstabilisation de la paroi cellulaire (Liu et al., 2015) et d'altérations des voies métaboliques (Yadav et al., 2013). De plus, un même dérivé d'anthraquinone peut avoir plusieurs mécanismes d'action, ce qui rend difficile le développement de résistance par les bactéries (Malmir et al., 2017).

3. Étude de la plante de *Rheum ribes* L.

La rhubarbe, une plante à d'intérêt botanique, commercial et horticole, est actuellement représentée par environ 60 espèces existantes dans les pays d'Asie et d'Europe, avec une distribution majeure dans les régions montagneuses en Chine (Pandith and Khan, 2022; Zheng et al., 2013). L'utilisation des espèces vivaces appartenant au genre *Rheum* est largement documentée dans les systèmes de la médecine traditionnelle en tant que drogues brutes les plus recherchées et n'ayant aucun effet secondaire indésirable.

3.1. Généralités sur l'espèce de *Rheum ribes* L.

3.1.1. Présentation botanique : Taxonomie et systématique végétale

Règne :	Végétale
Embranchement :	<i>Tracheophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Caryophyllales</i>
Famille :	<i>Polygonaceae</i>
Genre :	<i>Rheum</i>
Espèce :	<i>ribes</i>

(Selon <https://www.gbif.org/fr/species/4037514>, consulté le 12 septembre 2022)

3.1.2. Identification de l'espèce *Rheum ribes* L.

L'espèce *Rheum ribes* L. d'origine libanaise a été identifiée et décrite par des chercheurs botanistes depuis plus qu'un siècle. Cela figure dans l'« ANNALES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE » (Haüy et al., 1803), publié par un groupe de professeurs à Paris, dans lequel existe une illustration botanique (**Figure 10**) et une description détaillée de la morphologie de chacune des parties de la plante.



Figure 10- Illustration botanique de la *Rheum ribes* L.
(Haüy et al., 1803)

En outre, d'autres ouvrages botaniques ont également présenté la *Rheum ribes* L. notamment celui intitulé « NOUVELLE FLORE DU LIBAN ET DE LA SYRIE » (Tome 1) publié par Moutèrde, 1966, et un autre intitulé « ILLUSTRATED FLORA OF LEBANON » récemment publié par Georges et Henriette Tohmé (Tohmé and Tohmé, 2007).

Notre étude porte principalement sur la partie souterraine de la plante, aussi dite le rhizome, qui a été décrite dans tous les ouvrages botaniques cités ci-dessus. Le rhizome de *R. ribes* L. a été décrit comme épais d'une longueur de 30 à 40 centimètres et d'une couleur rousse-violette.

3.1.3. Habitat et répartition géographique de l'espèce *Rheum ribes* L.

L'espèce *Rheum ribes* L. pousse entre 1000 et 4000 mètres d'altitude sur des roches de dunite et entre les pierres (Demiray et al., 2022; Öztürk et al., 2007). Cette plante est originaire du Liban (Darsanaki and Lisar, 2014; Öztürk et al., 2007), la Turquie, l'Iran

(Alaadin et al., 2007; Öztürk et al., 2007), l'Iraq (Alaadin et al., 2007; Darsanaki and Lisar, 2014; Obaid et al., 2016), l'Afghanistan, le Pakistan (Alaadin et al., 2007), la Russie (Alaadin et al., 2007), la Palestine (Darsanaki and Lisar, 2014; Obaid et al., 2016) et la Syrie (Obaid et al., 2016).

3.1.4. Noms vernaculaires

Selon l'ouvrage « ILLUSTRATED FLORA OF LEBANON », les noms vernaculaires de l'espèce *Rheum ribes* L. en anglais, en français et en arabe sont respectivement « Waltered-leaved rhubarb », « Rhubarbe ribes », et « *ribas* ريباس ».

3.2. La composition du *Rheum ribes* L.

L'identification botanique de la *Rheum ribes* L. est d'une importance cruciale, ainsi que l'identification de toutes les molécules composant cette plante. En se basant sur la littérature, nous avons compilé et classé les divers composés non-phénoliques (**Tableau 3**) et phénoliques (**Tableau 4**) qui ont été identifiés dans l'espèce *R. ribes* L.

3.2.1. Composition non-phénolique

La composition non-phénolique de la plante de *R. ribes* L. a été déterminée par divers groupes (Erecevit and Kirbağ, 2017; Jalill et al., 2015; Keser et al., 2019; Ragasa et al., 2017; Tuncturk et al., 2017) (**Tableau 3**). Parmi ces derniers, certains ont employé la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour le dosage des glucides (Erecevit and Kirbağ, 2017), des lipides, des acides gras et des vitamines (Erecevit and Kirbağ, 2017; Keser et al., 2019). En revanche, Ragasa et al., (2017), ont adopté la chromatographie sur colonne à gel de silice 60 pour la détection des composés glucidiques. Tant qu'à la détection des minéraux, celle-là a été effectuée par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) dans les travaux de Jalill et al., (2015), alors que dans le cas de l'étude effectuée par Tuncturk et al., (2017), la détermination des minéraux a été faite par spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

3.2.2. Composition phénolique

Divers groupes ont travaillé sur la détermination des composés phénoliques des différentes parties de *Rheum ribes* L. (**Tableau 4**). Certains ont réalisé des analyses quantitatives des molécules phytochimiques par chromatographie en phase liquide à

haute performance (HPLC) et par spectrométrie de masse (MS) (Abdulla et al., 2014; Adham and Naqishbandi, 2015, 2015; Çınar Ayan et al., 2021; Erecevit and Kirbağ, 2017; Jalill et al., 2015; Raafat et al., 2014). D'autres ont également effectué un criblage phytochimique préliminaire selon des procédures standards qualitatives (par exemple la solution de Fehling pour la détermination des glucosides et le test du chlorure ferrique pour la détermination des tanins, etc...) dans le but d'identifier les familles des phénols présents dans les extraits (Adham and Naqishbandi, 2015; Noori et al., 2022; Taskin et al., 2019). Plusieurs chercheurs ont réussi à identifier les molécules appartenant à ces divers familles de polyphénols sauf pour les alcaloïdes, dont la présence a été citée dans plusieurs études mais sans précision des molécules qui en appartiennent (Adham and Naqishbandi, 2015; Jalill et al., 2015; Noori et al., 2022). Toutefois, une étude qualitative de Taskin et al., (2019) pour la détermination des molécules phénoliques, a montré des résultats différents, où la famille des alcaloïdes a été absente dans les extraits provenant de toutes les parties de la plante.

Tableau 3- Composition non-phénolique du *Rheum ribes L.*

Éléments	Partie utilisée de la plante	Composition	Références
Minéraux	Tige	Na, Mg, K, Ca, P, S, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Co, Pb	(Tuncturk et al., 2017)
	Rhizome	Cu, Zn, Cd, Mn, K, Fe, Co, Ti, P, N	(Jalill et al., 2015)
Glucides	Toutes les parties de la plante	Fructose, Glucose, Saccharose et maltose	(Erecevit and Kirbağ, 2017)
Lipides	Toutes les parties de la plante	Triglycérides, β -sitostérol, Ergosterol et Stigmasterol	(Erecevit and Kirbağ, 2017; Keser et al., 2019; Ragasa et al., 2017)
Acides gras	Toutes les parties de la plante	16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3	(Erecevit and Kirbağ, 2017; Keser et al., 2019)
	Tige	20:5	(Keser et al., 2019)
Vitamines	Toutes les parties de la plante	Vitamines A, K et D, δ -Tocopherol et α -Tocopherol	(Erecevit and Kirbağ, 2017; Keser et al., 2019)
Protéines	Rhizome	Non déterminées	(Jalill et al., 2015)

Tableau 4- Composition phénolique du *Rheum ribes L.*

Nom du composé	Partie utilisée de la plante	Références
Flavonoïdes		
Flavonol		
Rutine	Toutes les parties de la plante	(Abdulla et al., 2014; Çınar Ayan et al., 2021; Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003)
Myricétine	Toutes les parties de la plante	(Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019)
Morine	Toutes les parties de la plante	(Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019)
Kaempferol	Toutes les parties de la plante	(Abdulla et al., 2014; Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019)
Herbacétine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Galangine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Fisétine	Tige	(Tosun and Kizilay, 2003) (Raafat et al., 2014)
Quercétine	Toutes les parties de la plante	(Çınar Ayan et al., 2021; Erecevit and Kırbağ, 2017; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003)
Quercitrine	Tige	(Tosun and Kizilay, 2003)
Flavan-3-ol ou flavanol		
Epicatéchine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Catéchine	Tige	(Keser et al., 2019)
Epigallocatechin	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Procyanidine B2	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Tanins hydrolysables		
Acide tannique	Rhizomes	(Abdulla et al., 2014)
Pyrogallol	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)

Tanins condensés		
Pyrocatechol	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Flavanones		
Naringenin	Toutes les parties de la plante	(Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019)
Naringine	Tige	(Keser et al., 2019)
Isoflavone		
Génistéine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Daidzéine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Formononétine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Prunetin	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Flavones		
Apigénine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Lutéoline	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Baicaléine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Chrysrine	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Glucosides de flavonoïdes		
Kaempferol-7-O-glucoside	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Quercetin-3-D-galactoside	Rhizome	(Raafat et al., 2014)
Quercetin-3-O-glucopyranoside	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Quercetin-3-O-galactoside	Tige	(Tosun and Kizilay, 2003)
Non-flavonoïdes		
Anthraquinones		
Chrysophanol	Tige et rhizome	(Abdulla et al., 2014; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003)
Physcion	Tige et rhizome	(Abdulla et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003)
Aloïne	Tige et rhizome	Çınar Ayan et al., 2021)

Emodine	Tige et rhizome	(Abdulla et al., 2014; Çınar Ayan et al., 2021; Raafat et al., 2014; Tosun and Kizilay, 2003)
Aloe-émuline	Rhizome	(Abdulla et al., 2014)
Rhein	Rhizome	
Acides phénoliques		
Acide chlorogénique	Rhizomes	(Abdulla et al., 2014)
Acide caféique	Tige	(Keser et al., 2019)
Acide gallique	Rhizome	(Abdulla et al., 2014; Keser et al., 2019)
Acide salicylique	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Acide férulique	Tige et rhizome	Çınar Ayan et al., 2021)(Keser et al., 2019)
Acide rosmarinique	Tige	(Keser et al., 2019)
Acide vanillique	Tige	(Keser et al., 2019)
Alcaloïdes		
Présents (selon les tests qualitatifs)	Rhizome	(Adham and Naqishbandi, 2015; Jalill et al., 2015; Noori et al., 2022)
Xanthones		
2-Hydroxyxanthone	Tige et rhizome	(Çınar Ayan et al., 2021)
Stilbène		
Resvératrol	Toutes les parties de la plante	(Çınar Ayan et al., 2021; Erecevit and Kirbağ, 2017; Keser et al., 2019)

3.3. Propriétés pharmacothérapeutiques et usages ethnobotaniques des extraits des différentes parties de *Rheum ribes* L.

3.3.1. Effets antibactériens

Le **Tableau 5** récapitule toutes les études de la littérature qui ont rapporté les activités antibactériennes des différentes parties de *Rheum ribes* L.

Divers groupes ont comparé l'effet du solvant d'extraction sur l'activité antimicrobienne des extraits de *Rheum ribes* L. Les extraits alcooliques ont montré une puissance d'inhibition de la croissance bactérienne supérieure à celle des extraits aqueux dans plusieurs études (Abdulla et al., 2014; Engin et al., 2018; Keser et al., 2019), cependant, une étude a montré des résultats contradictoires (Önem et al., 2020). Un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O) a été utilisé comme solvant d'extraction dans une étude de Bagheri et al., (2019), dans laquelle il a été prouvé que l'extrait hydroalcoolique de rhizomes de *Rheum ribes* L. est fortement plus puissant que l'extrait aqueux dans l'inhibition de la croissance de *A. baumannii*.

Il est remarquable que l'extraction dans divers solvant alcooliques (éthanol et méthanol) n'avait pas le même effet sur le pouvoir antibactérien des extraits de *Rheum ribes* L. Les extraits méthanoliques ont montré être plus efficace que les extraits éthanoliques dans l'inhibition de la croissance de diverses bactéries (Alan et al., 2012; Keser et al., 2019).

En outre, des solvants organiques comme le chloroforme (Alaadin et al., 2007; Önem et al., 2020) et l'hexane (Amiri et al., 2015; Engin et al., 2018) ont également été utilisés dans diverses études. En effet, les travaux de Alaadin et al., (2007), ont montré que l'extrait chloroformique est un inhibiteur de la prolifération bactérienne plus puissant que l'extrait préparé dans un mélange chloroforme : eau. L'extrait préparé dans un mélange méthanol : chloroforme a un effet antibactérien fortement plus élevé que l'extrait alcoolique (Önem et al., 2020), par contre, l'extrait hexanique a un effet antibactérien légèrement moins puissant que l'extrait alcoolique (Engin et al., 2018).

En comparant le pouvoir antibactérien des différentes parties de la plantes de *R. ribes* L., il est notable que les extraits y provenant présentent différents effets antibactériens. En effet, Bazzaz et al., (2005), ont montré que certaines souches bactériennes sont plus

sensibles à l'extrait de rhizomes de *R. ribes* L. (*E. coli*, *K. pneumonia* et *P. vulgaris*) qu'aux extraits de tiges et de feuilles (*N. gonorrhoeae*) (Bazzaz et al., 2005).

Certaines études ont testé la sensibilité de diverses souches bactérienne hospitalières (Alsudani et al., 2019; Bazzaz et al., 2005; Darsanaki and Lisar, 2014; Obaid et al., 2016), alors que les autres ont eu recours à des souches commercialisées (ATCC : American Type Culture Collection) (Alan et al., 2012; Amiri et al., 2015; Azadpour et al., 2020...). Un extrait méthanolique de rhizomes de *Rheum ribes* L. n'a montré aucun effet sur une souche commercialisée d' *E.coli* (Sayyahi et al., 2019), alors que dans plusieurs études, le même type d'extrait était puissant sur des souches cliniques d'*E.coli* (Bazzaz et al., 2005; Darsanaki and Lisar, 2014; Obaid et al., 2016).

Parmi les études listées, on remarque que les extraits aqueux de rhizomes de *Rheum ribes* L. n'ont pas eu aucun effet sur la croissance de bactérie de souches différentes, par exemple *E. coli* ATCC 11229 (Alaadin et al., 2007) et *E. coli* ATCC 25923 (Önem et al., 2020). En revanche, deux souches différentes de *S. aureus* ATCC 6536 (Alaadin et al., 2007) et ATCC 25922 (Önem et al., 2020)) ont donné des résultats contradictoires suite à leur traitement par un extrait aqueux de rhizomes de *Rheum ribes* L.

Dans certains travaux, l'effet antibactérien des extraits de *R. ribes* L. était plus important contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (Abdulla et al., 2014; Alaadin et al., 2007; Azadpour et al., 2020; Önem et al., 2020; Sayyahi et al., 2019). En revanche, différentes études ont donné des résultats opposés (Alan et al., 2012; Tartik et al., 2015). Par ailleurs, les résultats d'autres travaux ont montré qu'aucune tendance Gram positif contre Gram négatif existe (Alsudani et al., 2019; Amiri et al., 2015; Bonjar, 2004; Darsanaki and Lisar, 2014; Engin et al., 2018; Keser et al., 2019).

L'effet antibactérien de *R. ribes* L. a été sujet d'intérêt pour divers chercheurs de différentes régions. Toutefois, il est remarquable que les extraits de la plante provenant de différents pays n'aient pas donné des résultats similaires sur le niveau antibactérien. A titre d'exemple, un extrait méthanolique de rhizomes de *R. ribes* L. a donné des concentrations minimales inhibitrices de la croissance de *B. cereus* et *S. aureus* dix fois plus élevées dans une étude faite en Iran (Sayyahi et al., 2019) qu'une étude faite en Turquie (Önem et al., 2020). Non seulement les données entre pays sont différentes, mais les résultats entre régions du même pays le sont également. C'est le cas par exemple de deux études faites en Irak sur l'effet antibactérien des extraits alcooliques et aqueux : dans

l'une aucune zone d'inhibition a été observée (Alaadin et al., 2007), alors que ce n'était pas le cas dans la seconde étude (Abdulla et al., 2014).

Tableau 5- Etudes sur les activités antibactériennes des différentes parties du *Rheum ribes L.*

	Type d'extrait	Méthode expérimentale	Bactérie	Résultat	Références												
Rhizomes	Extrait éthanolique	Micro-dilution	<p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>E. coli</i> <i>E. aeruginosa</i> <p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>S. aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Une faible dose de 0,6 mg/mL est suffisante pour fortement diminuer le taux de croissance de <i>E. aerogenes</i> et de <i>E. coli</i> Une dose élevée de 20 mg/mL est nécessaire pour diminuer le taux de croissance de <i>S. aureus</i> 	(Tartik et al., 2015)												
	Extrait hydroalcooliques (EtOH : H ₂ O 70 : 30) (1) et aqueux (2)	Diffusion dans des puits créés sur l'agar + micro-dilution (CMI) + culture sur milieu gélosé (CMB)	<p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>A. baumannii</i> (ATCC747) 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Extrait</th> <th>CMI (µg/mL)</th> <th>CMB (µg/mL)</th> <th>Zone d'inhibition à 128 µg/mL(mm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>128</td> <td>256</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>256</td> <td>512</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Extrait	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Zone d'inhibition à 128 µg/mL(mm)	(1)	128	256	8	(2)	256	512	2	(Bagheri et al., 2019)
	Extrait	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Zone d'inhibition à 128 µg/mL(mm)													
(1)	128	256	8														
(2)	256	512	2														
Extrait éthanolique	Diffusion dans des puits créés sur l'agar	<p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>P. mirabilis</i>* <i>H. pylori</i>* <i>K. pneumonia</i>* <p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>S. epidermidis</i>* <i>S. mutans</i>* 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bactérie</th> <th>Zone d'inhibition à 50 mg/mL (mm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>P. mirabilis</i>*</td> <td>17,9</td> </tr> <tr> <td><i>H. pylori</i>*</td> <td>18,4</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumonia</i>*</td> <td>19,3</td> </tr> <tr> <td><i>S. epidermidis</i>*</td> <td>16,4</td> </tr> <tr> <td><i>S. mutans</i>*</td> <td>18,1</td> </tr> </tbody> </table>	Bactérie	Zone d'inhibition à 50 mg/mL (mm)	<i>P. mirabilis</i> *	17,9	<i>H. pylori</i> *	18,4	<i>K. pneumonia</i> *	19,3	<i>S. epidermidis</i> *	16,4	<i>S. mutans</i> *	18,1	(Alsudani et al., 2019)	
Bactérie	Zone d'inhibition à 50 mg/mL (mm)																
<i>P. mirabilis</i> *	17,9																
<i>H. pylori</i> *	18,4																
<i>K. pneumonia</i> *	19,3																
<i>S. epidermidis</i> *	16,4																
<i>S. mutans</i> *	18,1																

Extrait dans l'éthanol (80%) (1) fractionné dans H ₂ O (2), dans CH ₃ Cl:H ₂ O (3) et dans CH ₃ Cl (4)	Bioautographie + Micro-dilution (concentration de l'extrait allant de 31 à 4000 µg/mL)	<p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027) • <i>E. coli</i> (ATCC 11229) <p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) 	<p><u>Bioautographie</u></p> <p>(1) et (2) : Aucune activité observée</p> <p>(3) et (4) : zones d'inhibition contre <i>S. aureus</i> et <i>E.coli</i></p> <p><u>Micro-dilution</u></p> <p>CMI de (3) contre <i>S. aureus</i> = 500 µg/mL et (4)= 125 µg/mL et aucun effet contre les autres bactéries</p>	(Alaadin et al., 2007)																		
Extrait éthanolique (1) et méthanolique (2)	Micro-dilution + diffusion sur disque	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) <p><u>Gram négatif :</u></p> <p><i>E.aerogenes</i> (ATCC 13048)</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Extrait</th> <th>Bactérie</th> <th>CMI (mg/mL)</th> <th>Zone d'inhibition µg/mL) (mm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">(1)</td> <td><i>B. subtilis</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>E.aerogenes</i></td> <td>5,5</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">(2)</td> <td><i>B. subtilis</i></td> <td>6</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td><i>E.aerogenes</i></td> <td>6</td> <td>14</td> </tr> </tbody> </table>	Extrait	Bactérie	CMI (mg/mL)	Zone d'inhibition µg/mL) (mm)	(1)	<i>B. subtilis</i>	-	-	<i>E.aerogenes</i>	5,5	16	(2)	<i>B. subtilis</i>	6	14	<i>E.aerogenes</i>	6	14	(Alan et al., 2012)
Extrait	Bactérie	CMI (mg/mL)	Zone d'inhibition µg/mL) (mm)																			
(1)	<i>B. subtilis</i>	-	-																			
	<i>E.aerogenes</i>	5,5	16																			
(2)	<i>B. subtilis</i>	6	14																			
	<i>E.aerogenes</i>	6	14																			
Extrait dans du méthanol (95%)	Diffusion dans des puits créés sur l'agar	<p><u>Gram négatif :</u></p> <p><i>E. coli</i>*</p>	<p><u>Zone d'inhibition à 78 µg/mL :</u></p> <p>18 mm</p>	(Obaid et al., 2016)																		

<p>Extrait aqueux (1), méthanolique (2), et dans un mélange methanol-chloroforme (MeOH-CHCL₃) (3)</p>	<p>Micro-dilution</p>	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>B. cereus</i> (ATCC 11778) • <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) • <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644) • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) • <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline (MRSA) (ATCC 43300) <p>Gram négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. violaceum</i> (ATCC 12472) • <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>P. aeruginosa</i> (PA01) 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactérie</th> <th colspan="3">CMI (mg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>B. cereus</i></td> <td>0,75</td> <td>1,25</td> <td>0,5</td> </tr> <tr> <td><i>E. faecalis</i></td> <td>0,09</td> <td>0,16</td> <td>0,06</td> </tr> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>0,19</td> <td>0,31</td> <td>0,12</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>0,75</td> <td>1,25</td> <td>0,75</td> </tr> <tr> <td>MRSA</td> <td>0,75</td> <td>1,25</td> <td>0,75</td> </tr> <tr> <td><i>C. violaceum</i></td> <td>0,38</td> <td>0,63</td> <td>0,25</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i></td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i> (PA01)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Bactérie	CMI (mg/mL)			(1)	(2)	(3)	<i>B. cereus</i>	0,75	1,25	0,5	<i>E. faecalis</i>	0,09	0,16	0,06	<i>L. monocytogenes</i>	0,19	0,31	0,12	<i>S. aureus</i>	0,75	1,25	0,75	MRSA	0,75	1,25	0,75	<i>C. violaceum</i>	0,38	0,63	0,25	<i>E. coli</i>	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	-	-	-	<p>(Önem et al., 2020)</p>
Bactérie	CMI (mg/mL)																																														
	(1)	(2)	(3)																																												
<i>B. cereus</i>	0,75	1,25	0,5																																												
<i>E. faecalis</i>	0,09	0,16	0,06																																												
<i>L. monocytogenes</i>	0,19	0,31	0,12																																												
<i>S. aureus</i>	0,75	1,25	0,75																																												
MRSA	0,75	1,25	0,75																																												
<i>C. violaceum</i>	0,38	0,63	0,25																																												
<i>E. coli</i>	-	-	-																																												
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-																																												
<i>P. aeruginosa</i> (PA01)	-	-	-																																												
<p>Extrait méthanolique</p>	<p>Micro-dilution + diffusion dans des puits créés sur l'agar</p>	<p>Obtenus de « Persian type culture collection »(PTCC)</p> <p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>M.luteus</i> (PTCC 1110) • <i>M.luteus</i> (PTCC1170) <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>B.bronchiseptica</i> (PTCC 1025) • <i>K. pneumonia</i> (PTCC 1053) • <i>S.marcescens</i> (ATTC 27117) 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bactérie</th> <th>CMI (mg/mL)</th> <th>Zone d'inhibition (mm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>M.luteus</i>(PTCC1110)</td> <td>3,75</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td><i>M.luteus</i>(PTCC1170)</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>B.bronchiseptica</i></td> <td>15</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumonia</i></td> <td>1.87</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td><i>S.marcescens</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Bactérie	CMI (mg/mL)	Zone d'inhibition (mm)	<i>M.luteus</i> (PTCC1110)	3,75	17	<i>M.luteus</i> (PTCC1170)	-	-	<i>B.bronchiseptica</i>	15	10	<i>K. pneumonia</i>	1.87	18	<i>S.marcescens</i>	-	-	<p>(Bonjar, 2004)</p>																									
Bactérie	CMI (mg/mL)	Zone d'inhibition (mm)																																													
<i>M.luteus</i> (PTCC1110)	3,75	17																																													
<i>M.luteus</i> (PTCC1170)	-	-																																													
<i>B.bronchiseptica</i>	15	10																																													
<i>K. pneumonia</i>	1.87	18																																													
<i>S.marcescens</i>	-	-																																													

Extrait méthanolique	Diffusion sur des puits créés sur l'agar (a) (500 µg/puit) + diffusion sur disques (b) (500 µg/disque)	<p>50 souches hospitalières testées pour chaque micro-organisme, et 30 souches pour <i>N. gonorrhoeae</i></p> <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>* • <i>K.pneumonia</i>* • <i>N.gonorrhoeae</i>* • <i>P. vulgaris</i>* • <i>P. mirabilis</i>* • <i>P.aeruginosa</i>* 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th colspan="2">% de souches sensibles</th> </tr> <tr> <th>a</th> <th>b</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>E.coli</i></td> <td>76</td> <td>68</td> </tr> <tr> <td><i>K.pneumonia</i></td> <td>66</td> <td>66</td> </tr> <tr> <td><i>N.gonorrhoeae</i></td> <td>46</td> <td>36,67</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris et mirabilis</i></td> <td>58</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td><i>P.aeruginosa</i></td> <td>54</td> <td>64</td> </tr> </tbody> </table>					Bactéries	% de souches sensibles		a	b	<i>E.coli</i>	76	68	<i>K.pneumonia</i>	66	66	<i>N.gonorrhoeae</i>	46	36,67	<i>P. vulgaris et mirabilis</i>	58	40	<i>P.aeruginosa</i>	54	64	(Bazzaz et al., 2005)					
Bactéries	% de souches sensibles																																
	a	b																															
<i>E.coli</i>	76	68																															
<i>K.pneumonia</i>	66	66																															
<i>N.gonorrhoeae</i>	46	36,67																															
<i>P. vulgaris et mirabilis</i>	58	40																															
<i>P.aeruginosa</i>	54	64																															
Extrait méthanolique	Diffusion dans des puits créés sur l'agar (1) + diffusion sur disque (2) + Micro-dilution (CMI et CMB)	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>B. cereus</i> <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>E. coli</i> 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bactérie</th> <th>CMI (mg/mL)</th> <th>CMB (mg/mL)</th> <th>Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (1)</th> <th>Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (2)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>12.5</td> <td>50</td> <td>9,24</td> <td>9,12</td> </tr> <tr> <td><i>B. cereus</i></td> <td>12.5</td> <td>25</td> <td>9</td> <td>9,24</td> </tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i></td> <td>25</td> <td>50</td> <td>7,4</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>50</td> <td>100</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>					Bactérie	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (1)	Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (2)	<i>S. aureus</i>	12.5	50	9,24	9,12	<i>B. cereus</i>	12.5	25	9	9,24	<i>P. aeruginosa</i>	25	50	7,4	8	<i>E. coli</i>	50	100	-	-	(Sayyahi et al., 2019)
Bactérie	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (1)	Zone d'inhibition à 100 mg/mL (mm) (2)																													
<i>S. aureus</i>	12.5	50	9,24	9,12																													
<i>B. cereus</i>	12.5	25	9	9,24																													
<i>P. aeruginosa</i>	25	50	7,4	8																													
<i>E. coli</i>	50	100	-	-																													

Tiges	Extrait aqueux (1), éthanolique (2), et méthanolique (3)	Diffusion sur disques	<p>Gram positif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>B. megaterium</i> DSM 32 • <i>S. aureus</i> COWAN 1 • <i>B. subtilis</i> IMG 22 • <i>L.monocytogenes</i> SCOTTA <p>Gram négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> ATCC 25922 • <i>P. vulgaris</i> FMC 1 • <i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 • <i>K. pneumonia</i> FMC 5 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th colspan="3">Zone d'inhibition (mm) avec 100µL de l'extrait sur les disques</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>B. megaterium</i></td> <td>-</td> <td>8</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>8</td> <td>9</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td><i>B. subtilis</i></td> <td>8</td> <td>9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i></td> <td>8</td> <td>9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>-</td> <td>8</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i></td> <td>8</td> <td>9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>8</td> <td>9</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumonia</i></td> <td>-</td> <td>8</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 100µL de l'extrait sur les disques			(1)	(2)	(3)	<i>B. megaterium</i>	-	8	9	<i>E. coli</i>	8	9	11	<i>B. subtilis</i>	8	9	10	<i>P. vulgaris</i>	8	9	10	<i>L. monocytogenes</i>	-	8	9	<i>P. aeruginosa</i>	8	9	10	<i>S. aureus</i>	8	9	10	<i>K. pneumonia</i>	-	8	10	(Keser et al., 2019)
	Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 100µL de l'extrait sur les disques																																										
(1)		(2)	(3)																																									
<i>B. megaterium</i>	-	8	9																																									
<i>E. coli</i>	8	9	11																																									
<i>B. subtilis</i>	8	9	10																																									
<i>P. vulgaris</i>	8	9	10																																									
<i>L. monocytogenes</i>	-	8	9																																									
<i>P. aeruginosa</i>	8	9	10																																									
<i>S. aureus</i>	8	9	10																																									
<i>K. pneumonia</i>	-	8	10																																									
Extrait hydroalcoolique (EtOH : H ₂ O 80 : 20)	Micro-dilution	<p>Gram négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>E. coli</i> (PTC 1395) • <i>K. pneumonia</i> (PTCC 1290) <p>Gram positif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. agalactiae</i> (ATCC 12386) • <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228) • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) <p><i>L.monocytogenes</i> (ATCC 1298)</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bactéries</th> <th>CMI (µg/mL)</th> <th>CMB (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i></td> <td>250</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>500</td> <td>500</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumonia</i></td> <td>500</td> <td>500</td> </tr> <tr> <td><i>S. agalactiae</i></td> <td>125</td> <td>500</td> </tr> <tr> <td><i>S. epidermidis</i></td> <td>250</td> <td>500</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>500</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>L.monocytogenes</i></td> <td>2</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	<i>P. aeruginosa</i>	250	-	<i>E. coli</i>	500	500	<i>K. pneumonia</i>	500	500	<i>S. agalactiae</i>	125	500	<i>S. epidermidis</i>	250	500	<i>S. aureus</i>	500	-	<i>L.monocytogenes</i>	2	8	(Azadpour et al., 2020)																
Bactéries	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)																																										
<i>P. aeruginosa</i>	250	-																																										
<i>E. coli</i>	500	500																																										
<i>K. pneumonia</i>	500	500																																										
<i>S. agalactiae</i>	125	500																																										
<i>S. epidermidis</i>	250	500																																										
<i>S. aureus</i>	500	-																																										
<i>L.monocytogenes</i>	2	8																																										

<p>Extrait méthanolique</p>	<p>Diffusion sur des puits créés sur l'agar (a) (500 mcg/puit) + diffusion sur disques (b) (500 mcg/disque)</p>	<p>50 souches hospitalières testées pour chaque micro-organisme, et 30 souches pour <i>N. gonorrhoeae</i> <u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E.coli</i>* • <i>K.pneumonia</i>* • <i>N.gonorrhoeae</i>* • <i>P. vulgaris</i>* • <i>P. mirabilis</i>* • <i>P.aerugiosa</i>* 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th>a</th> <th>b</th> </tr> <tr> <th colspan="2">% de souches sensibles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>E.coli</i></td> <td>34</td> <td>42</td> </tr> <tr> <td><i>K.pneumonia</i></td> <td>30</td> <td>42</td> </tr> <tr> <td><i>N.gonorrhoeae</i></td> <td>3,33</td> <td>3,33</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i></td> <td>14</td> <td>6,8</td> </tr> <tr> <td><i>P.aerugiosa</i></td> <td>6</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	a	b	% de souches sensibles		<i>E.coli</i>	34	42	<i>K.pneumonia</i>	30	42	<i>N.gonorrhoeae</i>	3,33	3,33	<i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>	14	6,8	<i>P.aerugiosa</i>	6	0	<p>(Bazzaz et al., 2005)</p>																															
Bactéries	a	b																																																					
	% de souches sensibles																																																						
<i>E.coli</i>	34	42																																																					
<i>K.pneumonia</i>	30	42																																																					
<i>N.gonorrhoeae</i>	3,33	3,33																																																					
<i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>	14	6,8																																																					
<i>P.aerugiosa</i>	6	0																																																					
<p>Extraction dans l'acide acétique (1%) (1), l'éthanol (2) et l'hexane (3)</p>	<p>Diffusion sur disques</p>	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) • <i>B. cereus</i> • <i>S. epidermis</i> • <i>E. faecalis</i> <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> Tip 1 • <i>V. parahaemolyticus</i> (ATCC 17802) • <i>B. cereus</i> • <i>S. typhimurium</i> • <i>Y. pseudotuberculosis</i> • <i>K. pneumoniae</i> • <i>P. vulgaris</i> 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th colspan="3">Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>11</td> <td>12</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>17</td> <td>21</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>-</td> <td>13</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td><i>V. parahaemolyticus</i></td> <td>15</td> <td>12</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>B. cereus</i></td> <td>12</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>S. typhimurium</i></td> <td>12</td> <td>16</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>S. epidermis</i></td> <td>14</td> <td>12</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td><i>Y. pseudotuberculosis</i></td> <td>17</td> <td>14</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td><i>E. faecalis</i></td> <td>12</td> <td>12</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumoniae</i></td> <td>14</td> <td>14</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i></td> <td>16</td> <td>18</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques			(1)	(2)	(3)	<i>L. monocytogenes</i>	11	12	10	<i>S. aureus</i>	17	21	14	<i>E. coli</i>	-	13	13	<i>V. parahaemolyticus</i>	15	12	12	<i>B. cereus</i>	12	13	12	<i>S. typhimurium</i>	12	16	12	<i>S. epidermis</i>	14	12	11	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	17	14	13	<i>E. faecalis</i>	12	12	13	<i>K. pneumoniae</i>	14	14	12	<i>P. vulgaris</i>	16	18	12	<p>(Engin et al., 2018)</p>
Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques																																																						
	(1)	(2)	(3)																																																				
<i>L. monocytogenes</i>	11	12	10																																																				
<i>S. aureus</i>	17	21	14																																																				
<i>E. coli</i>	-	13	13																																																				
<i>V. parahaemolyticus</i>	15	12	12																																																				
<i>B. cereus</i>	12	13	12																																																				
<i>S. typhimurium</i>	12	16	12																																																				
<i>S. epidermis</i>	14	12	11																																																				
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	17	14	13																																																				
<i>E. faecalis</i>	12	12	13																																																				
<i>K. pneumoniae</i>	14	14	12																																																				
<i>P. vulgaris</i>	16	18	12																																																				

Rhizomes, tiges et	Extrait méthanolique	Diffusion sur des puits créés sur l'agar	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i>* <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>* • <i>K.pneumoniae</i>* • <i>P.aeruginos</i>* • <i>S. flexneri</i>* 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bactérie</th> <th>Zone d'inhibition (mm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>11,15</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>12,5</td> </tr> <tr> <td><i>K.pneumoniae</i></td> <td>13,5</td> </tr> <tr> <td><i>P.aeruginos</i></td> <td>10,5</td> </tr> <tr> <td><i>S. flexneri</i></td> <td>13,75</td> </tr> </tbody> </table>	Bactérie	Zone d'inhibition (mm)	<i>S. aureus</i>	11,15	<i>E. coli</i>	12,5	<i>K.pneumoniae</i>	13,5	<i>P.aeruginos</i>	10,5	<i>S. flexneri</i>	13,75	(Darsanaki and Lisar, 2014)																																							
Bactérie	Zone d'inhibition (mm)																																																							
<i>S. aureus</i>	11,15																																																							
<i>E. coli</i>	12,5																																																							
<i>K.pneumoniae</i>	13,5																																																							
<i>P.aeruginos</i>	10,5																																																							
<i>S. flexneri</i>	13,75																																																							
Fleurs	Extraction dans l'acide acétique (1%) (1), l'éthanol (2) et l'hexane (3)	Diffusion sur disques	<p><u>Gram positif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> • <i>S. aureus (ATCC 25923)</i> • <i>B. cereus</i> • <i>S. epidermi</i> • <i>E. faecalis</i> <p><u>Gram négatif :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli Tip 1</i> • <i>V. parahaemolyticus (ATCC 17802)</i> • <i>S. typhimurium</i> • <i>Y. pseudotuberculosis</i> • <i>K. pneumoniae</i> • <i>P. vulgaris</i> 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th colspan="3">Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>-</td> <td>12</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>12</td> <td>23</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>13</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>V. parahaemolyticus</i></td> <td>14</td> <td>14</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>B. cereus</i></td> <td>-</td> <td>14</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td><i>S. typhimurium</i></td> <td>9</td> <td>15</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td><i>S. epidermi</i></td> <td>14</td> <td>23</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>Y.pseudotuberculosis</i></td> <td>27</td> <td>19</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td><i>E. faecalis</i></td> <td>12</td> <td>13</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td><i>K. pneumoniae</i></td> <td>12</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i></td> <td>14</td> <td>20</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques			(1)	(2)	(3)	<i>L. monocytogenes</i>	-	12	13	<i>S. aureus</i>	12	23	15	<i>E. coli</i>	13	13	12	<i>V. parahaemolyticus</i>	14	14	12	<i>B. cereus</i>	-	14	11	<i>S. typhimurium</i>	9	15	10	<i>S. epidermi</i>	14	23	12	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	27	19	13	<i>E. faecalis</i>	12	13	15	<i>K. pneumoniae</i>	12	13	12	<i>P. vulgaris</i>	14	20	13	(Engin et al., 2018)
Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'extrait sur les disques																																																							
	(1)	(2)	(3)																																																					
<i>L. monocytogenes</i>	-	12	13																																																					
<i>S. aureus</i>	12	23	15																																																					
<i>E. coli</i>	13	13	12																																																					
<i>V. parahaemolyticus</i>	14	14	12																																																					
<i>B. cereus</i>	-	14	11																																																					
<i>S. typhimurium</i>	9	15	10																																																					
<i>S. epidermi</i>	14	23	12																																																					
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	27	19	13																																																					
<i>E. faecalis</i>	12	13	15																																																					
<i>K. pneumoniae</i>	12	13	12																																																					
<i>P. vulgaris</i>	14	20	13																																																					

	Extraction de l'huile essentiel (1) et extraction dans de n-hexane (99%) (2)	Diffusion sur disques	<p>Gram positif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> ATCC 25923 • <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 • <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 <p>Gram négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> ATCC 25922 • <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603 • <i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 49226 • <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>S.typhimurium</i> ATCC 14028 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th colspan="2">Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'huile/extrait sur les disques</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>S. aureus</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>S. pneumoniae</i></td> <td>7,3</td> <td>7,8</td> </tr> <tr> <td><i>S.epidermidis</i></td> <td>16,2</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td><i>K.pneumoniae</i></td> <td>6,6</td> <td>6,5</td> </tr> <tr> <td><i>N.gonorrhoeae</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>P.aeruginosa</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>S.typhimurium</i></td> <td>8,2</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'huile/extrait sur les disques		(1)	(2)	<i>S. aureus</i>	-	-	<i>S. pneumoniae</i>	7,3	7,8	<i>S.epidermidis</i>	16,2	15	<i>K.pneumoniae</i>	6,6	6,5	<i>N.gonorrhoeae</i>	-	-	<i>P.aeruginosa</i>	-	-	<i>S.typhimurium</i>	8,2	8	(Amiri et al., 2015)
Bactéries	Zone d'inhibition (mm) avec 30 µL de l'huile/extrait sur les disques																														
	(1)	(2)																													
<i>S. aureus</i>	-	-																													
<i>S. pneumoniae</i>	7,3	7,8																													
<i>S.epidermidis</i>	16,2	15																													
<i>K.pneumoniae</i>	6,6	6,5																													
<i>N.gonorrhoeae</i>	-	-																													
<i>P.aeruginosa</i>	-	-																													
<i>S.typhimurium</i>	8,2	8																													
Feuilles	Extrait méthanolique	Diffusion sur des puits créés sur l'agar (a) (500 mcg/puit) + diffusion sur disques (b) (500 mcg/disque)	<p>Gram négatif :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>* • <i>K.pneumonia</i>* • <i>N.gonorrhoeae</i>* • <i>P. vulgaris</i>* • <i>P. mirabili</i>* • <i>P.aeruginosa</i>* 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Bactéries</th> <th>a</th> <th>b</th> </tr> <tr> <th colspan="2">% de souches sensibles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>E.coli</i></td> <td>62</td> <td>52</td> </tr> <tr> <td><i>K.pneumonia</i></td> <td>42</td> <td>64</td> </tr> <tr> <td><i>N.gonorrhoeae</i></td> <td>56</td> <td>53,33</td> </tr> <tr> <td><i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i></td> <td>38</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td><i>P.aeruginosa</i></td> <td>74</td> <td>26</td> </tr> </tbody> </table>	Bactéries	a	b	% de souches sensibles		<i>E.coli</i>	62	52	<i>K.pneumonia</i>	42	64	<i>N.gonorrhoeae</i>	56	53,33	<i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>	38	32	<i>P.aeruginosa</i>	74	26	(Bazzaz et al., 2005)						
Bactéries	a	b																													
	% de souches sensibles																														
<i>E.coli</i>	62	52																													
<i>K.pneumonia</i>	42	64																													
<i>N.gonorrhoeae</i>	56	53,33																													
<i>P. vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>	38	32																													
<i>P.aeruginosa</i>	74	26																													

* Souches hospitalières

3.3.2. Effets anticancéreux

Les résultats des études évaluant les effets anticancéreux des diverses parties de *R. ribes* L. sont résumés dans le **Tableau 6**.

Une relation positive existe entre la durée d'incubation des cellules cancéreuses et la cytotoxicité des divers extraits de *R. ribes* L. (Aygün et al., 2020; Azadpour et al., 2020; Uyar et al., 2014).

En plus, de nombreuses études ont souligné l'effet cytotoxique des différentes parties de la plante de *R. ribes* L. sur la prolifération des lignées cellulaires. En effet, il a été démontré dans une étude de Çınar Ayan et al., (2021), que les extraits de rhizomes de *R. ribes* L. ont des effets antiprolifératifs sur les lignées HCT-116 et HT-29 plus puissants que ceux des extraits de tiges de la même plante. Cependant, seul l'extrait de tiges préparé dans l'hexane a montré être plus efficace dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses HCT-116 que l'extrait de rhizomes préparé dans le même solvant (Çınar Ayan et al., 2021). En plus, Uyar et al., (2014) ont effectué une étude comparative des effets cytotoxiques (leucémie HL-60) des extraits de rhizomes et de feuilles de *R. ribes* L., tous deux extraits dans de l'acétate d'éthyle. En effet, les extraits de rhizomes ont prouvé avoir des pouvoirs antiprolifératifs plus élevés que ceux des extraits de feuilles.

D'autres chercheurs ont travaillé sur l'effet du solvant d'extraction sur le pouvoir antiprolifératif de divers extraits de *R. ribes* L. Dans une étude de Al-Khatib et al., (2022), une comparaison des effets antiprolifératifs de plusieurs extraits de rhizomes de *R. ribes* L. préparés dans divers solvants a été établie. Les extraits macérés dans l'éthanol et le dichlorométhane ont été les seuls à inhiber significativement la prolifération des cellules HT-29, en plus d'une faible différence entre les pouvoirs cytotoxiques de ces deux extraits sur les cellules cancéreuses HCT-116. Un travail similaire a été effectué par Çınar Ayan et al., (2021), où l'effet antiprolifératif des extraits de rhizomes sur les même lignées cellulaires (HT-29 et HCT-116) a été évalué, mais en employant des solvants d'extraction autres que ceux testés par Al-Khatib et al., (2022). En effet, les cytotoxicités des extraits préparés dans le méthanol et dans l'acétate d'éthyle ont été respectivement les plus élevées contre HCT-116 et HT-29. La même étude a également montré que l'extrait méthanolique de tiges a été le plus efficace dans l'inhibition de la multiplication des

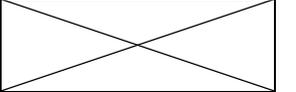
cellules du cancer colorectal HCT-116, alors que la prolifération de la lignée HT-29 a été mieux inhibée par l'extrait hexanique des tiges de *R. ribes* L. (Çınar Ayan et al., 2021).

Un résultat similaire a été émis dans une étude de Keser et al., (2019) où l'extrait méthanolique de tige de *R. ribes* L. a de même montré être efficace dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses HCT-116. Or cette dernière étude, a montré qu'il n'existe pas une grande différence entre les effets cytotoxiques des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique des tiges de *R. ribes* L. En effet, l'inhibition de la prolifération des cellules du PC-3 par l'extrait éthanolique a été légèrement supérieure à ceux des autres types d'extraits. Cependant, la multiplication des cellules des autres types de cancer dans cette étude a été faiblement plus inhibé par l'extrait méthanolique que les autres types d'extraits étudiés.

L'effet de la méthode d'extraction sur la cytotoxicité des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. a été souligné par une étude effectuée par Noori et al., (2022). Des extraits éthanoliques de rhizomes ont été préparés selon trois méthodes d'extraction : extraction par simple macération, dans un bain ultrasonique et à l'aide d'un Soxhlet. Parmi les trois moyens testés, la cytotoxicité de l'extrait préparé dans le bain ultrasonique a été la plus élevée, suivi par la cytotoxicité de l'extrait issu d'une simple macération. Finalement, l'effet antiprolifératif le moins important a été enregistré pour l'extrait préparé dans le Soxhlet. Comme pour les travaux concernant les activités antibactériennes des extraits de *R. ribes* L., les études portant sur leurs effets cytotoxiques ont été faites dans différents pays et/ou différentes régions du même pays. Il est remarquable que les extraits n'ayant pas la même origine ont donné des résultats non similaires : dans une étude de Çınar Ayan et al., (2021), la IC50 de la prolifération du cancer colorectal HTC116 d'un extrait méthanolique de tige de *R. ribes* L. était à peu près douze fois plus élevée que celle enregistrée par le même type d'extrait dans une étude de Keser et al., (2019).

Tableau 6- Etudes sur les activités anticancéreuses des différentes parties du *Rheum ribes L.*

	Type d'extrait	Méthode expérimentale	Lignée cellulaire	Résultats			Références														
Rhizomes	Extrait dans l'acétate d'éthyle	XTT	<ul style="list-style-type: none"> Leucémie promyélocytaire HL-60 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>Après 24hr</th> <th>Après 48hr</th> <th>Après 72hr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HL-60</td> <td>149</td> <td>135</td> <td>74</td> </tr> </tbody> </table>			Lignée	IC50 (µg/mL)			Après 24hr	Après 48hr	Après 72hr	HL-60	149	135	74	(Uyar et al., 2014)			
	Lignée	IC50 (µg/mL)																			
		Après 24hr	Après 48hr	Après 72hr																	
HL-60	149	135	74																		
Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2), et dans l'acétate d'éthyle (3)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> Cancer colorectal HCT-116 Cancer colorectal (adenocancer) HT-29 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HCT-116</td> <td>29,65</td> <td>672</td> <td>96,32</td> </tr> <tr> <td>HT -29</td> <td>82,68</td> <td>98,1</td> <td>75,37</td> </tr> </tbody> </table>			Lignée	IC50 (µg/mL)			(1)	(2)	(3)	HCT-116	29,65	672	96,32	HT -29	82,68	98,1	75,37	(Çınar Ayan et al., 2021)
Lignée	IC50 (µg/mL)																				
	(1)	(2)	(3)																		
HCT-116	29,65	672	96,32																		
HT -29	82,68	98,1	75,37																		
Extrait éthanolique préparé par 3 méthodes d'extraction : Soxhlet (1), macération (2), et ultrasons (3)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> Cancer colorectal Caco-2 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/ mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Caco-2</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>			Lignée	IC50 (µg/ mL)			(1)	(2)	(3)	Caco-2	60	40	13	(Noori et al., 2022)				
Lignée	IC50 (µg/ mL)																				
	(1)	(2)	(3)																		
Caco-2	60	40	13																		

	Extrait éthanolique (nanoparticule d'argent Ag NPs obtenu par synthèse verte à partir de l'extrait éthanolique)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> Cancer du sein MDA-MB-231 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="2">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>Après 24hr</th> <th>Après 48hr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MDA-MB-231</td> <td>165,6</td> <td>98,96</td> </tr> </tbody> </table>			Lignée	IC50 (µg/mL)		Après 24hr	Après 48hr	MDA-MB-231	165,6	98,96	(Aygün et al., 2020)
Lignée	IC50 (µg/mL)														
	Après 24hr	Après 48hr													
MDA-MB-231	165,6	98,96													
	Extrait éthanolique	WST-1 + Electrophorèse sur gel d'agarose	<ul style="list-style-type: none"> Cancer de la prostate PC-3 	Concentration de l'extrait (µg/mL)	Effet antiprolifératif PC-3 (24 hrs)	Electrophorèse	(Tartik et al., 2015)								
				60	Significatif										
				125	Significatif										
				250	Significatif		Fragmentation de l'ADN des cellules PC-3								
				500	Significatif										

	Extrait aqueux (1), éthanolique (100%) (2), hydroalcoolique (EtOH : H ₂ O 70 : 30) (3), extrait dans le dichlorométhane (4) et dans l'hexane (5)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer colorectal HT29 (Testé sur tous les types d'extraits) • Cancer colorectal HCT116 (testé uniquement sur les extraits (2) et (4)) 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Extrait (0-400 µg/ mL)</th> <th>Effet antiprolifératif HT29 (72 hrs)</th> <th>IC50 µg/mL HCT 116 (72 hrs)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>Non significatif</td> <td> </td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>Significatif (IC50 = 185 µg/ mL)</td> <td>87</td> </tr> <tr> <td>(3)</td> <td>Non significatif</td> <td> </td> </tr> <tr> <td>(4)</td> <td>Significatif (IC50 = 165 µg/ mL)</td> <td>93</td> </tr> <tr> <td>(5)</td> <td>Non significatif</td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Extrait (0-400 µg/ mL)	Effet antiprolifératif HT29 (72 hrs)	IC50 µg/mL HCT 116 (72 hrs)	(1)	Non significatif	 	(2)	Significatif (IC50 = 185 µg/ mL)	87	(3)	Non significatif	 	(4)	Significatif (IC50 = 165 µg/ mL)	93	(5)	Non significatif	 	(Al-Khatib et al., 2022)
Extrait (0-400 µg/ mL)	Effet antiprolifératif HT29 (72 hrs)	IC50 µg/mL HCT 116 (72 hrs)																					
(1)	Non significatif	 																					
(2)	Significatif (IC50 = 185 µg/ mL)	87																					
(3)	Non significatif	 																					
(4)	Significatif (IC50 = 165 µg/ mL)	93																					
(5)	Non significatif	 																					
Tiges	Extrait éthanolique (80%)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Papillome KB • Cancer du poumon A-549 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="2">Cytotoxicité (%) à 1000µg/mL</th> </tr> <tr> <th>Après 24hr</th> <th>Après 48hr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>KB</td> <td>70</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>A-549</td> <td>59</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	Cytotoxicité (%) à 1000µg/mL		Après 24hr	Après 48hr	KB	70	80	A-549	59	80	(Azadpour et al., 2020)							
	Lignée	Cytotoxicité (%) à 1000µg/mL																					
Après 24hr		Après 48hr																					
KB	70	80																					
A-549	59	80																					
	Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2), et dans l'acétate d'éthyle (3)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer colorectal HCT-116 • Cancer colorectal (adenocancer) HT-29 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HCT116</td> <td>182,9</td> <td>298,9</td> <td>256,6</td> </tr> <tr> <td>HT29</td> <td>275,5</td> <td>107,9</td> <td>439,1</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	IC50 (µg/mL)			(1)	(2)	(3)	HCT116	182,9	298,9	256,6	HT29	275,5	107,9	439,1	(Çınar Ayan et al., 2021)			
Lignée	IC50 (µg/mL)																						
	(1)	(2)	(3)																				
HCT116	182,9	298,9	256,6																				
HT29	275,5	107,9	439,1																				

	Extrait aqueux (1), éthanolique (2), et méthanolique (3)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer de prostate PC-3 • Cancer du sein MCF-7 • Cancer de l'ovaire A2780 • Cancer colorectal HCT-116 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PC-3</td> <td>39,59</td> <td>38,11</td> <td>42,18</td> </tr> <tr> <td>MCF-7</td> <td>26,63</td> <td>26,80</td> <td>25,46</td> </tr> <tr> <td>A2780</td> <td>19,67</td> <td>18,20</td> <td>16,76</td> </tr> <tr> <td>HCT-116</td> <td>18,38</td> <td>14,18</td> <td>14,87</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	IC50 (µg/mL)			(1)	(2)	(3)	PC-3	39,59	38,11	42,18	MCF-7	26,63	26,80	25,46	A2780	19,67	18,20	16,76	HCT-116	18,38	14,18	14,87	(Keser et al., 2019)
Lignée	IC50 (µg/mL)																											
	(1)	(2)	(3)																									
PC-3	39,59	38,11	42,18																									
MCF-7	26,63	26,80	25,46																									
A2780	19,67	18,20	16,76																									
HCT-116	18,38	14,18	14,87																									
Feuilles	Extrait dans l'acétate d'éthyle	XTT	<ul style="list-style-type: none"> • Leucémie promyélocytaire HL-60 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>Après 24hr</th> <th>Après 48hr</th> <th>Après 72hr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HL-60</td> <td>288</td> <td>252</td> <td>192</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	IC50 (µg/mL)			Après 24hr	Après 48hr	Après 72hr	HL-60	288	252	192	(Uyar et al., 2014)												
Lignée	IC50 (µg/mL)																											
	Après 24hr	Après 48hr	Après 72hr																									
HL-60	288	252	192																									
Plante entière	Extrait <u>méthanolique</u> (1) fractionné dans <u>l'hexane</u> (2), <u>l'eau</u> (3) à son tour fractionné dans <u>le butanol</u> (4)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du sein MCF-7 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Lignée</th> <th colspan="4">IC50 (µg/mL) avec une concentration de 50µg/mL</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> <th>(4)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MCF-7</td> <td>Inactive</td> <td>Inactive</td> <td>Inactive</td> <td>36,01</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	IC50 (µg/mL) avec une concentration de 50µg/mL				(1)	(2)	(3)	(4)	MCF-7	Inactive	Inactive	Inactive	36,01	(Achakzai et al., 2019)									
Lignée	IC50 (µg/mL) avec une concentration de 50µg/mL																											
	(1)	(2)	(3)	(4)																								
MCF-7	Inactive	Inactive	Inactive	36,01																								

Fruits et rhizomes	Extrait éthanolique (80%)	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Adénocarcinome gastrique AGS • Carcinome canalaire du sein MCF7 • Adénocarcinome colorectal SW742 • Carcinome pulmonaire SKLC6 • Mélanome A375 • Hépatome du foie PLC/PRF/5 • Culture cellulaire primaire de fibroblastes de prépuce foetal HFFF 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Lignée</th> <th>IC50 (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AGS</td> <td>25,37</td> </tr> <tr> <td>MCF7</td> <td>51,34</td> </tr> <tr> <td>SW742</td> <td>11,211</td> </tr> <tr> <td>SKLC6</td> <td>46,408</td> </tr> <tr> <td>A375</td> <td>21,373</td> </tr> <tr> <td>PLC/PRF/5</td> <td>67,958</td> </tr> <tr> <td>HFFF</td> <td>36,539</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	IC50 (µg/mL)	AGS	25,37	MCF7	51,34	SW742	11,211	SKLC6	46,408	A375	21,373	PLC/PRF/5	67,958	HFFF	36,539	(Sardari et al., 2009)
Lignée	IC50 (µg/mL)																				
AGS	25,37																				
MCF7	51,34																				
SW742	11,211																				
SKLC6	46,408																				
A375	21,373																				
PLC/PRF/5	67,958																				
HFFF	36,539																				
Non-précisé	Extrait méthanolique	MTT	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphome de Burkitt RAJI • Leucémie myéloïde chronique K562 • Cancer du col de l'utérus HeLa • Cancer du poumon Fen • La leucémie lymphoblastique aigüe T Jurkat 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Lignée</th> <th>% d'inhibition à 100 µg/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Raji</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>K562</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>HeLa</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Fen</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Jurkat</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Lignée	% d'inhibition à 100 µg/mL	Raji	0	K562	50	HeLa	10	Fen	10	Jurkat	0	(Esmailbeig et al., 2015)				
Lignée	% d'inhibition à 100 µg/mL																				
Raji	0																				
K562	50																				
HeLa	10																				
Fen	10																				
Jurkat	0																				

3.3.3. Effet antioxydant

En plus des activités antibactériennes et anticancéreuses, plusieurs groupes ont également exploité les activités antioxydantes des extraits de *R. ribes* L. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**.

Divers chercheurs ont comparé les effets antioxydants des différentes parties de la plante (Çınar Ayan et al., 2021; Mohammed et al., 2019; Öztürk et al., 2007; Uyar et al., 2014; Yildirim et al., 2015). Les pouvoirs de piégeage des radicaux libres de DPPH• des extraits méthanoliques de rhizomes et de tiges de *R. ribes* L. ont été presque pareils dans une étude de Çınar Ayan et al., (2021). Cependant, l'extrait méthanolique de tiges était un meilleur piègeur des radicaux libres de DPPH• que l'extrait de rhizomes dans une étude effectuée par Öztürk et al., (2007). Toutefois, et contrairement à ce qui a été rapporté dans les deux études citées précédemment, les radicaux libres de DPPH• ont été mieux piégés par l'extrait méthanolique de rhizomes que l'extrait de tiges dans une étude faite par Mohammed et al., (2019). Tant qu'aux extraits préparés dans l'acétate d'éthyle, deux études ont montré que le pouvoir antioxydant de l'extrait de rhizomes est plus puissant que celui des tiges (Çınar Ayan et al., 2021; Uyar et al., 2014). D'autre part, les extraits méthanolique et chloroformique de rhizomes ont mieux piégé les radicaux superoxydes que les extraits de tiges (Öztürk et al., 2007). Les capacités de piégeage des radicaux ABTS+• et de suppression de H₂O₂ de l'extrait méthanolique des graines de *R. ribes* L. étaient plus élevées que celles de l'extrait méthanolique des fruits. Cependant, dans la même étude les radicaux OH• ont été mieux piégés par l'extrait de graines que l'extrait de fruits (Yildirim et al., 2015).

Le **Tableau 7** montre également que plusieurs chercheurs ont étudié l'influence de la variation du solvant d'extraction sur les activités antioxydantes des extraits de *R. ribes* L.. Les mêmes solvants d'extraction (méthanol, hexane et acétate d'éthyle) ont été testés dans deux études distinctes effectuées par Çınar Ayan et al., (2021) et Mohammed et al., (2019) sur les rhizomes de *R. ribes* L. Cependant, les résultats des deux études n'étaient pas similaires. Le pouvoir de piégeage des radicaux libres de DPPH• le plus élevé était celui de l'extrait préparé dans l'acétate d'éthyle dans l'étude de Çınar Ayan et al., (2021), contrairement aux travaux de Mohammed et al., (2019), où l'extrait méthanolique de rhizomes a mieux piégé les radicaux libres de DPPH•.

Une comparaison des pouvoirs antioxydants des extraits de rhizomes préparés dans un autre groupe de solvants a été également effectué par Alkaya et al., (2019), où l'extrait hydroalcoolique (ethanol : eau) a prouvé avoir le meilleur pouvoir de piégeage des radicaux libres de DPPH•, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée.

En passant aux extractions des tiges de *R. ribes* L., il est remarquable que l'extrait méthanolique des tiges était le meilleur piègeur des radicaux libres de DPPH• dans diverses études (Çınar Ayan et al., 2021; Mohammed et al., 2019; Öztürk et al., 2007), sauf dans le cas des travaux effectués par Keser et al., (2019), où le pouvoir antioxydant le plus élevé était celui de l'extrait éthanolique de tiges.

Diverses études ont comparé l'effet de la méthode d'extraction sur les pouvoirs antioxydants des extraits testés (Alkaya et al., 2019; Noori et al., 2022). En effet, il est notable dans l'étude effectuée par Noori et al., (2022), qu'il n'existe pas une grande différence entre les pouvoirs de piégeage des radicaux libres de DPPH• des extraits provenant d'une simple macération, d'un bain ultrasonique ou du Soxhlet. Cependant, des différences entre les pouvoirs antioxydants des extraits de *R. ribes* dans l'étude faite par Alkaya et al., (2019), ont été observées, où les échantillons extraits par microondes ont mieux piégé les radicaux libres de DPPH• et ceux extraits par agitation orbitale ont enregistré les meilleurs pouvoirs de réduction d'ions ferriques (FRAP) (Alkaya et al., 2019).

Tableau 7- Etudes sur les activités antioxydantes des différentes parties du *Rheum ribes L.*

	Type d'extrait	Méthode expérimentale	Résultats			Références
Rhizomes	Extrait dans l'acétate d'éthyle	• Piégeage des radicaux DPPH•		IC50 (µg/mL)	Capacité de piégeage maximale (µg/mL)	(Uyar et al., 2014)
			Extrait de rhizomes	10,92	96,67	
	Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2), et dans l'acétate d'éthyle (3)	• Piégeage des radicaux DPPH•		IC50 (µg/mL)		(Çınar Ayan et al., 2021)
		Extrait de rhizomes	(1)	(2)	(3)	
	Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2) et dans l'acétate d'éthyle (3)	• Piégeage des radicaux DPPH•	Type d'extrait	IC50 (µg/mL)		(Mohammed et al., 2019)
			(1)	96,7		
			(2)	7483,33		
			(3)	125,03		

<p>Extrait méthanolique 50% (1) et éthanolique 70 % (2), dans l'acétonitrile 80% (3), et dans l'éther de pétrole (4) selon trois méthodes d'extraction :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ultrasons [U] • Soxhlet [S] • Microondes [M] • Agitateur orbital [O] 	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH • FRAP (Réducteur ferrique) <p>Les deux exprimé en TEAC/mL (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Extrait</th> <th colspan="4">DPPH</th> <th colspan="4">FRAP</th> </tr> <tr> <th>U</th> <th>S</th> <th>M</th> <th>O</th> <th>U</th> <th>S</th> <th>M</th> <th>O</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>17,8</td> <td>13,9</td> <td>20,6</td> <td>22,2</td> <td>46,5</td> <td>26,9</td> <td>20,7</td> <td>58,2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>21,8</td> <td>21,7</td> <td>28,9</td> <td>24,7</td> <td>62,3</td> <td>31,9</td> <td>29,6</td> <td>62,7</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>13,3</td> <td>12,1</td> <td>15,3</td> <td>10,8</td> <td>34,7</td> <td>24,8</td> <td>19,9</td> <td>50,4</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>×</td> <td>8,88</td> <td>×</td> <td>×</td> <td>×</td> <td>2,84</td> <td>×</td> <td>×</td> </tr> </tbody> </table>	Extrait	DPPH				FRAP				U	S	M	O	U	S	M	O	1	17,8	13,9	20,6	22,2	46,5	26,9	20,7	58,2	2	21,8	21,7	28,9	24,7	62,3	31,9	29,6	62,7	3	13,3	12,1	15,3	10,8	34,7	24,8	19,9	50,4	4	×	8,88	×	×	×	2,84	×	×	<p>(Alkaya et al., 2019)</p>
Extrait	DPPH				FRAP																																																			
	U	S	M	O	U	S	M	O																																																
1	17,8	13,9	20,6	22,2	46,5	26,9	20,7	58,2																																																
2	21,8	21,7	28,9	24,7	62,3	31,9	29,6	62,7																																																
3	13,3	12,1	15,3	10,8	34,7	24,8	19,9	50,4																																																
4	×	8,88	×	×	×	2,84	×	×																																																
<p>Extrait éthanolique préparé par 3 méthodes d'extraction : Soxhlet (1), macération (2), et ultrasons (3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait de rhizomes</td> <td>16</td> <td>14</td> <td>14</td> </tr> </tbody> </table>		IC50 (µg/mL)			(1)	(2)	(3)	Extrait de rhizomes	16	14	14	<p>(Noori et al., 2022)</p>																																										
	IC50 (µg/mL)																																																							
	(1)	(2)	(3)																																																					
Extrait de rhizomes	16	14	14																																																					
<p>Extrait hydroalcoolique (MeOH : H₂O)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH 	<p>IC50 = 76 µg/mL</p>	<p>(Zahedi et al., 2015)</p>																																																					
<p>Extrait aqueux (1) et éthanolique (2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>IC50 (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>25,62</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>4,73</td> </tr> </tbody> </table>		IC50 (µg/mL)	(1)	25,62	(2)	4,73	<p>(Abdulla et al., 2014)</p>																																															
	IC50 (µg/mL)																																																							
(1)	25,62																																																							
(2)	4,73																																																							

	<p>Extrait dans le méthanol (1) et dans le chloroforme (2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• • Piégeage des radicaux superoxyde • Activités de chélation des métaux 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Type d'extrait</th> <th colspan="3">(%)</th> </tr> <tr> <th>Piégeage de DPPH• à 100µg/mL</th> <th>Chélation des métaux à 50µg/mL</th> <th>Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>60,60</td> <td>25,00</td> <td>61,65</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>50,87</td> <td>15,18</td> <td>57,39</td> </tr> </tbody> </table>	Type d'extrait	(%)			Piégeage de DPPH• à 100µg/mL	Chélation des métaux à 50µg/mL	Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL	(1)	60,60	25,00	61,65	(2)	50,87	15,18	57,39	<p>(Öztürk et al., 2007)</p>				
Type d'extrait	(%)																						
	Piégeage de DPPH• à 100µg/mL	Chélation des métaux à 50µg/mL	Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL																				
(1)	60,60	25,00	61,65																				
(2)	50,87	15,18	57,39																				
<p>Tiges</p>	<p>Extrait aqueux (1), éthanolique (2), et méthanolique (3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux ABTS+• • Piégeage des radicaux DPPH• • Piégeage des radicaux OH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Type d'extrait</th> <th colspan="3">Capacité de piégeage à 500 µg/mL (%)</th> </tr> <tr> <th>ABTS+•</th> <th>DPPH•</th> <th>OH•</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>99,27</td> <td>93,49</td> <td>83,11</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>99,91</td> <td>94,21</td> <td>81,42</td> </tr> <tr> <td>(3)</td> <td>95,32</td> <td>93,78</td> <td>80,49</td> </tr> </tbody> </table>	Type d'extrait	Capacité de piégeage à 500 µg/mL (%)			ABTS+•	DPPH•	OH•	(1)	99,27	93,49	83,11	(2)	99,91	94,21	81,42	(3)	95,32	93,78	80,49	<p>(Keser et al., 2019)</p>
Type d'extrait	Capacité de piégeage à 500 µg/mL (%)																						
	ABTS+•	DPPH•	OH•																				
(1)	99,27	93,49	83,11																				
(2)	99,91	94,21	81,42																				
(3)	95,32	93,78	80,49																				
	<p>Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2), et dans l'acétate d'éthyle (3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">IC50 (µg/mL)</th> </tr> <tr> <th>(1)</th> <th>(2)</th> <th>(3)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait de tiges</td> <td>186,55</td> <td>448,13</td> <td>238,25</td> </tr> </tbody> </table>		IC50 (µg/mL)			(1)	(2)	(3)	Extrait de tiges	186,55	448,13	238,25	<p>(Çınar Ayan et al., 2021)</p>								
	IC50 (µg/mL)																						
	(1)	(2)	(3)																				
Extrait de tiges	186,55	448,13	238,25																				

<p>Extrait aqueux</p>	<ul style="list-style-type: none"> • TBARS (peroxydation lipidique) • Piégeage des radicaux DPPH• • Piégeage des radicaux superoxyde • Activités de chélation des métaux 	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>TBARS à 1000 µg/mL</td> <td>Piégeage de DPPH• à 150 µg/mL (Capacité maximale)</td> <td>Piégeage des radicaux superoxydes à 500 µg/mL</td> <td>chélation des métaux à 150 µg/mL</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="4" style="text-align: center;">(%)</td> </tr> <tr> <td>Extrait</td> <td>66</td> <td>83,9</td> <td>31,21</td> <td>14,55</td> </tr> </table>		TBARS à 1000 µg/mL	Piégeage de DPPH• à 150 µg/mL (Capacité maximale)	Piégeage des radicaux superoxydes à 500 µg/mL	chélation des métaux à 150 µg/mL		(%)				Extrait	66	83,9	31,21	14,55	<p>(Emen Tanrikut et al., 2013)</p>	
	TBARS à 1000 µg/mL	Piégeage de DPPH• à 150 µg/mL (Capacité maximale)	Piégeage des radicaux superoxydes à 500 µg/mL	chélation des métaux à 150 µg/mL															
	(%)																		
Extrait	66	83,9	31,21	14,55															
<p>Extrait dans le méthanol (1) et dans le chloroforme (2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• • Piégeage des radicaux superoxyde • Activités de chélation des métaux 	<table border="1"> <tr> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">(%)</td> </tr> <tr> <td>Type d'extrait</td> <td>Piégeage de DPPH• à 100µg/mL</td> <td>Chélation des métaux à 50µg/mL</td> <td>Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL</td> </tr> <tr> <td>(1)</td> <td>87,07</td> <td>93,71</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>< 30</td> <td>50</td> <td>30</td> </tr> </table>		(%)			Type d'extrait	Piégeage de DPPH• à 100µg/mL	Chélation des métaux à 50µg/mL	Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL	(1)	87,07	93,71	30	(2)	< 30	50	30	<p>(Öztürk et al., 2007)</p>
	(%)																		
Type d'extrait	Piégeage de DPPH• à 100µg/mL	Chélation des métaux à 50µg/mL	Piégeage des radicaux superoxydes à 50µg/mL																
(1)	87,07	93,71	30																
(2)	< 30	50	30																

	Extrait méthanolique (1), dans l'hexane (2) et dans l'acétate d'éthyle (3)	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Type d'extrait</th> <th>IC50 (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>19115,01</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>48229,05</td> </tr> <tr> <td>(3)</td> <td>19948,33</td> </tr> </tbody> </table>		Type d'extrait	IC50 (µg/mL)	(1)	19115,01	(2)	48229,05	(3)	19948,33	(Mohammed et al., 2019)		
Type d'extrait	IC50 (µg/mL)														
(1)	19115,01														
(2)	48229,05														
(3)	19948,33														
Feuilles	Extrait dans l'acétate d'éthyle	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>IC50 (µg/mL)</th> <th>Capacité de piégeage maximale (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait de feuilles</td> <td>206,28</td> <td>80,34</td> </tr> </tbody> </table>			IC50 (µg/mL)	Capacité de piégeage maximale (µg/mL)	Extrait de feuilles	206,28	80,34	(Uyar et al., 2014)				
	IC50 (µg/mL)	Capacité de piégeage maximale (µg/mL)													
Extrait de feuilles	206,28	80,34													
Fruits	Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • CUPRAC (capacité antioxydante totale) • Piégeage des radicaux ABTS+• • Activité de suppression du H₂O₂ • Piégeage des radicaux OH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>CUPRAC mM/g (acide gallique)</th> <th>Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL</th> <th>Suppression du H₂O₂ à 5mg/mL</th> <th>Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait du fruit</td> <td>2,44</td> <td>78 %</td> <td>57,87 %</td> <td>49 %</td> </tr> </tbody> </table>			CUPRAC mM/g (acide gallique)	Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL	Suppression du H ₂ O ₂ à 5mg/mL	Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL	Extrait du fruit	2,44	78 %	57,87 %	49 %	(Yildirim et al., 2015)
	CUPRAC mM/g (acide gallique)	Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL	Suppression du H ₂ O ₂ à 5mg/mL	Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL											
Extrait du fruit	2,44	78 %	57,87 %	49 %											

Graines	Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • CUPRAC (capacité antioxydante totale) • Piégeage des radicaux ABTS+• • Activité de suppression du H₂O₂ • Piégeage des radicaux OH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>CUPRAC mM/g (acide gallique)</th> <th>Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL</th> <th>Suppression du H₂O₂ à 5mg/mL</th> <th>Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait des graines</td> <td>5,30</td> <td>15 %</td> <td>33,33 %</td> <td>80 %</td> </tr> </tbody> </table>		CUPRAC mM/g (acide gallique)	Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL	Suppression du H ₂ O ₂ à 5mg/mL	Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL	Extrait des graines	5,30	15 %	33,33 %	80 %	(Yildirim et al., 2015)
		CUPRAC mM/g (acide gallique)	Piégeage des radicaux ABTS+• à 50 mg/mL	Suppression du H ₂ O ₂ à 5mg/mL	Piégeage des radicaux OH• à 5mg/mL									
Extrait des graines	5,30	15 %	33,33 %	80 %										
Fleurs	Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Capacité de piégeage de DPPH• à 300 ppm (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extrait de fleur</td> <td>89</td> </tr> </tbody> </table>		Capacité de piégeage de DPPH• à 300 ppm (%)	Extrait de fleur	89	(Shahi et al., 2016)						
		Capacité de piégeage de DPPH• à 300 ppm (%)												
Extrait de fleur	89													
	Extraction de l'huile essentiel (1) et extraction dans de n-hexane (99%) (2)	<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux DPPH• 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Type d'extrait</th> <th>IC50 (µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(1)</td> <td>565</td> </tr> <tr> <td>(2)</td> <td>325</td> </tr> </tbody> </table>	Type d'extrait	IC50 (µg/mL)	(1)	565	(2)	325	(Amiri et al., 2015)				
Type d'extrait	IC50 (µg/mL)													
(1)	565													
(2)	325													

3.3.4. Autres effets thérapeutiques

En plus des activités biologiques déjà mentionnées, les extraits de *Rheum ribes* L. ont montré dans plusieurs études des effets thérapeutiques divers.

Au niveau de l'effet hypoglycémiant, une étude in vitro sur des cellules pancréatiques MIN6, a montré que l'extrait aqueux des rhizomes de *Rheum ribes* L. stimule la sécrétion de l'insuline (Kasabri et al., 2012). L'extrait aqueux de rhizomes de *R. ribes* L. a également réussi dans une étude in vivo à réduire le taux de glucose sanguin (Naqishbandi et al., 2009), de cholestérol, de triglycérides, d'urée et de créatinine, et à rétablir les structures rénales endommagées chez des rats diabétiques (Hamzeh et al., 2014). Plusieurs autres études ont pareillement confirmé le pouvoir hypoglycémiant des extraits de rhizomes de *Rheum ribes* L. (Adham and Naqishbandi, 2015; Meydan et al., 2022; Ozbek et al., 2004; Raafat et al., 2014).

D'autres études ont montré que la *Rheum ribes* L. a des effets thérapeutiques potentiels pour le traitement des maladies neurologiques. En effet, Zahedi et al., (2015), ont montré par une étude in vivo que les rhizomes de *R. ribes* L. peuvent nettement éviter les troubles de la mémoire et qu'ils présentent des effets thérapeutiques potentiels pour les maladies neurologiques, telles que la maladie d'Alzheimer. Des études cliniques prospectives à double aveugle ont également montré que les extraits hydroalcooliques des tiges de *R.ribes* L. présentent des effets thérapeutiques sur divers problèmes psychiques comme l'anxiété, les troubles dépressifs majeurs (Sayyah et al., 2009), et le trouble obsessionnel compulsif (OCD) (Sayyah et al., 2011).

Une étude in vivo sur des extraits de feuilles de *Rheum ribes* L. a montré que ceux-ci ont des effets thérapeutiques sur l'ulcère gastrique qui est une maladie digestive (Sindhu et al., 2010). En plus, une autre étude cliniques a montré que les extraits aqueux de fruits de *R.ribes* L. traite la diarrhée dysentérique chez les enfants (Khiveh et al., 2017).

4. La technologie de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC)

La technologie de la "Détente Instantanée Contrôlée (DIC)" est un traitement hydrothermo-mécanique qui a été initialement initiées à partir des notions théoriques d'expansion menées par Professeur K. ALLAF en 1989. En effet, le principe du traitement par DIC est fondé sur la thermodynamique de l'instantanéité et du phénomène d'autovaporisation couplé aux changements de nombreuses matrices biologiques à usage pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, etc. Jusqu'à présent, plusieurs brevets ont été déposés (Allaf et al., 1997, 1993, 1992) mettant ainsi en œuvre la définition et les applications de cette technologie hautement innovante.

En plus de ces trois brevets, des centaines d'études expérimentales soulignant l'efficacité de cette technologie ont été publiées jusqu'à présent. En effet, divers domaines d'activités ont été inclus dans le spectre de potentialité de la technologie DIC : le séchage et la texturation des produits végétaux, notamment des fruits (Alonzo-Macías et al., 2013; Gao et al., 2006; Iguedjtal et al., 2008; Li et al., 2019, 2021, 2020; Mounir et al., 2011; Setyoprato et al., 2012), des légumes (Albitar et al., 2011; Iguedjtal et al., 2008; Louka et al., 2004; Louka and Allaf, 2004; Nguyen et al., 2014; Peng et al., 2018; Sahyoun et al., 2016, 2016; Téllez-Pérez et al., 2012) et des céréales (Allaf and Allaf, 2016; Chakraborty et al., 2019; Maache-Rezzoug et al., 2010, 2008; Pilatowski et al., 2010; Zarguili et al., 2006). Le séchage des aliments d'origine animale a été également effectué, comme par exemple le lait écrémé (Mounir et al., 2010), le blanc de poulet (Mounir, 2015), le saumon atlantique et le thon (Haddad et al., 2004) ainsi que la crevette (Mounir et al., 2020).

En plus du séchage des aliments, la technologie DIC a été également employée dans l'optimisation de l'extraction de molécules actives d'origine végétale, qui gagnent de plus en plus de l'importance dans l'industrie pharmaceutique (les composées phénoliques, les huiles essentiels, etc.) et alimentaire (les huiles végétales) au détriment des molécules chimiques synthétiques (Perveen and Al-Taweel, 2019). Cependant, l'extraction des molécules actives des plantes est souvent caractérisée par de faibles rendements et des cinétiques d'extraction trop longues. Ainsi, de nouvelles technologies capables d'améliorer l'extraction ont été mises en œuvre (Pech-Almeida et al., 2021). À cet égard, la technologie de DIC, un process vert et durable (Pech-Almeida et al., 2021), s'est avérée

être un outil clé pour intensifier l'extraction des molécules actives des matières végétales en augmentant le rendement et en améliorant la qualité de l'extrait.

En effet, la DIC est un traitement qui intensifie considérablement les interactions solide-fluide grâce à son effet sur l'augmentation de la porosité de la matrice solide. En d'autres termes, les modifications de la texture produites suite au traitement par DIC se traduisent par une augmentation de la diffusivité des solvants au sein de la matrice solide (Mounir et al., 2014).

Diverses études ont souligné l'effet du traitement par DIC sur le rendement d'extraction des molécules bioactives, notamment des polyphénols. Sánchez-Valdepeñas et al., (2015), ont traité par DIC la poudre de rafle de raisin. Les résultats ont indiqué que le traitement par DIC a augmenté la disponibilité des acides phénoliques (acide gallique, caféique et ellagique), d'un flavonoïde (la quercétine) et d'un stilbène (la resvératrol). Les résultats d'une autre étude ont montré que le traitement par DIC a permis d'augmenter les quantités extraites de composés phénoliques à partir des sous-produits d'orange, en particulier l'hesperidine et la rutine (Louati et al., 2019). En plus, le traitement par DIC des grains de café vert (Kamal and Allaf, 2013), des feuilles d'olive (Mkaouar et al., 2015) et du sumac (Elaydi et al., 2014) a permis d'augmenter le contenu phénolique total par rapport à la matière première non traitée.

5. Conclusion

La première partie de ce chapitre est un bref rappel des polyphénols naturels et de leurs sous groupes classés selon leur structure en deux familles de composés : les flavonoïdes et les non flavonoïdes. La deuxième partie est consacrée à la présentation des activités biologiques des composés phénoliques bruts, plus particulièrement ceux qui ont été détectés dans les extraits de la plante de *R. ribes* L.

Cette deuxième partie de bibliographie est suivie par une description botanique de la plante de *R. ribes* L. et des activités biologiques de ses différentes parties. En effet, des dizaines d'études dans plusieurs pays se sont concentrées sur les rhizomes de *Rheum ribes* L. comme étant une riche source de molécules bioactives à effets thérapeutiques. Dans la plupart des cas, il s'agissait d'études comparatives : soit en comparant le contenu phénolique des rhizomes dans différents solvants organiques, soit en comparant le contenu phénolique des différentes parties de la même plante (rhizomes, tige, feuilles,

etc.) extraites dans différents solvants. La dernière partie de ce chapitre présente un aperçu des principales applications de la DIC dans divers domaines et de son potentiel comme une technologie prometteuse de texturation.

Chapitre II
**Matériel et méthodes
expérimentales**

1. Introduction

Ce chapitre décrit les dispositifs et les méthodes expérimentaux de l'étude, comprenant les étapes de préparation des divers extraits de rhizomes, le traitement par la technologie DIC, les méthodes du criblage photochimique des extraits, l'appareillage de détection et de quantification (HPLC-UV et UHPLC-MS) des molécules d'intérêt recherchées, ainsi que les protocoles expérimentaux adoptés pour l'évaluation des activités biologiques des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. Ce chapitre présente également une explication détaillée des plans d'expériences et des méthodes statistiques utilisées pour le traitement des données y provenant.

2. Matériel

2.1. Matière première

2.1.1. Matière première de l'étude

Les lots de rhizomes de *R. ribes* L. ont été collectés dans la région de Chouf, Mont Liban (Liban), à une altitude de 1140 mètres. Tous les lots de rhizomes ont été bien nettoyés à sec afin de supprimer les débris de sol et la poussière. Par la suite, ils ont été étalés sur une planche dans un environnement sombre et sec jusqu'au moment de leur traitement par DIC.

2.1.2. Détermination botanique de la plante

La plante de *Rheum ribes* L. a été identifiée par le Docteur botaniste Hélène Rizk (Université Libanaise, faculté des sciences agronomiques et de médecine vétérinaire). A l'issue de l'identification botanique, un spécimen (numéro de référence P13.17/3) a été déposé à l'Herbarium « Georges et Henriette Tohme », situé à l'Université Libanaise, faculté des sciences, Hadat.

2.1.3. Détermination de la teneur en eau initiale

Toute matière est composée d'une fraction aqueuse et d'une fraction sèche, aussi définie comme la matière sèche (MS). La teneur en eau (W) d'un produit est définie comme le rapport de la masse de la fraction eau (m_e) par rapport à la masse de la fraction sèche (m_{MS}) **(1)**.

$$W = \frac{m_e}{m_{MS}} \quad (1)$$

La teneur en eau des rhizomes de *Rheum ribes* L. a été déterminée sur quatre lots de trois grammes. Ces derniers ont été séchés dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. La masse perdue durant le séchage représente « m_e » et la masse résiduelle représente « m_{MS} ».

2.1.4. Préparations préliminaires de la matière première

Dans notre étude on a adopté quatre plans d'expériences (DoE pour Design of Experiments). Pour le premier plan d'expériences (DoE 1), les rhizomes de *R. ribes* L. ont été coupés en rondelles de 5-7 mm d'épaisseur à l'aide d'un scieur électrique de bois avant qu'ils soient traités par DIC (**Figure 11-A**).

Cependant, pour le reste des plans d'expériences (DoE2 à DoE4) les rhizomes ont d'abord été broyés par Grindomix, un broyeur mécanique Retch (Haan, Allemagne), puis tamisés. Les particules ayant un diamètre compris entre 0,4 et 2 mm ont été finalement retenues (**Figure 11-B**).

Nous avons pris soin de réaliser le broyage des rhizomes uniquement la veille de leur traitement par DIC. En effet une augmentation de la surface de contact de la matière première avec l'oxygène peut entraîner des risques d'oxydation des molécules d'intérêt. Ainsi, afin de limiter ces derniers, nous avons réalisé l'opération de broyage des matrices au plus près, temporellement, de la réalisation du traitement par DIC.



Figure 11- Les rhizomes de *R. ribes* L. coupés en des rondelles (A) et broyés en fine poudre (B)

Dans le cadre du DoE 3, nous avons souhaité étudier l'impact de la teneur en eau initiale de la matière première. La variation de ce paramètre a été réalisée en pulvérisant de l'eau sur la poudre de rhizomes, jusqu'à atteindre les taux d'humidité désirés.

2.2. Réactifs, solvants et standards chimiques

2.2.1. Criblage phytochimique et activité antioxydante

Le réactif de Folin Ciocalteu, le chlorure d'aluminium, le carbonate de sodium et les étalons de quercétine, d'acide gallique et d'acide L-ascorbique ont tous été obtenus auprès de Sigma-Aldrich Co. (Schnelldorf, Allemagne). Le méthanol de qualité analytique et l'éthanol absolu ont été achetés auprès de Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH) a été acquis auprès du groupe Merck (Fontenay sous Bois, France).

2.2.2. Tests de sensibilité aux antimicrobiens

Deux souches bactériennes d'*Escherichia coli* (ATCC® 25922) et de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) de la marque « Kwik-Stik » ont été achetées de ATCC. Les milieux de cultures gélifiés Macconkey (Scharlau, LOT 108944), Chapman (Liofilchem LOT 032321501) et Mueller Hinton (Liofilchem LOT 061721502) ont été achetés auprès de Biodiagnostic, Liban. Le bouillon de Mueller Hinton (Oxoid LOT 1613063) nous a été fourni par l'institut libanais de recherche agronomique (LARI, Liban).

2.2.3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC-UV) et ultra haute performance (UHPLC-MS)

Les molécules standards d'émodine, d'aloé-émodine, de chrysophanol, de physcion, de rhaponticine et de Kaempferol ont été fournies par Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acétonitrile, le méthanol et l'hexane de qualité HPLC ont été obtenus auprès de Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). L'acide acétique (>99,8 %) a été acquis auprès de Sigma-Aldrich Co. (Schnelldorf, Allemagne).

2.2.4. Culture cellulaire

Le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO, riche en glucose et sans glutamate), le supplément de croissance cellulaire FBS (Fœtal Bovine Serum) et la trypsine ont été tous fournis par Dutscher, France. Le solvant de solubilisation DMSO

(diméthylsulfoxyde) et le sel de tetrazolium (MTT) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. La lignée cellulaire A2058 (ATCC® CRL-11147) a été fournie par LGC Promochem, France.

3. Méthodes expérimentales

3.1. La technologie de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC)

3.1.1. Présentation de l'équipement de la Détente Instantanée Contrôlée

Allaf et al., (1992), ont défini entièrement le dispositif expérimental de la technologie DIC et ont largement décrit la machine adéquate. Cette dernière est principalement composée de plusieurs éléments, comme le montre la **Figure 12** :

- Une chambre de traitement **(1)**, où la matière première est placée pour être traitée
- Un système de vide composé :
 1. D'un réservoir à vide d'un volume 10 fois supérieur à celui de la chambre de traitement doublé d'une enveloppe de refroidissement **(3)** (Allaf et al., 2011)
 2. D'une pompe à vide pour le maintien de la basse pression dans le réservoir à vide (5 kPa) **(4)**
 3. D'une vanne pneumatique à ouverture instantanée de grande section séparant la chambre de traitement du système de vide **(2)**.

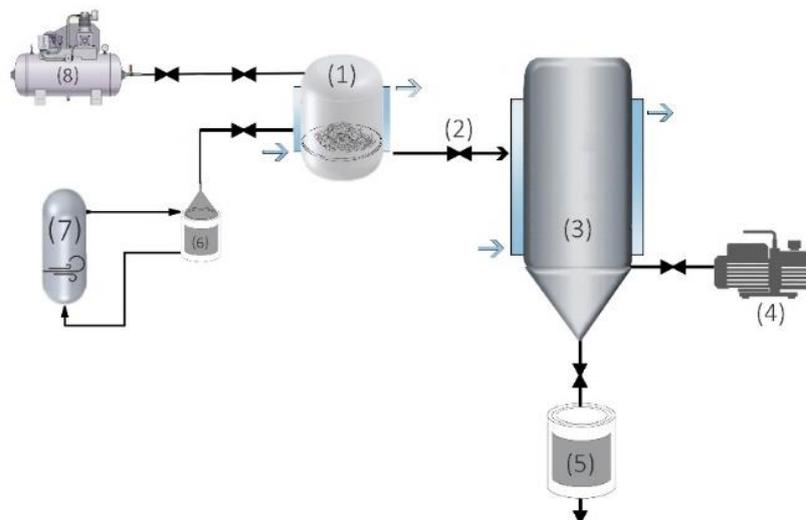


Figure 12- Schéma de la DIC

(1) Chambre de traitement ; (2) Vanne pneumatique ; (3) Réservoir à vide ; (4) Pompe à vide ; (5) SAS ; (6) Piège à condensats ; (7) Chaudière ; (8) Compresseur d'air (Abi Aad et al., 2022)

3.1.2. Le principe de fonctionnement de la Détente Instantanée Contrôlée DIC

Les différentes étapes qui se déroulent dans la chambre de traitement au cours d'un traitement par DIC typique sont présentées dans la **Figure 13**.

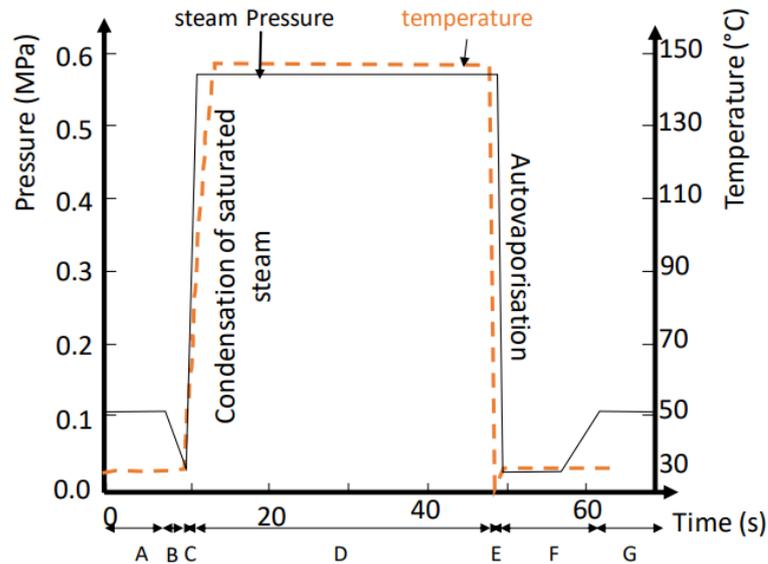


Figure 13- Les différentes étapes thermodynamiques d'un traitement DIC (Jablaoui, 2018)

- Etape A : Tout d'abord la matière traitée est placée dans la chambre de traitement.
- Etape B : Une chute de pression initiale vers le vide est créée dans le but d'expulser l'air de la chambre de traitement agissant comme un isolant entre la vapeur saturée et la matière à traiter.
- Étape C : La vapeur saturée à haute pression est injectée. En se basant sur l'équation d'Antoine pour l'eau pure on peut affirmer que l'augmentation de la pression de vapeur est couplée d'une augmentation de la température au sein de la chambre de traitement. Cette étape implique la condensation de la vapeur sur la surface froide de la matière première. Donc il s'agit principalement d'un chauffage à la vapeur d'eau saturée pour une courte durée. Le coefficient de transfert thermique de l'air (convection naturelle), de la vapeur surchauffée, de l'huile, et de l'eau chaude (convection forcée) est compris entre 5 et 6000 $W.m^{-2}.K^{-1}$. Cependant, pour la vapeur saturée en condensation, le coefficient de transfert thermique est compris entre 6000 et 120 000 $W.m^{-2}.K^{-1}$. C'est la chaleur latente libérée lorsque la vapeur se condense sur les parois froides de la matière traitée qui entraîne un

chauffage bien plus rapide et nettement plus instantané que dans le cas du chauffage à l'eau chaude. À la suite de l'injection de la vapeur saturée, les particules traitées sont soumises à deux types de transferts : le transfert de masse de l'eau condensée et le transfert de la chaleur provenant de la vapeur saturée.

- Etape D : L'injection de vapeur saturée est maintenue pendant une certaine période afin de garantir un niveau relativement uniforme de température et d'humidité au sein de la matrice traitée, sachant que la diffusion effective (D_{eff}) de la chaleur créée par la vapeur d'eau ($10^{-6}\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) est plus rapide que la diffusion de l'eau condensée ($10^{-10}\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) dans le milieu poreux traité (Mounir et al., 2011).
- Etape E : Le plateau haute pression/haute température est ensuite suivi d'une brusque chute de pression vers le vide (5 kPa). La matière traitée, comme tout corps chauffé puis refroidi, cherche à atteindre son équilibre thermique selon les lois classiques de transfert de chaleur. Cependant, l'instantanéité du phénomène de chute de pression (la phase E qui dure moins que 2 ms), ne permet pas l'application des lois de la thermodynamique conventionnelle ce qui aboutit à atteindre l'équilibre thermique par évaporation de l'eau contenue dans le produit, contrairement à l'évaporation classique qui se produit grâce à une source de chaleur externe (par exemple les rayons solaires, une étuve de séchage, etc...). C'est le phénomène d'autovaporisation où la quantité de chaleur nécessaire pour l'évaporation de l'eau et le refroidissement du système est fournie par la matière traitée elle-même. Le produit alors revient instantanément à sa température d'équilibre inversement à un produit chauffé d'une manière conventionnelle qui met plusieurs minutes voire plusieurs heures pour se refroidir et atteindre son équilibre thermique.

Le phénomène d'autovaporisation présente alors deux avantages. En premier temps, il contribue à la modification des caractéristiques structurelles (porosité et surface spécifique) et par conséquent à l'amélioration de la diffusivité et de la perméabilité au sein de la matière traitée (**Figure 14**) (Allaf et al., 2011). En plus du premier avantage, l'autovaporisation est responsable de la conservation de la qualité de certaines molécules actives et thermosensibles grâce au refroidissement rapide de la matière traitée (Berka-Zougali et al., 2010), à titre d'exemple les oligosaccharides (Ben Amor et al., 2008) et les flavonoïdes (Ben Amor and Allaf, 2009), etc.

- Etape F : La chambre de traitement est soumise au vide total initialement créé dans le réservoir à vide.
- Etape G : retour à la pression atmosphérique et ouverture de la chambre de traitement pour la récupération de l'échantillon traité.

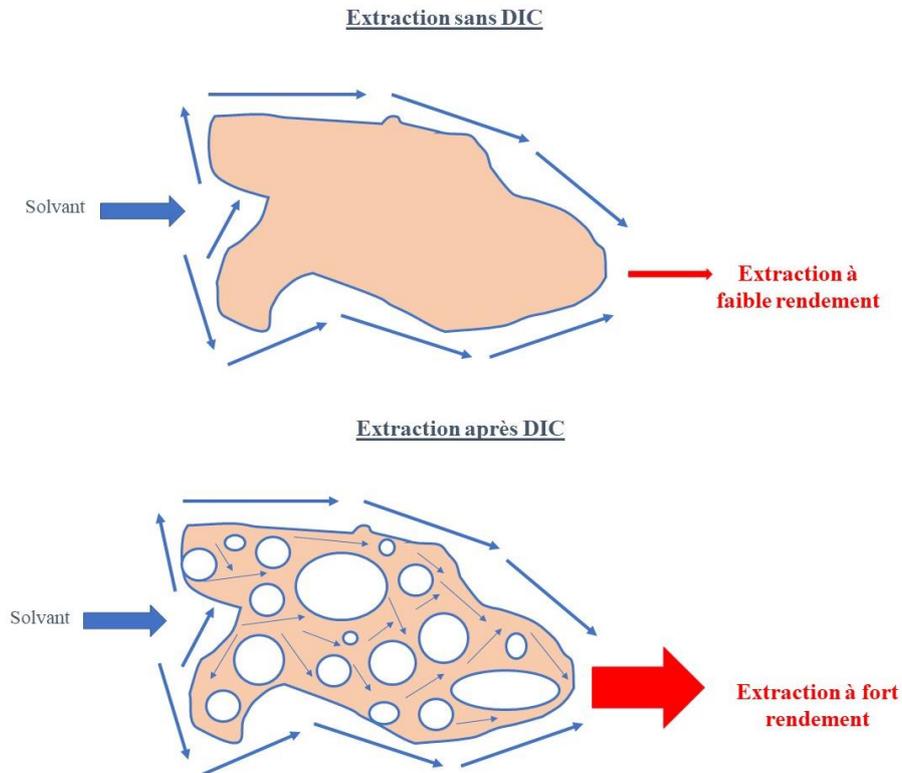


Figure 14- Modification des caractéristiques structurales de la matière traitée par DIC

3.2. La méthodologie des plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences existe pour répondre aux problèmes d'optimisation. Elle est adoptée surtout dans le domaine industriel où on cherche à prendre des décisions en un minimum de temps et en se basant sur l'expérience. Cette méthode cherche à ne faire que les expériences pertinentes, pour en tirer le maximum de renseignements. En d'autres termes, il s'agit simplement de sélectionner et d'aborder uniquement les essais qui seront suffisants pour informer l'expérimentateur sur l'effet de la variation des paramètres expérimentaux sur les variables réponses. Cela permet par la suite d'établir des lois empiriques en réponse aux résultats observés.

3.2.1. Plan d'expériences central composite

Plusieurs types de plans d'expériences existent et le choix d'application de l'un ou de l'autre dépend des objectifs que l'expérimentateur vise. Dans notre étude, nous avons adopté les plans centraux composites dont le but est d'étudier des relations de premier et de deuxième ordre (linéaire et quadratique respectivement), entre les paramètres expérimentaux et les variables dépendantes (ou variables réponses). En effet, nous appelons paramètre expérimental tout facteur, d'ordre qualitatif ou quantitatif, ayant le pouvoir d'influencer la variable réponse (Issaadi-Hamitouche, 2016).

Chaque facteur est limité dans une marge de valeurs précisées par l'expérimentateur et par conséquent, chaque facteur présente différents niveaux (Goupy and Creighton, 2006). Dans un plan d'expériences, la combinaison des niveaux des différents paramètres expérimentaux est appelée « traitement ou essai », dont la quantité dépend du nombre de facteurs sélectionnés. Plus précisément, dans un plan central composite, chaque paramètre présente 5 niveaux ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$). La **Figure 15** montre la combinaison des niveaux qui donne trois types d'essais :

- Les points factoriels (dont le nombre dépend du nombre de paramètres, et si k est le nombre de paramètres alors ces points sont au nombre de 2^k) : il s'agit des niveaux (-1) et $(+1)$.
- Les points axiaux (dont le nombre dépend aussi du nombre de paramètres, et si k est le nombre de paramètres, alors ces points sont au nombre de $2*k$) : il s'agit des niveaux $+\alpha$ et $-\alpha$.
- Les points centraux : il s'agit des répétitions du niveau 0 dont le nombre dépend du choix de l'expérimentateur.

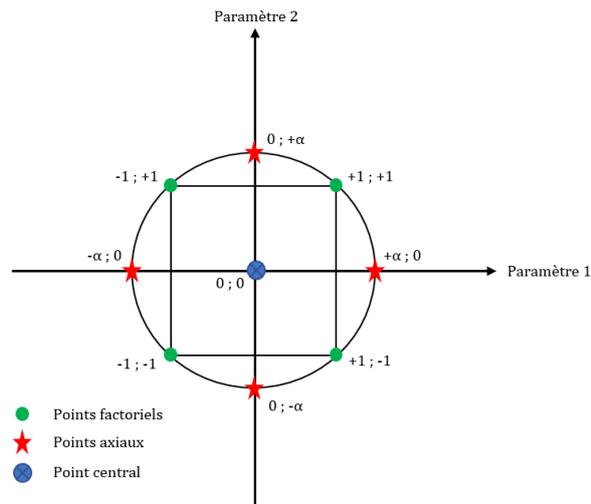


Figure 15- Représentation d'un plan central composite à deux variables

3.2.2. Outils analytiques et statistiques des plans d'expériences

3.2.2.1 Diagramme de Pareto pour les effets standards

Les effets des interactions linéaire et quadratique des paramètres expérimentaux sur les variables de réponse sont représentés graphiquement par le diagramme de Pareto. Les paramètres sont classés selon l'ordre décroissant de leur effet sur la variable dépendante en question. La longueur des barres est proportionnelle à l'intensité de l'effet de la variable indépendante sur la réponse : effet du facteur $B > A > D > E$ (Figure 16). Seules les barres qui dépassent la ligne verticale en rouge (correspondant à un niveau de fiabilité de 95%) indiquent un niveau de variation statistiquement significative.

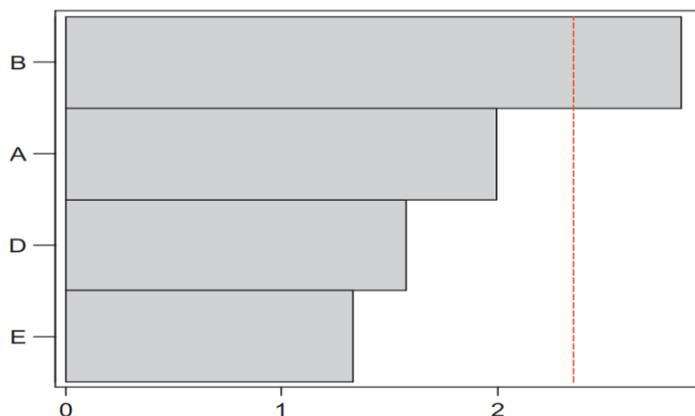


Figure 16- Diagramme de Pareto pour les effets standards (Antony, 2014a)

3.2.2.2 Tracé des effets principaux

Le tracé des effets principaux est un graphique des valeurs de réponse moyennes à chaque niveau d'une variable indépendante. Ce type de graphique sert à déterminer le signe de la corrélation qui existe entre une certaine réponse et un paramètre expérimental. Si l'effet d'une variable est positif, cela implique que la réponse moyenne est plus élevée à un niveau élevé plutôt qu'à un niveau bas du paramétrage. En revanche, si l'effet est négatif, cela signifie que la réponse moyenne au réglage bas du paramètre est supérieure à celle au niveau haut (Antony, 2014b).

3.2.2.3 Méthode de surface de réponse

Une réponse correspond à chaque point du domaine d'étude et à l'ensemble de tous les points correspond un ensemble de réponses, qui se localise sur une surface dite « la surface de réponse » (Figure 17).

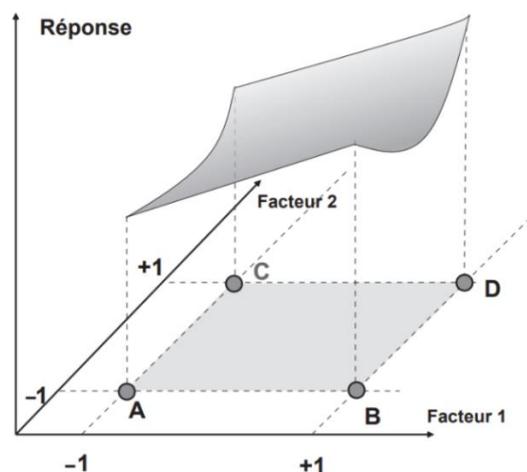


Figure 17- L'ensemble des réponses aux points du domaine d'étude qui forme la surface de réponse
(Goupy and Creighton, 2006)

De la Méthode de Surface de Réponse (MSR) résulte une équation polynomiale du second degré (2), qui quantifie les effets individuels, l'interaction et les effets quadratiques des paramètres expérimentaux et qui sert à optimiser les paramètres opératoires. Les valeurs des différentes variables de réponse ont été traitées statistiquement par Statgraphics Centurion XV (version 15.2.06).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 + \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Où Y = réponse ; β_0 , β_i , β_{ii} et β_{ij} = coefficients de régression ; X_i et X_j = paramètres expérimentaux et ε = erreur expérimentale.

3.2.3. Plan d'expériences dans le traitement et l'extraction des molécules bioactives des rhizomes de *Rheum ribes* L.

Le choix du nombre de paramètres opératoires du traitement par DIC est d'une importance cruciale. En se basant sur les études antérieures et l'expérience de l'équipe de recherche, nous avons réalisé le DoE 1 comme un essai préliminaire. Le but était d'évaluer l'impact du traitement sur les rhizomes et, par la suite, de confirmer les principaux paramètres opératoires des essais à venir.

Dans le cadre de notre étude, nous avons adopté quatre plans d'expériences. Le premier, le deuxième et le quatrième plan d'expériences (DOE 1, 2 et 4) étaient à deux paramètres expérimentaux : la pression de vapeur saturée et le temps de traitement (**Tableau 8**, **Tableau 10** et **Tableau 14**). Par conséquent, ces plans se composaient de 13 essais (**Tableau 9**, **Tableau 11** et **Tableau 15**). En revanche, le troisième plan d'expériences était à trois paramètres expérimentaux : la teneur en eau W (g H₂O/g MS), mais aussi les deux autres paramètres adoptés préalablement (**Tableau 12**). Ce plan a donc comporté 22 essais expérimentaux (**Tableau 13**).

Tableau 8- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 1

Niveau (valeurs codées)	- α	-1	0	+1	+ α
Pression de vapeur saturée (kPa)	300	360	500	640	700
Temps de traitement (s)	20	29	50	71	80

α (distance axiale) = $\sqrt[4]{2^k}$, $\alpha = 1,414$ pour $k= 2$

Tableau 9- Les essais expérimentaux du DoE 1

N°	Variables	
	Pression de vapeur saturée	Temps de traitement
	(kPa)	(s)
1,4,7,10 & 13	500	50
2	700	50
3	500	80
5	640	71
6	640	29
8	360	29
9	360	71
11	300	50
12	500	20

Tableau 10- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 2

Niveau (valeurs codées)	- α	-1	0	+1	+ α
Pression de vapeur saturée (kPa)	200	260	400	540	600
Temps de traitement (s)	10	14	25	36	40

α (distance axiale) = $\sqrt[4]{2^k}$, $\alpha = 1,414$ pour $k= 2$

Tableau 11- Les essais expérimentaux du DoE 2

N°	Variables	
	Pression de vapeur saturée	Temps de traitement
	(kPa)	(s)
1,4,7,10 & 13	400	25
2	600	25
3	400	40
5	540	36
6	540	14
8	260	14
9	260	36
11	200	25
12	400	10

Tableau 12- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 3

Niveau (valeurs codées)	- α	-1	0	+1	+ α
Pression de vapeur saturée (kPa)	100	260	225	540	350
Temps de traitement (s)	10	14	20	36	30
Teneur en eau de la matière (g H ₂ O/g MS)	0,2	0,6	1,2	1,8	2,2

α (distance axiale) = $\sqrt[4]{2^k}$, $\alpha = 1,681$ pour $k= 3$

Tableau 13- Les essais expérimentaux du DoE 3

N°	Variables		
	Pression de vapeur saturée (kPa)	Temps de traitement (s)	Teneur en eau (g H ₂ O/g MS)
1,4,7,10, 13,16,19 et 22	225	20	1,20
2	225	30	1,20
3	225	20	2,20
5	350	20	1,20
6	100	20	1,20
8	150	20	1,80
9	150	14	0,61
11	300	26	0,61
12	300	14	1,80
14	300	14	0,61
15	150	14	1,80
17	225	10	1,20
18	300	26	1,80
20	150	26	0,61
21	225	20	0,20

Tableau 14- Les niveaux des variables indépendantes de la DIC du DoE 4

Niveau (valeurs codées)	- α	-1	0	+1	+ α
Pression de vapeur saturée (kPa)	60	70	110	140	160
Temps de traitement (s)	5	8	15	22	25

α (distance axiale) = $\sqrt[4]{2^k}$, $\alpha = 1,414$ pour $k= 2$

Tableau 15- Les essais expérimentaux du DoE 4

N°	Variables	
	Pression de vapeur saturée (kPa)	Temps de traitement (s)
1,4,7,10 & 13	110	15
2	160	15
3	110	25
5	140	22
6	140	8
8	70	8
9	70	22
11	60	15
12	110	5

La première étape d'un traitement par DIC consiste à placer l'échantillon à traiter dans un panier métallique perforé, qui a son tour sera installé dans la chambre de traitement (**Figure 18**). Dans notre cas, cette opération a été effectuée de 2 façons : quand les rhizomes étaient sous forme de rondelles, ils étaient directement déposés dans la chambre de traitement ; alors que les rhizomes broyés ont été emballés dans des filtres d'une épaisseur fine et perméable à la vapeur d'eau avant leur traitement.



Figure 18- Photo du panier métallique perforé de la DIC

3.3. Les méthodes de caractérisation de la matière et évaluation de l'impact de la DIC

3.3.1. Étalonnage d'une solution aqueuse de rhizomes broyés de *R. ribes* L.

Dans le but d'établir une relation entre l'indice de réfraction de la solution aqueuse de *R. ribes* L. et sa concentration en matière sèche, on a macéré 10 grammes de rhizomes dans de l'eau distillée pour une durée de 24 heures, puis grâce à un refractomètre ATAGO smart-1, on a mesuré l'indice de réfraction de la solution de macération. Un certain volume de cette dernière a par la suite été déposé dans une étuve de séchage à 105°C pendant 24 heures. Grâce à cette solution mère dont on a connu son indice de réfraction versus sa concentration en matières sèches, et à la suite de plusieurs dilutions, on a établi une courbe d'étalonnage de la solution de macération en triplicata (**Figure 19**).

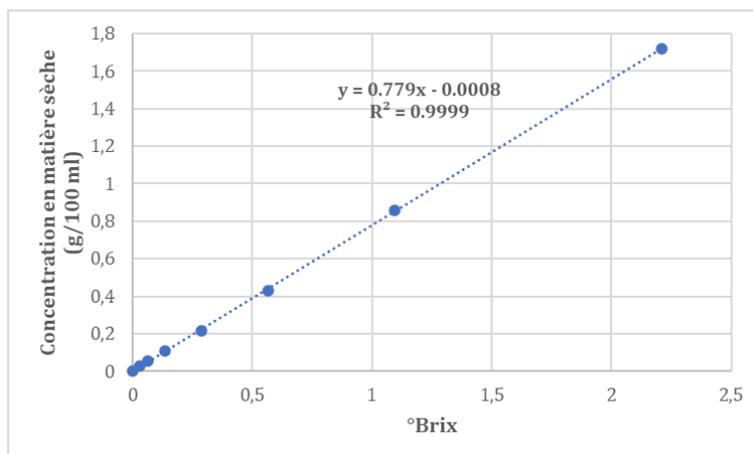


Figure 19- Concentration en matières sèches (g/100mL) de la solution aqueuse de *R. ribes L.* en fonction de l'indice de réfraction (°Brix)

3.3.2. Protocoles d'extractions de l'étude

3.3.2.1 Extraction aqueuse

Environ 10 grammes d'échantillons traités et non-traités par DIC (MP qui représente la matière première) ont subi une macération de 24 heures dans 100 mL d'eau distillée sous agitation magnétique constante et à température ambiante. Cette étape a été suivie d'une filtration sous vide à travers des papiers filtres Whatman n° 1 et d'une congélation à -18°C pendant 48 heures. Ensuite, la lyophilisation des différentes solutions congelées a été réalisée à -55 °C sous 7,9 Pa à l'aide d'un lyophilisateur Martin Christ- Alpha 1-2 LD plus (Harz, Allemagne). Les extraits lyophilisés ont été conservés dans des récipients en verre ambré, à température ambiante, jusqu'à leur utilisation.

Pour le DoE 2, l'extraction a été combinée avec un suivi de la cinétique de réhydratation en triplicata de tous les échantillons, suivant des intervalles de temps et pour une durée qui couvre l'étape de la macération. Le but de cette cinétique de réhydratation est d'évaluer la variation de la quantité d'extrait diffusant de la racine vers l'eau selon la courbe d'étalonnage déjà établie

3.3.2.2 Extraction alcoolique et hydroalcoolique

Les extraits alcooliques et hydroalcooliques ont été préparés selon le même protocole que les extraits aqueux hormis la macération qui a eu lieu dans de l'éthanol absolu en extraction alcoolique et dans de l'éthanol 70% en extraction hydroalcoolique. L'éthanol a été ensuite évaporé grâce à un rotavapeur (à 25°C) connecté à une pompe à vide (100

mbar). Un volume d'eau distillée a été ajouté dans le ballon avant de passer à l'étape de congélation et de lyophilisation.

3.3.3. Détermination de la teneur totale en polyphénol (TPC)

3.3.3.1 Principe de la méthode

Le test de Folin-Ciocalteu est l'un des tests les plus populaires pour l'analyse du contenu phénolique (Singleton et al., 1999). Le principe du dosage est basé sur une réaction de réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique). La réaction est effectuée dans un milieu alcalin et en présence de composés phénoliques entraînant la production de bleu de molybdène-tungstène, mesurable par spectrophotométrie, et dont l'intensité augmente linéairement avec la concentration phénolique dans le milieu réactionnel (Malta and Liu, 2014).

3.3.3.2 Protocole adopté

La mesure du contenu phénolique total des extraits traités et non-traités (MP) par DIC a été effectuée selon la méthode décrite par Wong et al., (2006), avec de légères modifications. Il s'agit de mélanger 100 µL de l'extrait (2 mg/mL) avec 500 µL du réactif de Folin Ciocalteu (10%). Ce mélange a été agité au vortex puis incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 5 min, avant l'ajout d'un volume de 2 mL de Na₂CO₃ (7%). Le mélange final a été de nouveau agité, puis incubé pendant 30 min dans l'obscurité. L'absorbance du mélange a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS Thermo Scientific-Helios Omega (Massachusetts, USA) à 750 nm contre un blanc composé de 100µL d'eau distillée, de 500 µL du réactif de Folin Ciocalteu (10%) et 2 mL de Na₂CO₃ (7%).

La détermination de la teneur en polyphénols totaux (mg EAG/ g d'extrait) a été faite selon une courbe étalon de l'acide gallique (gamme de concentrations de l'acide gallique = 3,125-200 µg/mL) (**Figure 20**). Une courbe étalon a été construite avec chaque nouvel essai. La détermination de la teneur phénolique totale a été faite suivant l'équation **(3)**. Toutes les déterminations ont été effectuées en triplicata.

$$EAG = \frac{C * V}{m} \quad (3)$$

Où EAG = équivalent d'acide gallique (mg/g d'extrait)

C = Concentration d'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/mL)

V = volume de l'extrait végétal (mL)

m = masse de l'extrait végétal (g)

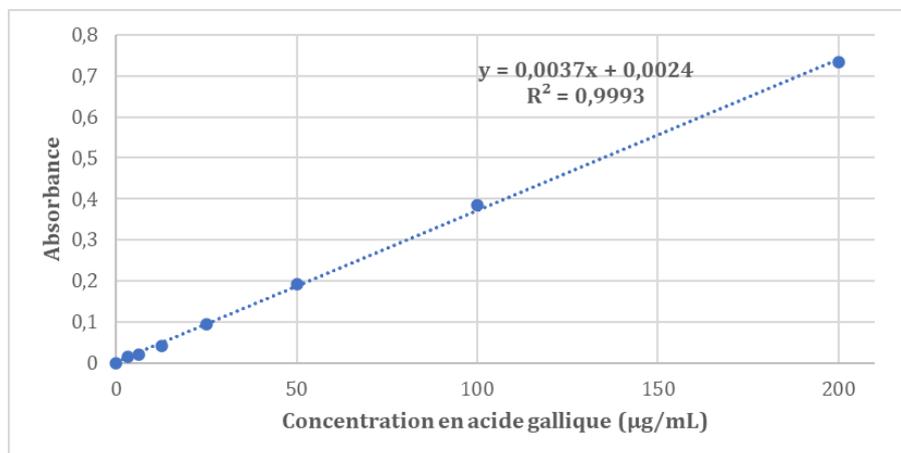


Figure 20- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

3.3.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes (TFC)

3.3.4.1 Principe de la méthode

La méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium est un moyen de dosage qui ne cible que les flavonoïdes, en particulier les flavonols et les flavones (ayant des groupement hydroxyles en position C3 et C5) qui forment avec le $AlCl_3$ des complexes stables mesurés par spectrométrie (Tristantini and Amalia, 2019) (Figure 21).

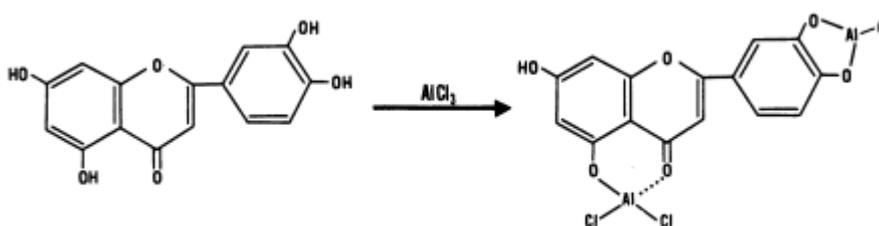


Figure 21- Formation d'un complexe stable de flavonoïde et chlorure d'aluminium (Mabry et al., 1970)

3.3.4.2 Protocole adopté

La mesure de la teneur totale en flavonoïdes des extraits de rhizome de *R. ribes* L. a été basée sur la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium telle que décrite par Chandra et al, (2014), en utilisant la quercétine pour tracer la courbe d'étalonnage

standard. Un volume de 0,6 mL d'extrait (0,5 mg/mL) a été mélangé avec le même volume de chlorure d'aluminium méthanolique (2%), puis le mélange a été incubé dans l'obscurité pour une heure, à température ambiante. Enfin, l'absorbance du mélange a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à 420 nm contre un blanc. L'évaluation de la concentration en flavonoïdes (mg EQ/ g d'extrait) a impliqué une courbe étalon de la quercétine (gamme de concentrations de la quercétine = 1-40 µg/mL) (**Figure 22**).

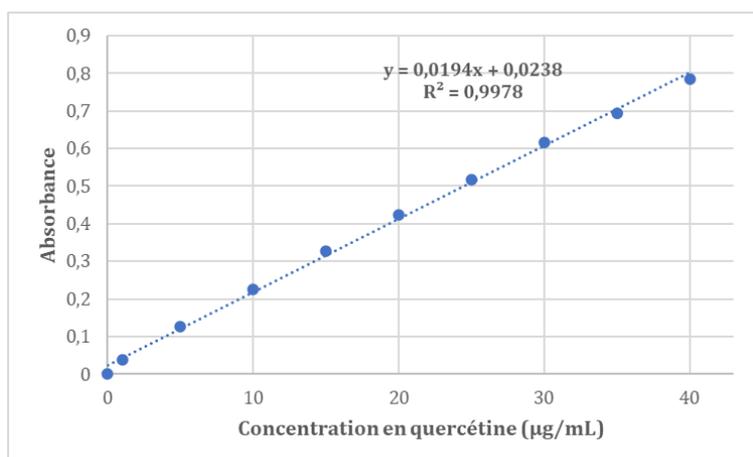


Figure 22- Courbe d'étalonnage de la quercétine

Une courbe étalon a été construite avec chaque nouvel essai La détermination de la teneur totale en flavonoïdes a été faite suivant l'équation (4). Toutes les déterminations ont été effectuées en triplicata.

$$EQ = \frac{C * V}{m} \quad (4)$$

Où EQ = équivalent de quercétine (mg/g d'extrait)

C = Concentration de quercétine établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/mL)

V = volume de l'extrait végétal (mL)

m = masse de l'extrait végétal (g)

3.3.5. Activité de piégeage des radicaux libres de DPPH

3.3.5.1 Principe de la méthode

L'un des tests colorimétriques les plus populaires pour estimer la capacité des extraits de plantes à piéger des radicaux libres est le test 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Cette méthode est précise, facile à mettre en œuvre, économique et est basée sur un

radical stable dans les solvants alcooliques (Gonçalves et al., 2018). En solution et à température ambiante, le réactif de DPPH est d'une couleur violette foncée, qui devient jaune pâle lorsque ses radicaux libres sont neutralisés soit par le transfert des atomes d'hydrogène provenant de l'extrait testé (Kedare and Singh, 2011) soit par le mécanisme de transfert d'électrons (single electron transfer), ou la combinaison des deux mécanismes (Liang and Kitts, 2014).

3.3.5.2 Protocole adopté

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. a été réalisée en utilisant le test-DDPH comme décrit par Rammal et al., (2013). Des volumes égaux d'une solution de DPPH dissoute dans de l'éthanol absolu (0,15 mM) et différentes dilutions de chaque extrait testé (100 - 1000 µg/mL) ont été mélangés. Le mélange a été secoué vigoureusement et laissé au repos dans l'obscurité, à température ambiante. Après 30 min, l'absorbance de la solution a été mesurée à 517 nm et l'activité antioxydante a été calculée à l'aide de l'équation **(5)** :

$$\text{Activité de piégeage} = \left(\frac{Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{extrait}}}{Abs_{\text{contrôle}}} \right) * 100 \quad \text{(5)}$$

Pour éliminer l'effet de la couleur de l'extrait, la même série de dilution pour chaque extrait a été préparée et mélangée avec de l'éthanol absolu afin de servir comme une série de blancs, tandis qu'un mélange de la solution de DPPH et d'eau distillée (1:1) v/v a servi comme contrôle négatif.

Pour évaluer la capacité antioxydante des extraits de rhizomes, la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH de chaque extrait a été calculée (IC50). Plus la IC50 est faible, plus l'effet antioxydant est puissant. L'acide L-ascorbique a été utilisé comme standard de référence avec une IC50 de 6,1 µg/mL (**Figure 23**).

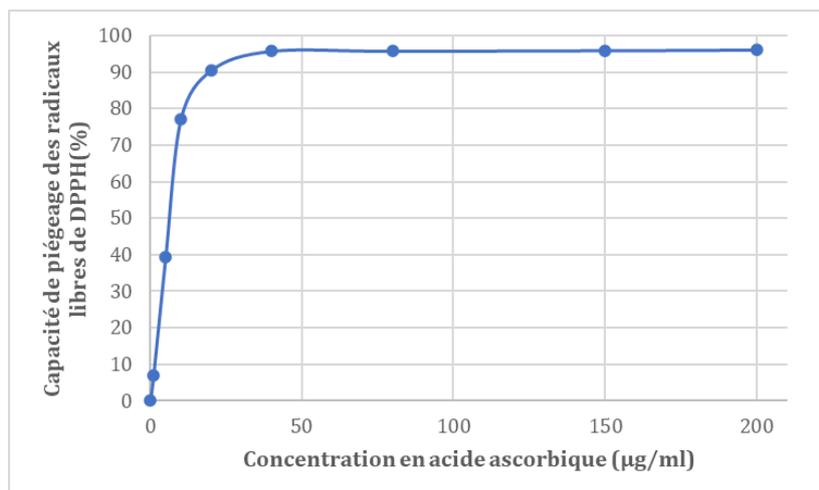


Figure 23- Variation de l'activité de piégeage des radicaux libres de l'acide L-ascorbique en fonction de sa concentration

3.3.6. Tests de sensibilité aux antimicrobiens

Pour tester la sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits de rhizomes de *R. ribes* L., deux méthodes ont été employées : la méthode de macro-dilution en bouillon et la méthode de dilution en gélose.

3.3.6.1 Choix des souches bactériennes

Plusieurs groupes ont déjà évalué l'effet antibactérien des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. sur diverses souches cliniques ou commercialisées de bactéries (**Tableau 5**). Dans notre étude, nous avons décidé de tester la sensibilité de *E. coli* et *S. aureus* aux extraits de rhizomes de *R. ribes* L.. L'un des critères de choix était la sélection d'une souche à gram positif et l'autre à gram négatif. Par ailleurs, *S. aureus* ATCC® 25923 et *E. coli* ATCC® 25922 sont considérées comme des organismes de contrôle pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (Wiegand et al., 2008).

3.3.6.2 Méthode de macro-dilution en bouillon

Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des extraits aqueux et alcooliques sur *S. aureus* et *E. coli*, la méthode de macro-dilution en bouillon (**Figure 24**) a été adoptée comme décrite par Wiegand *et al.*, (2008).

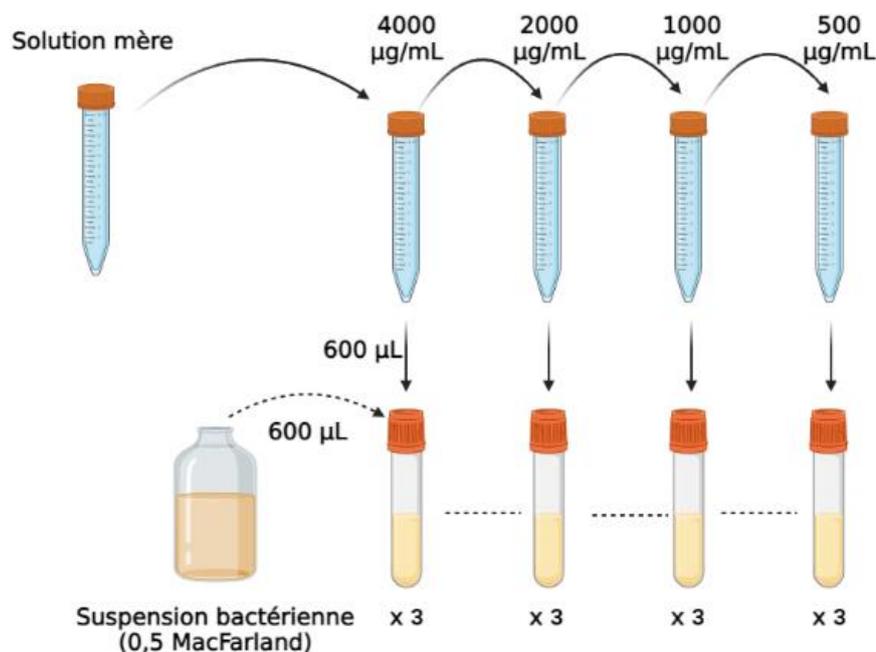


Figure 24- Etapes de la macro-dilution en bouillon

Dans un premier temps, des solutions mères des extraits aqueux d'une concentration de 10 mg/mL dans un bouillon Mueller-Hinton stérile (MHB) ont été préparées, cependant, pour l'échantillon alcoolique, la solution mère était dix fois plus concentrée (100 mg/mL d'éthanol pur) afin de réduire autant que possible la concentration finale en éthanol des tubes inoculés. Toutes les solutions aqueuses ont ensuite été stérilisées à l'aide d'un filtre à seringue (0,45 µm).

Ensuite des dilutions en série des six extraits de rhizomes de *Rheum ribes* L. ont été préparées dans du MHB stérile. Une série de dilutions a également été réalisée avec de l'éthanol pur sans l'ajout de l'extrait alcoolique, dans le but de tester l'effet de l'alcool lui-même sur l'activité bactérienne. Les tubes témoins ont été remplis de 600 µl de MHB stérile et les tubes « blancs » ont été remplis avec 600 µl de MHB et le même volume de chaque concentration d'extrait aqueux et alcoolique afin de pouvoir supprimer l'effet de la couleur des extraits lors de la lecture spectrophotométrique.

À l'aide d'un spectrophotomètre UV-VWR 3100PC, les suspensions bactériennes de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été ajustées à 0,5 McFarland (ce qui est approximativement proche de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Une densité optique comprise entre 0,08 et 0,13 contre un blanc de MHB à 625 nm a été obtenue. Les deux suspensions bactériennes ajustées ont ensuite été diluées d'un facteur de 1:100 dans du MHB stérile. 600 µL des suspensions

bactériennes ont été mélangées avec 600 µL de tous les extraits dilués et des tubes témoins. Il est important de noter que les concentrations finales d'éthanol dans les milieux de culture bactérienne étaient ≤ à 2%. Les tubes ont finalement été incubés pendant 24 heures à 37°C. Pour déterminer le CMB, le contenu de certains tubes (10 µl) a été strié sur des plaques de gélose Muller Hinton (MHA) pour être ensuite incubés à nouveau pendant 24 heures à 37°C.

3.3.6.3 Méthode de dilution en gélose

La dilution en gélose est une autre méthode pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des extraits aqueux et alcooliques de rhizomes de *Rheum ribes* L. (**Figure 25**). Le concept principal de cette méthode est d'incorporer l'extrait lui-même dans le milieu gélosé sur lequel des gouttelettes de la suspension bactérienne ajustée et diluée seront cultivées. Cette technique a été appliquée telle que décrite par Wiegand *et al.*, (2008).

Dans un premier temps, une couche de gélose Mueller-Hinton (MHA) stérile a été versée dans plusieurs boîtes de Pétri. Pendant ce temps, le volume d'agar nécessaire pour préparer une dilution en série de deux types d'extraits pour des concentrations comprises entre 500 et 16000 µg/mL a été versée dans des tubes à essai. Ces derniers ont été placés dans un bain-marie à 50°C pour éviter leur gélification. Des solutions mères des extraits aqueux (40 mg/mL) et alcooliques (100 mg/mL) ont été préparées. Tous les extraits aqueux ont été stérilisés à l'aide de filtres seringues (0,45 µm).

Dans la zone stérile de deux flammes de bec Bunsen, le volume nécessaire de chaque extrait a été mélangé au MHA liquide pour obtenir des concentrations d'extraits finales de 500, 1000, 2000, 4000, 8000 et 16 000 µg/mL dans un volume final de 10 mL. Le mélange a d'abord été bien agité sans formation de bulles, puis il a été rapidement versé dans deux boîtes de Pétri, étiquetées avec la concentration d'extrait correspondante, afin de former une fine couche au-dessus de la couche sèche de MHA. Une série de dilutions a également été faite avec de l'éthanol pur (sans extrait) pour tester l'effet de l'éthanol lui-même sur l'activité bactérienne. Les plaques d'agar ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 2 heures pour sécher complètement.

Pendant ce temps, comme détaillé dans la section précédente, des suspensions bactériennes de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été ajustées à 0,5 McFarland. Les deux

suspensions bactériennes ajustées ont ensuite été diluées d'un facteur 1:10 dans du MHB stérile.

Toutes les plaques ont été préalablement divisées en deux compartiments distincts pour chaque souche correspondante comme le montre la **Figure 25**. Enfin, ces derniers ont été inoculés en déposant trois gouttes séparées de 1 μl (en triple) des suspensions de *S. aureus* et de *E. coli*. Toutes les plaques ont été par la suite incubées à 37°C pendant 20 heures.

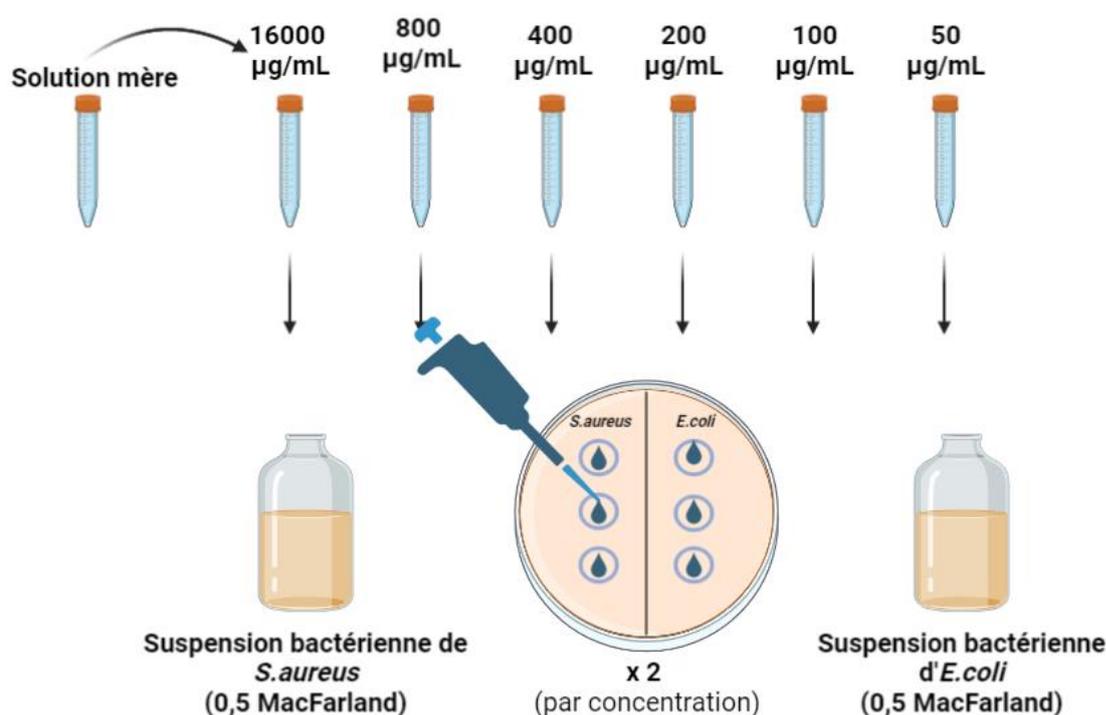


Figure 25- Étapes de la dilution en milieu gélosé

3.3.7. Analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-UV)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est l'une des techniques analytiques de séparation les plus populaires. Depuis plus de 40 ans, elle a été adoptée dans les laboratoires du monde entier pour les sciences pharmaceutiques, la chimie clinique, les analyses alimentaires et environnementales et la chimie de synthèse pour séparer, identifier et quantifier les composés actifs (Zotou, 2012). Brièvement, l'HPLC est une forme de chromatographie sur colonne qui pompe à haute pression un échantillon dissous dans un solvant (phase mobile) à travers une colonne avec un matériau de garnissage chromatographique immobilisé (phase stationnaire) (**Figure 26**). Les solvants

de la phase mobile sont élués selon un programme de gradient correspondant à la nature des analytes à séparer.

Les propriétés de l'échantillon et de la phase mobile, ainsi que la nature de la phase stationnaire, déterminent le temps de rétention des analytes, ou la vitesse à laquelle ils traversent la colonne. Lorsque l'échantillon traverse la colonne, les analytes ayant les interactions les plus fortes avec la phase stationnaire sortent de la colonne le plus lentement, ce qui signifie qu'ils présentent les temps de rétention les plus longs. En revanche, les échantillons démontrant peu d'interactions avec le matériau de la colonne éluent rapidement et sont donc caractérisés par des temps de rétention courts (Petrova and Sauer, 2017).

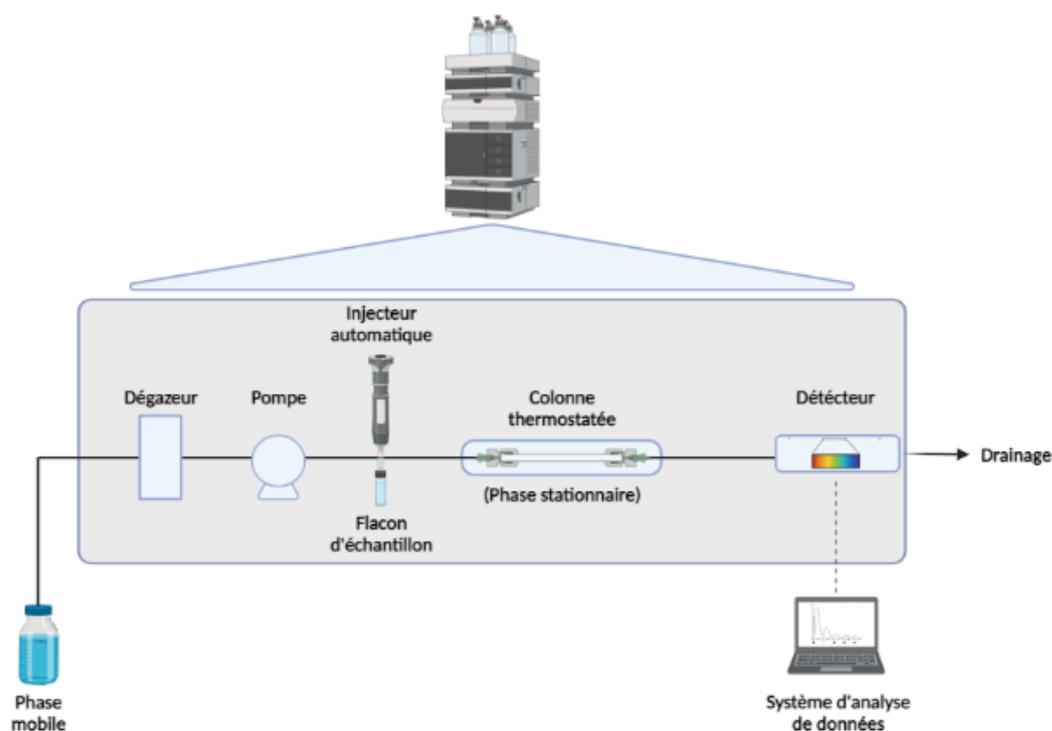


Figure 26- Schéma simplifié de la HPLC
(Effectué sur www.Biorender.com)

3.3.7.1 Appareillage et conditions chromatographiques

Les analyses chromatographiques des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. pour la détermination de leur composition en molécules bioactives ont été effectuées sur une colonne non thermostatée Phenomenex Luna C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm) et à l'aide d'un système d'HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity), équipé d'un module de pompe (Hewlett Packard 110, Quatpump, G1311A), d'un dégazeur (1260µ-degasser, G1379B),

d'un passeur d'échantillons thermostaté (ALS, G1329B) et d'un détecteur UV-VIS à barrette de diodes (G1315A). Ces modules ont été pilotés par le logiciel ChemStation version A.10.02 et les résultats ont été visualisés sur le même logiciel mais en version B.04.01 SP1.

3.3.7.2 Choix des molécules ciblées

Les composés que nous souhaitons identifier dans les échantillons appartiennent à trois familles de molécules : cinq anthraquinones (l'émodine, l'aloé-émodine, le chrysophanol, le physcion et la rheim), un flavonoïde (le kaempferol) et un stilbène (la rhaponticine). Toutes ces molécules ont été déjà recherchées dans divers types d'extraits (alcoolique, aqueux, méthanolique...) de *R. ribes* L. (**Tableau 4**). Au-delà du fait que ces molécules présentent des propriétés pharmaceutiques intéressantes, le but de cette identification était également de déterminer la composition de la matière étudiée. Cette détermination nous permettra d'avoir une meilleure comparaison des résultats de nos travaux avec ceux des autres études sur divers plans : compositions phénoliques, activités antioxydantes, antibactériennes et cytotoxiques. Enfin, un autre but majeur de l'analyse de ces composés était d'évaluer l'impact du traitement par DIC sur l'aptitude technologique des matrices à libérer les molécules recherchées.

3.3.7.3 Préparation des solutions standards

Les poudres de molécules standards ont été pesées avec précision et dissous dans 5 mL de méthanol pour préparer les solutions mères d'émodine (1,3 mg/mL), de kaempférol (1 mg/mL) et de rhaponticine (1 mg/mL), et dans 20 mL de méthanol pour les solutions mères d'aloé-émodine (0,35 mg/mL), de rhéine (0,1 mg/mL), de chrysophanol (0,35 mg/mL), et de physcion (0,1 mg/mL).

Les solutions mixtes de standards ont été stockées à 4 °C et filtrées à travers un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,45 µm avant l'analyse HPLC.

3.3.7.4 Protocoles expérimentaux de l'HPLC

- Protocole expérimental de la méthode 1

Le premier protocole adopté a été inspiré par les travaux de Raafat et al., (2014), qui portaient sur l'identification de quelques molécules actives dans les extraits aqueux de rhizomes d'une espèce libanaise de *R. ribes* L.. La phase mobile était composée d'une

solution aqueuse (A) et d'acétonitrile (B) en adoptant le programme de gradient figurant dans le **Tableau 16**. Le débit a été fixé à 1,0 mL/min, le volume des aliquotes injectées était de 20 μ L et la longueur d'onde adoptée était de 280 nm.

Tableau 16- Programme du gradient d'éluion du protocole 1

Temps (min)	% A	% B
0	95	5
12	60	40
35	62	38
40	75	25
53	45	55
60	0	100
80	0	100
82	95	5
100	95	5

- Protocole expérimental de la méthode 2

Le premier protocole fût convenable pour la séparation des molécules de l'extrait de *R. ribes* L.. En revanche, ce n'était pas le cas pour les molécules standards que nous souhaitions détecter et quantifier. Pour cela nous avons recherché dans la bibliographie un protocole qui soit convenable pour la séparation des molécules standards. Nous avons suivi le protocole établi dans l'article de Xu et al., (2012) pour plusieurs raisons. D'une part, le protocole de la séparation de cinq molécules parmi les huit recherchées a été étudiée dans cet article, d'autre part, tous les modules de l'HPLC, y compris la colonne et ses dimensions, présentés dans l'article étaient identiques à ceux de notre équipement.

Le protocole de séparation des pics a été appliqué tel que décrit par Xu et al., (2012). La phase mobile était composée d'une solution aqueuse (A), d'acétonitrile (B) et d'une solution d'acide acétique (0,4% v/v). Elle a été injectée en isocratique en adoptant le programme de gradient suivant (**Tableau 17**). Le débit était de 1,0 mL/min et le volume des aliquotes injectées dans l'HPLC dépendaient de la concentration initiale de la solution mère de chaque molécule standard. Nous avons également travaillé avec plusieurs longueurs d'onde en réponse à l'optimum d'absorption de chacune des molécules comme

le montre les spectres d'absorption de la **Figure 27** (Xu et al., 2012) . En effet il s'agit de $\lambda=225$ nm pour chacune des molécules d'émودية, d'aloé-émودية, de chrysophanol et de rheim et $\lambda=280$ nm pour le physcion. Pour les autres molécules recherchées, nous avons fixé des longueurs d'onde de $\lambda=325$ nm pour la rhapsodicine (Roupe et al., 2005), et $\lambda=370$ nm pour le kœmpferol (Telange et al., 2014).

Tableau 17- Programme du gradient d'élution du protocole 2

Temps (min)	% A	% B	%C
0	80	10	
10	40	50	
25	0	90	
35	0	90	10
40	80	10	
50	80	10	

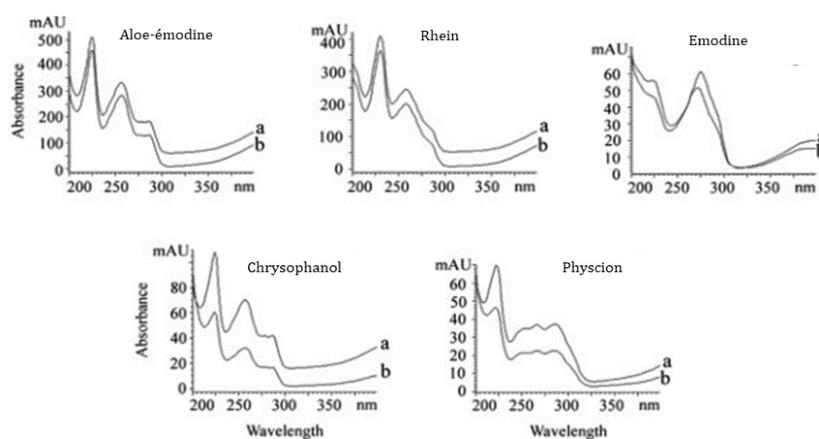


Figure 27- Les spectres d'absorption des cinq anthraquinones recherchées (Xu et al., 2012)

- Protocole expérimental de la méthode 3

Dans un troisième temps, des modifications mineures ont été apportées sur le protocole 2 dans le but de le rendre plus adapté aux échantillons de rhizomes de *Rheum ribes* L.. En effet, un changement léger au niveau du programme du gradient d'élution a eu lieu

(**Tableau 18**), ce qui a modifié le temps de rétention des molécules standards recherchées.

Tableau 18- Programme du gradient d'élution du protocole 3

Temps (min)	% A	% B	% C
0	74	16	
10	60	30	
25	40	50	
35	0	90	10
40	74	16	
50	74	16	

Par ailleurs, nous avons fixé les longueurs d'onde optimales pour chaque molécule, mais cette fois-ci en se basant sur les spectres d'absorption provenant de nos propres essais (**Figure 28**). Nous avons alors choisi $\lambda=258$ nm pour l'émodine, l'aloé-emodine et le chrysophanol et $\lambda=430$ nm pour la rhein et le physcion. Pour les autres molécules, les longueurs d'onde de détection sont restées les mêmes : $\lambda=370$ nm pour le kaempferol et $\lambda=325$ nm pour la rhaponticine.

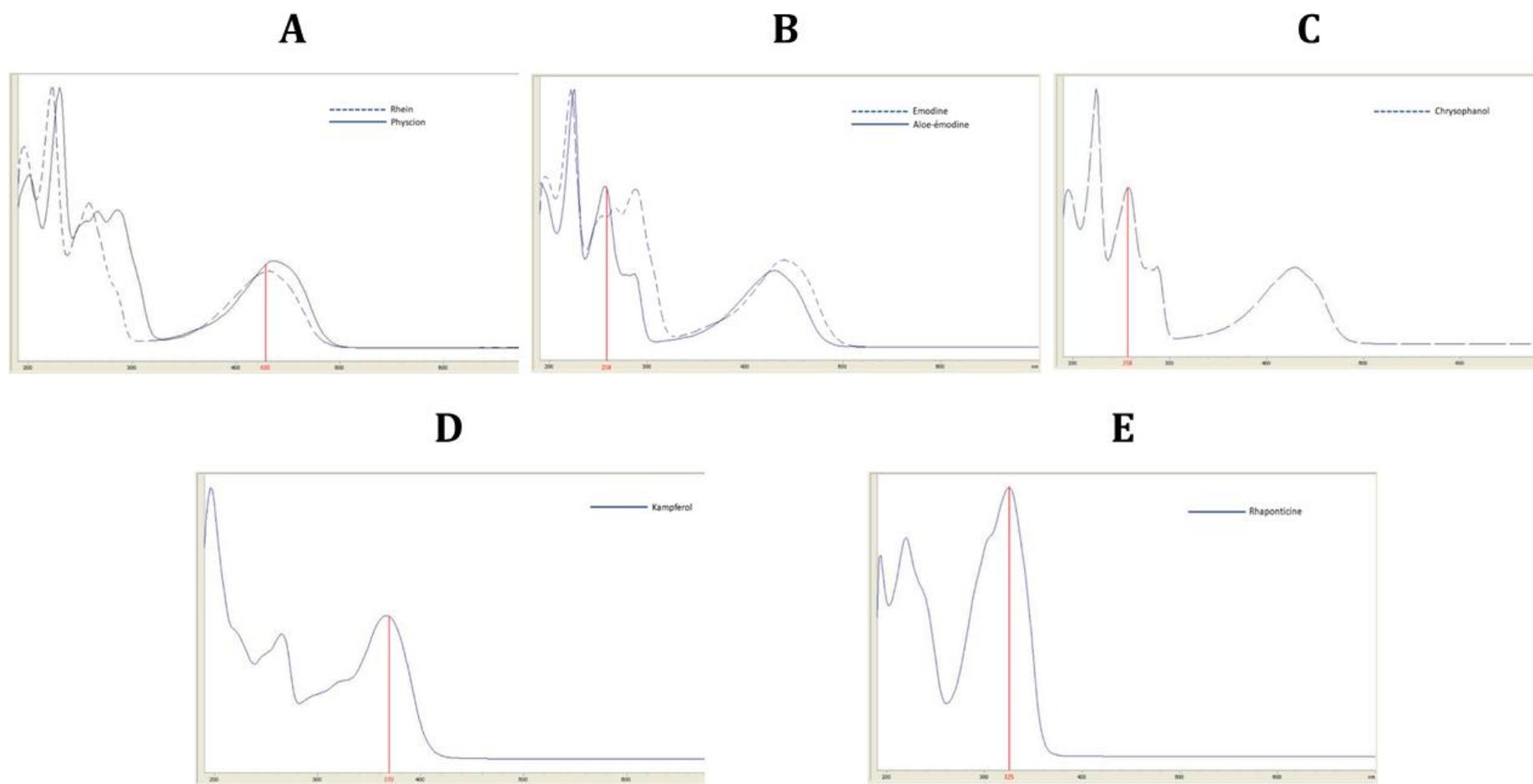


Figure 28- Les spectres d'absorption de la rhein et du physcion (A), de l'émودية et l'aloé-émودية (B), du chrysophanol (C), du kaempferol (D) et de la rhaponticine (E)

3.3.7.5 Protocole expérimental du dosage des molécules d'intérêt dans les extraits de *R. ribes* L.

- Principe du phénomène d'extraction en phase liquide

Le fractionnement est une étape clé pour séparer les composés d'un extrait bioactif et par conséquent le rendre moins complexe en termes de composition chimique. En utilisant l'extraction en phase liquide, où deux solvants ne se mélangent pas et forment des couches séparées, les composants d'un extrait peuvent être facilement fractionnés en fonction de leur affinité avec un solvant. Cette procédure est souvent utilisée après l'obtention d'un extrait brut initial, pour le « purifier ».

- Application du phénomène d'extraction en phase liquide sur les échantillons de *R. ribes* L.

En raison de la complexité du signal détecté à la suite de l'injection des échantillons de *R. ribes* L. dans l'HPLC, nous avons eu recours à la séparation en phase liquide des extraits bruts aqueux et alcooliques, dans l'espoir de pouvoir éliminer les interférents masquant les composés qu'on désire identifier et quantifier.

En se basant sur les nombreuses études antérieures effectuées sur la nature et la composition chimique du *R. ribes* L., nous avons émis l'hypothèse que les interférents ayant de très grands pics apparaissant dans les chromatogrammes d'HPLC des extraits étaient de nature glucidique : fructose, glucose, saccharose et maltose d'une part (Ereçevit and Kirbağ, 2017) et les glucosides de phénols d'autre part (Öztürk et al., 2007; Tosun and Kizilay, 2003). En se basant sur la nature chimique de ces interférents, nous avons supposé que ces derniers pourraient être « captés » par un solvant non-polaire, tel que le n-hexane. En effet la plupart des aglycones vont migrer dans ce dernier, alors que glycosides et esters de sucre restent dissous dans la fraction polaire, aqueuse (Routray and Orsat, 2013).

Le protocole de séparation a été inspiré des travaux de Godwin et al., (2015) avec quelques modifications (**Figure 29**). Dans un premier temps, nous avons préparé une solution brute de l'échantillon, en dissolvant 10 mg du lyophilisat dans 1 mL d'eau distillée. Cette solution a été versée dans une ampoule à décanter, contenant au préalable 50 mL d'hexane. L'ampoule a été secouée vigoureusement puis déposée sur son support jusqu'à l'apparition de deux couches non miscibles. Puis, les deux fractions ont été réparties dans deux ballons distincts. Lors des premiers essais, la fraction aqueuse a subi

trois cycles de lavage avec le même volume d'hexane, alors que pour les essais réalisés par la suite, nous avons finalement réalisé cinq cycles de lavages successifs.

Les ballons contenant les fraction aqueuse et n-hexane ont été évaporés à l'aide d'un rotavapeur couplé à une pompe à vide vacuubrand PC 510 Nt. Puis, 5 mL de méthanol ont été ajoutés aux deux ballons, enfin les contenus ont été filtrés à travers un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,45 µm avant leur analyse par HPLC.

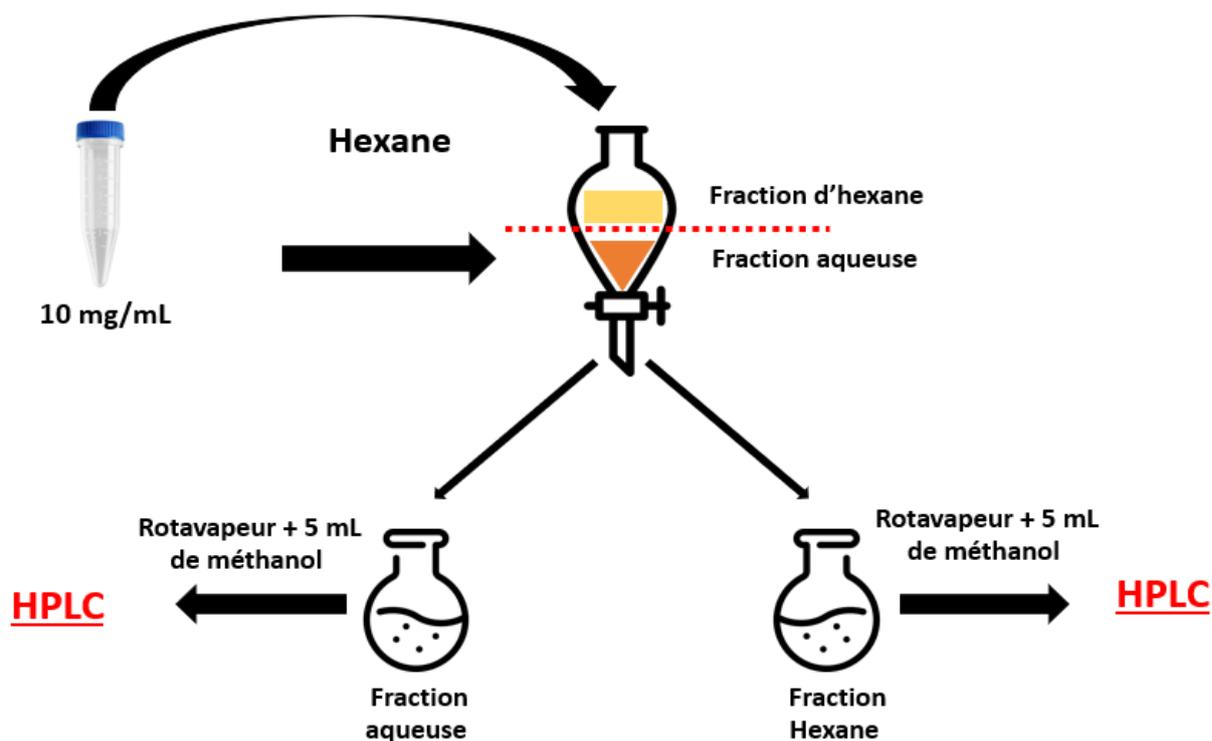


Figure 29- Protocole de séparation en phase liquide des solutions brutes d'extrait de R. ribes L.

3.3.8. Analyses par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS)

3.3.8.1 Principe de la UHPLC

Pendant de nombreuses années, les chercheurs ont passé beaucoup de temps à essayer de trouver un moyen d'accélérer leurs investigations chromatographiques. Pour cela, ils ont tenté d'utiliser des colonnes plus petites, des débits plus élevés et des températures de travail plus importantes pour augmenter la diffusion des analytes dans la phase mobile et par conséquent accélérer leur passage dans la phase stationnaire (De Villiers et al., 2006; Gumustas et al., 2013). Mais un problème d'augmentation de pression sur la

colonne est apparu et d'autres limitations ont rapidement été atteintes (Swartz and Murphy, 2004, 2005). Le désir d'obtenir de plus en plus d'informations d'une meilleure qualité a nécessité le développement d'une nouvelle technologie appelée chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC). Cette dernière a donc évolué à partir de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sachant que toutes les deux impliquent la chromatographie liquide pour obtenir la séparation des composants du mélange injecté (Gumustas et al., 2013).

La technique UHPLC est basée sur le principe de l'utilisation d'une phase stationnaire constituée de particules de moins de 2,0 μm , alors que les colonnes HPLC sont généralement remplies de particules de 3 à 5 μm . L'utilisation de particules plus petites permet d'obtenir une meilleure résolution, une plus grande efficacité et une sensibilité accrue grâce à des pics plus nets et de plus grande amplitude, ainsi qu'une analyse chromatographique plus rapide (Shen et al., 2005). Pour tirer pleinement partie de la technologie des petites particules dans les méthodes UHPLC, une plage de pression plus grande que les systèmes HPLC actuels est obligatoire. En effet, les colonnes HPLC peuvent atteindre une pression maximale de 600 bars tandis que les systèmes UHPLC peuvent atteindre 1200 bars et plus (Wu et al., 2001).

3.3.8.2 Principe de la MS

La spectrométrie de masse (MS) est une technologie qui permet de mesurer le rapport masse/charge (ou m/z) des atomes et/ou des molécules dans un échantillon. Elle est également capable de distinguer différents isotopes d'un même élément. Le spectromètre de masse est souvent utilisé pour déterminer le poids moléculaire exact des composants d'une solution et pour également identifier des composés inconnus dans l'échantillon injecté.

Il existe de nombreux types de spectromètres de masse, tous présentent trois caractéristiques communes (McMahon, 2021) :

- **Une source d'ionisation**

C'est le moyen par lequel les atomes ou les molécules de l'échantillon s'ionisent. Un champ électrique est nécessaire pour diriger les ions dans les spectromètres de masse, donc les espèces neutres (non-chargées) ne pouvant pas être dirigées, elles ne seront pas détectées. De nombreux moyens permettent l'ionisation et ils sont collectivement appelés

sources d'ionisation. Dans notre cas il s'agit d'une ionisation de type electrospray (ESI pour Electrospray Ionization Process). La technique ESI, comme le montre la **Figure 30** est basée sur la pulvérisation à pression atmosphérique de la solution injectée à travers une aiguille hautement chargée (typiquement d'une charge entre 2,5 et 3 kV) appelée capillaire ESI. Le nuage de gouttelettes chargées produit sera par la suite focalisé grâce à un gaz de nébulisation. Puis, un gaz sec et chaud, généralement appelé gaz de désolvatation, est appliqué sur les gouttelettes chargées provoquant ainsi l'évaporation du solvant. Ce processus de désolvatation diminue donc la taille des gouttelettes, ce qui facilite la répulsion entre les charges de même signe (phénomène de l'explosion Coulombic). En outre, la fission des gouttelettes conduit à la formation d'ions en phase gazeuse qui seront guidés par la suite vers l'analyseur de masse (Harvey, 2018).

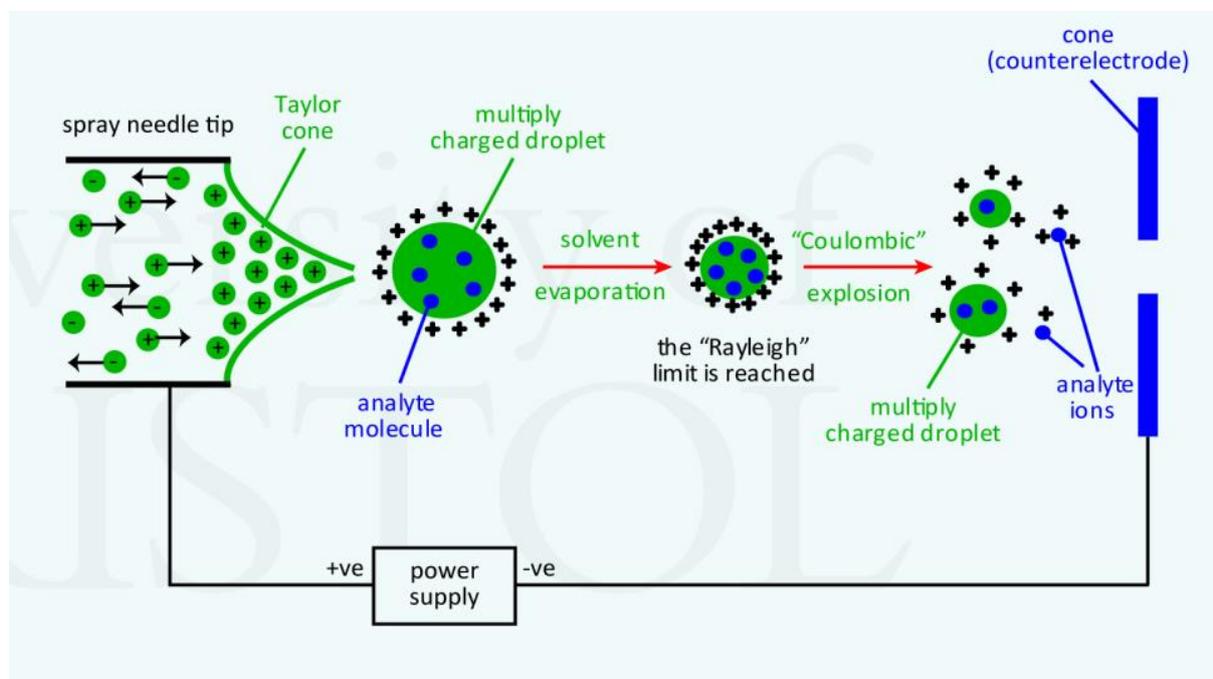


Figure 30- Schéma de la technique d'ionisation de type electrospray (ESI)
(www.chm.bris.ac.uk/ms)

- **Un analyseur de masse**

Le deuxième composant de tous les spectromètres de masse est l'analyseur de masse. Il existe plusieurs moyens différents par lesquels le rapport m/z des ions peut être mesuré. Parmi eux, il existe l'analyseur de masse quadripolaire, à l'intérieur duquel les trajectoires des ions dévient selon le potentiel électrique fixé préalablement par l'expérimentateur. La modification du potentiel permet que seuls les ions dont la valeur du rapport m/z est

incluse dans une gamme spécifique, atteignent l'extrémité de la chambre et soient finalement détectés (McMahon, 2021).

- **Un détecteur d'ions**

Après l'étape de mesure de la masse des ions, ceux-ci sont ensuite envoyés à un système de données où les rapports m/z sont stockés avec leur abondance relative dans l'échantillon, donnant ainsi un spectre de masse. Ce dernier représente simplement les rapports m/z des ions détectés (sur l'axe des abscisses) en fonction de leurs intensités (sur l'axe des ordonnées). Chaque pic dans un spectre de masse représente une composante de m/z unique et sa hauteur indique l'abondance relative de cette composante dans l'échantillon.

3.3.8.3 Description de l'appareillage utilisé

Malgré l'injection des standards de ces composés en HPLC-UV, leur mise en évidence dans l'extrait de racine n'a pas abouti en raison de la trop grande complexité de la matrice et de la présence de composés interférents masquant très certainement le signal des composés recherchés. Des analyses par UHPLC-MS d'un échantillon non traité de *R. ribes* L. ont été alors effectuées, car ces types d'analyses sont plus sensibles et plus spécifiques que l'HPLC-UV.

L'objectif des analyses en spectrométrie de masse était d'identifier la nature des grands pics qui masquent les petits pics de molécules bioactives recherchées dans nos échantillons. Le second objectif était de déterminer la présence de nouvelles molécules qui sont séparés par MS selon leur rapport m/z et qui n'auraient pas encore été exploitées dans les travaux précédents.

Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) après séparation par UHPLC. Ce système est composé d'une UHPLC couplée au spectromètre de masse (**Figure 31**), composé d'une source d'électro-nébulisation ESI pour l'ionisation des molécules via une forte tension (**Figure 31-Phase 1**), d'un guide d'ion (ou stepwave ion guide) qui sert à éliminer les composés neutres et par conséquent diminuer le bruit de fond (**Figure 31-Phase 2**), d'un détecteur quadripôle qui focalise les ions entre ses plaques et sélectionne les ions pour fragmentation selon leur rapport m/z (**Figure 31-Phase 3**), d'une cellule de collision dans laquelle une partition des molécules chargées se fait suite à l'application d'un courant électrique (**Figure 31-Phase 4**) et finalement d'un

analyseur à temps de vol, qui mesure la durée que mettent les ions à parcourir la distance du tube de vol après avoir été accélérés par un champ électrique. Un signal au niveau du détecteur à un temps donné du balayage correspond à un m/z donné. C'est un analyseur de haute résolution qui permet de mesurer la masse exacte et de déterminer la formule brute d'un composé détecté (**Figure 31**-Phase 5).

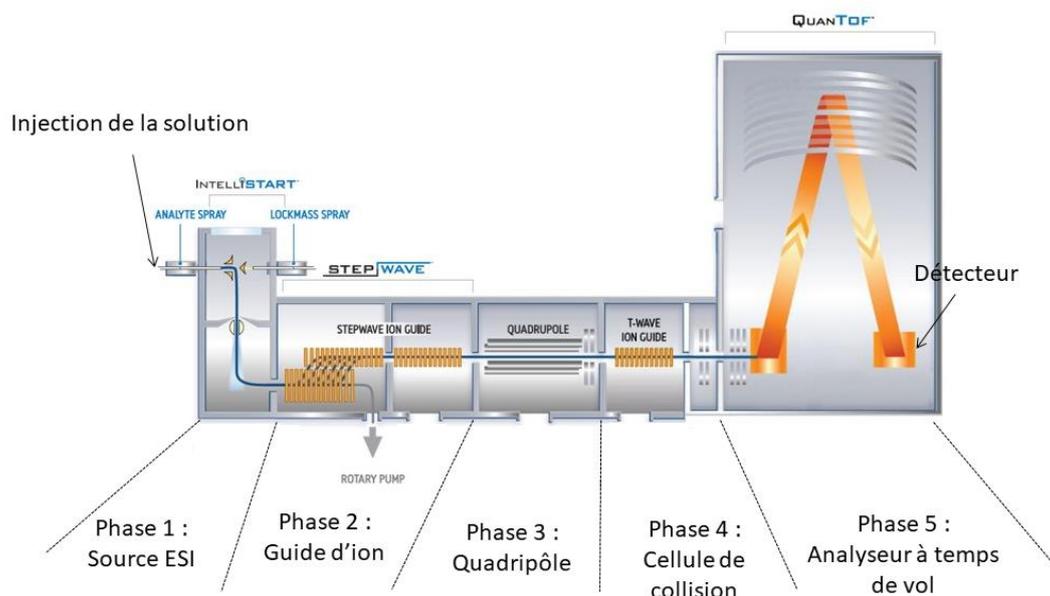


Figure 31- Schéma de l'appareillage ESI-Q-TOF
(www.waters.com)

3.3.8.4 Préparation des solutions injectées

Quelques milligrammes de l'extrait aqueux non traité par DIC ont été repris dans un mélange de H₂O/ACN/Acide Formique (70:30:0,1; v/v/v) de manière à atteindre une concentration finale de 1 mg/mL. Un volume de 5 µL de cet extrait a été finalement injecté après centrifugation à 7000 rpm pendant 5 minutes. Une extraction des composés basée sur leur hydrophobie par une cartouche SPE C18 a été également réalisée selon le protocole suivant :

- Conditionnement de la phase SPE C18 avec 5 mL de méthanol pur puis 5 mL d'eau ultrapure
- Dépôt de 1 mL de l'extrait repris dans de l'eau ultrapure
- Lavage avec 3 x 5 mL d'eau ultrapure

- Elution avec 1 mL d'acétonitrile pour l'élution 1 et de nouveau 1 mL d'acétonitrile pour l'élution 2
- Evaporation de 200 μ L de chaque élution et reprise dans 100 μ L d'H₂O/ACN/Acide Formique (70:30:0,1; v/v/v) puis injection de 1 μ L de chaque élution reconcentrée

3.3.8.5 Conditions analytiques de l'UHPLC

La détection des molécules bioactives a été effectuée sur une UHPLC système Acquity UHPLC H-Class (Waters, Milford, USA) équipée d'une colonne Acquity UHPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m) à travers laquelle les solvants sont délivrés à un débit de 0,3 mL/min. Le solvant (A) utilisé était de l'eau à 0,1 % d'acide formique (v/v) alors que le solvant (B) était de l'acétonitrile à 0,1% d'acide formique (v/v). Ces deux solvants sont associés à un gradient d'élution adapté (**Tableau 19**) afin de séparer les constituants du mélange injecté et d'en tirer les temps de rétentions de chacune des molécules du mélange standard.

Tableau 19- Programme du gradient d'élution de la UHPLC

Temps (min)	% A	% B
0	70	30
3	70	30
4	20	80
6	20	80
6,5	0	100
10	0	100
10,1	70	30
15	70	30

3.3.8.1 Paramètre de détection de la MS

Le spectromètre de masse utilisé était un Xevo G2 S Q-TOF équipé d'une source d'ionisation electrospray en mode positif et négatif (Waters, Manchester, United Kingdom). La température du capillaire était de 120 °C et son voltage était de 3kV (+) et de 2,5 kV (-). La leucine enképhaline (d'une concentration de 1ng/ μ L) a été utilisée comme gaz

nébuliseur à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'azote sec a été utilisé comme gaz de désolvatation dont la température et le débit étaient respectivement de 500°C et de 800L/h. La gamme m/z utilisée était entre 50 et 1200 et l'énergie de collision était de 6 eV en basse énergie pour l'analyse des molécules intactes et rampe de 15 à 35 eV en haute énergie pour l'analyse des molécules et leurs fragments. Les acquisitions et le traitement des données ont été réalisés en utilisant le logiciel « Mass Lynx Version 4.1 » de Waters (**Figure 32**).



Figure 32- *Système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF, présent sur la plateforme d'Analyse Haute Résolution de Biomolécules du laboratoire LIENSs*

3.3.9. Culture cellulaire

L'activité antiproliférative des extraits a été étudiée en utilisant la lignée cellulaire A2058 (ATCC® CRL-11147). A2058 est une lignée cellulaire établie de cellules de mélanome métastatique humain.

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de 10 % de FBS (sérum de veau fœtal) et de 1 % de pénicilline-streptomycine (Dominique Dutscher, France), à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂.

Les extraits ont été solubilisés dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 10⁴ $\mu\text{g}/\text{mL}$ et puis ils ont été dilués dans le milieu de culture cellulaire pour finalement obtenir des solutions de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Deux milles cellules ont étéensemencées dans une microplaque à 96 puits à fond plat et laissées adhérer pendant 24 heures. Le lendemain, les extraits ont été ajoutés pour

obtenir une concentration finale de 100 µg/mL. Du DMEM contenant du DMSO (même volume que les extraits) a servi de contrôle négatif. Il est important de noter que les concentrations finales de DMSO dans les milieux de culture cellulaire étaient égales à 1%. Après 72 heures d'incubation à 37°C, une solution de 5 g/L (concentration finale de 0.5 g/L) de MTT (3-((4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromure) a été ajoutée dans chaque puit de la microplaque, permettant aux cellules vivantes contenant un succinate déshydrogénase mitochondriale fonctionnelle de métaboliser le MTT (d'une couleur jaune pâle) en sel de formazan insoluble (d'une couleur violette) pendant une durée de 4 heures. Le milieu de culture cellulaire a été retiré et les cristaux de formazan ont été dissous dans 200 µL de DMSO. Les microplaques ont été placées à 37°C pendant 5 min pour solubiliser les cristaux de formazan et l'absorbance a été lue à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques VERSAmax (Molecular devices, France). Le pourcentage d'inhibition de la croissance a été calculé selon l'équation **(6)**.

$$IC (\%) = 100 - \left(\frac{A_{\text{extrait}} - A_{\text{témoin}}}{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{témoin}}} \right) * 100 \quad (6)$$

Où A_{extrait} = absorbance des puits contenant les cellules traitées par les extraits

$A_{\text{témoin}}$ = absorbance de la solution de solubilisation de DMSO

$A_{\text{contrôle}}$ = absorbance des puits contenant des cellules contrôles incubées avec le DMSO

Les résultats sont représentés par les moyennes de 3 puits ± les écart-types.

Chapitre III

**Criblage phytochimique des deux
premiers plans d'expériences**

1. Le premier plan d'expériences (DoE 1) : un plan préliminaire

1.1. Rappel du dispositif expérimental

Le premier plan d'expériences, considéré comme plan préliminaire, a été effectué sur des rhizomes de *R. ribes* L. coupés sous forme de rondelles. Ces dernières ont subi le traitement par DIC avec des pressions de vapeur saturée variant entre 300 et 700 kPa pour une durée de traitement entre 20 et 80 secondes. Les données des variables réponses (TPC, TFC et l'activité antioxydante) des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC sont détaillées dans ce qui suit.

1.2. Criblage phytochimique et activité antioxydante

1.2.1. Teneur phénolique totale

Le **Tableau 20** présente les résultats de la teneur phénolique totale des tranches de rhizomes traitées et non traitées (MP) par DIC. Nous remarquons directement que les valeurs de TPC des points centraux sont différentes, or l'un des buts de la conduite d'un tel type d'essais est de tester la répétabilité au niveau des réponses des points traités avec les mêmes conditions expérimentales. Normalement, un point aberrant sur cinq peut être admis, cependant, dans notre cas, la répétabilité n'est atteinte que pour deux points centraux 1 ($50,02 \pm 0,39$ mg EAG/g extrait) et 13 ($50,93 \pm 0,56$ mg EAG/g extrait).

Ceci peut être un indicateur de la présence d'une source de variabilité capable d'atténuer l'effet de l'application des paramètres DIC sur les rhizomes. En effet, il était remarquable que l'aspect des rhizomes tranchés ne fût pas uniforme : les tranches provenant du milieu du rhizome étaient charnues et humides tandis que celles provenant des extrémités étaient ligneuses et sèches. Le tri des pièces présentant un aspect similaire n'étant pas effectué avant le traitement par DIC, l'hétérogénéité de la matière première peut être à l'origine de la variabilité masquant l'effet des variables indépendantes du traitement par DIC.

Tableau 20- Conditions expérimentales des différents essais du DoE1 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP) par DIC

Essai n°	Pression (kPa)	Temps (s)	TPC (mg EAG/g extrait)	TFC (mg EQ/g extrait)	IC50 (µg/mL)	
Points centraux	1		50,02±0,39	36,38±1,63	51,05±0,32	
	4		70,92±1,04	23,16±0,61	37,75±0,73	
	7	500	50	56,98±0,57	47,47±0,40	60,32±0,45
	10			47,72±0,90	41,27±0,07	73,96±0,41
	13			50,93±0,56	30,70±0,44	47,58±0,57
2	700	50	44,94±0,61	23,86±0,94	81,47±0,77	
3	500	80	68,68±0,56	38,66±0,17	50,71±0,35	
5	640	71	54,77±0,34	30,53±1,06	55,20±0,83	
6	640	29	51,27±0,54	27,48±0,04	68,51±0,79	
8	360	29	46,85±0,39	38,81±1,63	47,75±0,52	
9	360	71	54,36±0,06	39,57±0,52	44,36±0,14	
11	300	50	48,88±0,82	50,58±1,03	48,94±0,73	
12	500	20	38,81±0,59	40,15±0,22	62,11±0,38	
MP	-	-	57,80±0,64	38,05±0,20	42,67±0,78	

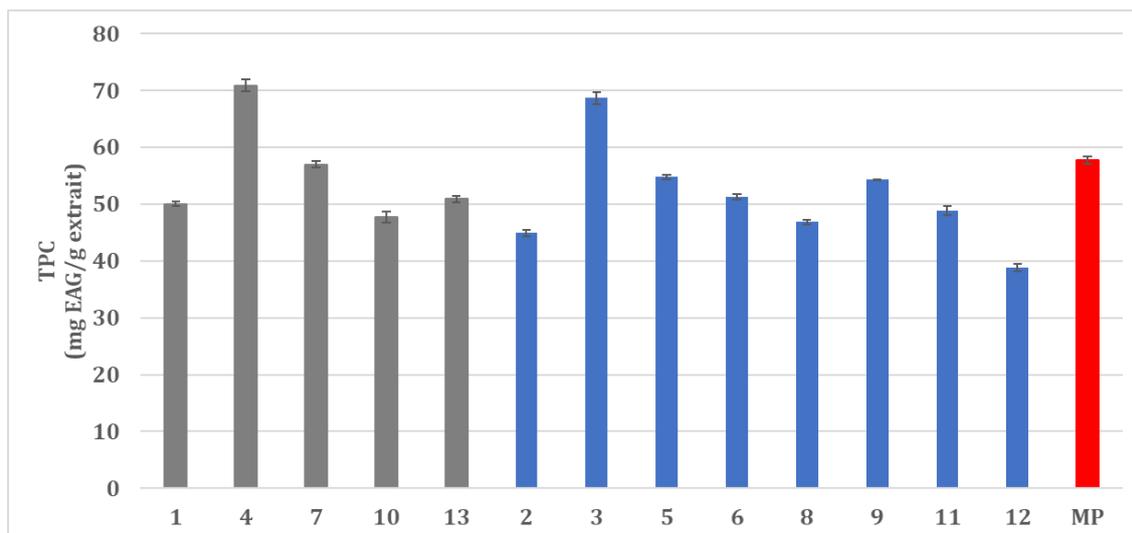


Figure 33- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE1)

La **Figure 33** montre que, hormis les points centraux, l'échantillon 3 ($68,68 \pm 2,56$ mg EAG/g extrait) traité avec une pression de vapeur saturée de 500 kPa pendant 80 secondes est le seul à avoir une valeur de TPC supérieure à l'échantillon non traité ($57,80 \pm 0,64$ mg EAG/g extrait). En revanche, l'essai 12 traité à la même pression de vapeur saturée mais pendant 20 secondes présente la teneur phénolique la plus basse ($38,81 \pm 0,59$ mg EAG/g extrait) parmi tous les autres essais.

Ce résultat se traduit par le diagramme de Pareto de la **Figure 34** qui montre que la variation du temps de traitement est le facteur le plus proche d'avoir un effet statistiquement significatif sur les valeurs de TPC des échantillons avec une corrélation positive entre le temps et la teneur phénolique des extraits.

Cela semble logique, puisque les tranches de rhizomes sont relativement épaisses et d'un grand diamètre, ce qui fait qu'une durée de traitement prolongée est nécessaire pour que les phénomènes de transfert de chaleur et de matière, générés par l'injection de la vapeur d'eau saturée et du phénomène de condensation, pourront atteindre la totalité de la matrice traitée. Ce raisonnement s'applique également sur les échantillons 5 ($54,77 \pm 0,34$ mg EAG/g extrait) et 6 ($51,27 \pm 0,54$ mg EAG/g extrait) tous deux traités à 640 kPa pour une durée de 71 et 29 secondes respectivement, et les échantillons 8 ($46,85 \pm 0,39$ mg EAG/g extrait) et 9 ($54,36 \pm 0,06$ mg EAG/g extrait) d'autre part tous deux traités à 360 kPa pour une durée de 29 et 71 secondes.

En revanche, la variation de la pression de vapeur saturée était loin d'avoir un effet statistiquement significatif sur la teneur phénolique des échantillons de rhizomes de *R. ribes* L. (**Figure 34**).

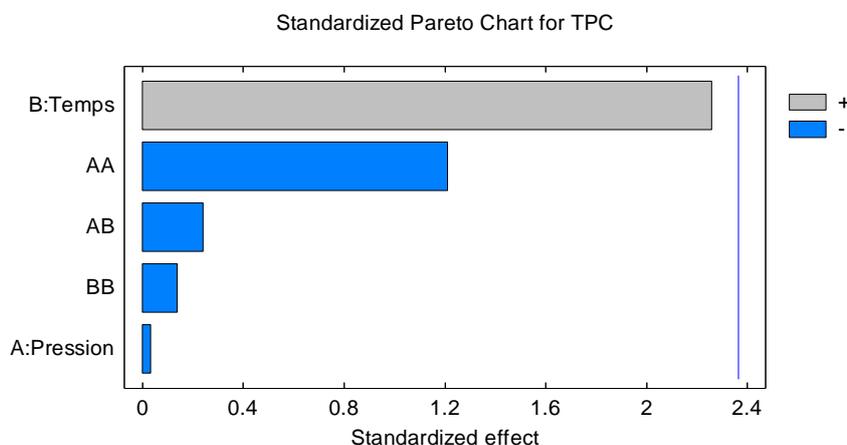


Figure 34- Diagramme de Pareto pour les teneurs totales en polyphénols des échantillons du DOE1

1.2.2. Teneur totale en flavonoïdes

Les résultats de la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium pour la détermination des flavonoïdes dans les extraits aqueux traités ou non-traités par DIC sont répertoriés dans le **Tableau 20**. Comme pour les résultats obtenus pour les teneurs phénoliques totales des extraits de *R. ribes* L., les valeurs de TFC des points centraux démontrent un manque de répétabilité.

Hormis les points centraux, la valeur de TFC la plus élevée a été enregistrée pour l'échantillon 11 ($50,58 \pm 1,03$ mg EQ/ g extrait), traité avec une pression de vapeur saturée de 300 kPa pour une durée de 50 secondes (**Figure 35**). En revanche, la valeur de TFC la plus faible est obtenue pour l'échantillon 2 ($44,94 \pm 0,61$ mg EQ/ g extrait), qui a subi la même durée de traitement que l'échantillon 11 mais avec la pression de vapeur la plus élevée (700 kPa).

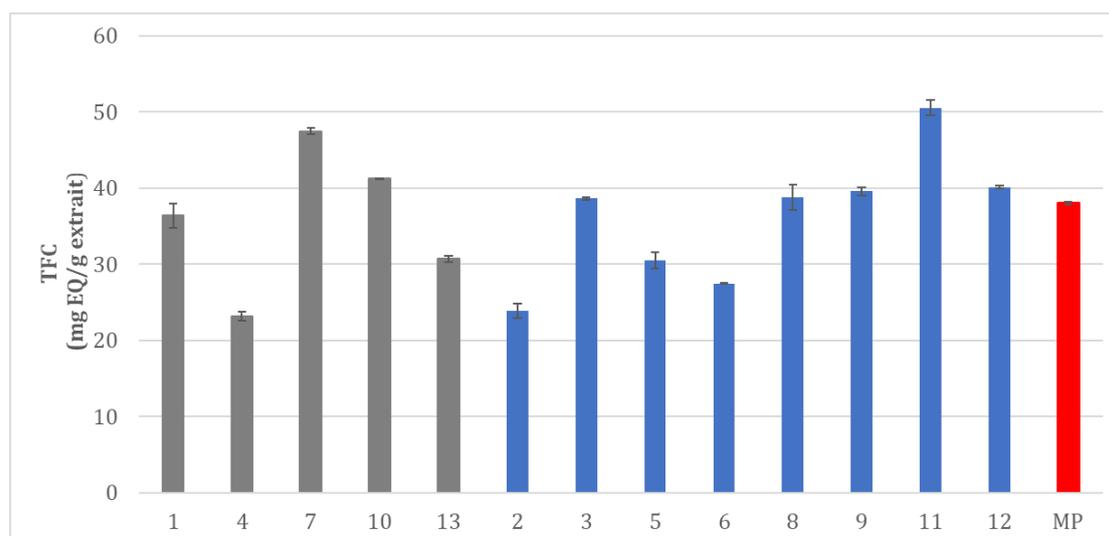


Figure 35- Teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC

Contrairement aux résultats de TPC, le diagramme de Pareto de la **Figure 36-A** montre qu'au moins l'un des paramètres expérimentaux a un effet statistiquement significatif sur les valeurs de TFC des échantillons. En effet, la variation la pression de vapeur saturée a affecté la teneur en flavonoïdes des rhizomes de *R. ribes* L.. Le diagramme des effet principaux de la **Figure 36-B** illustre la corrélation négative qui existe entre les valeurs de TFC des échantillons et la pression de vapeur saturée.

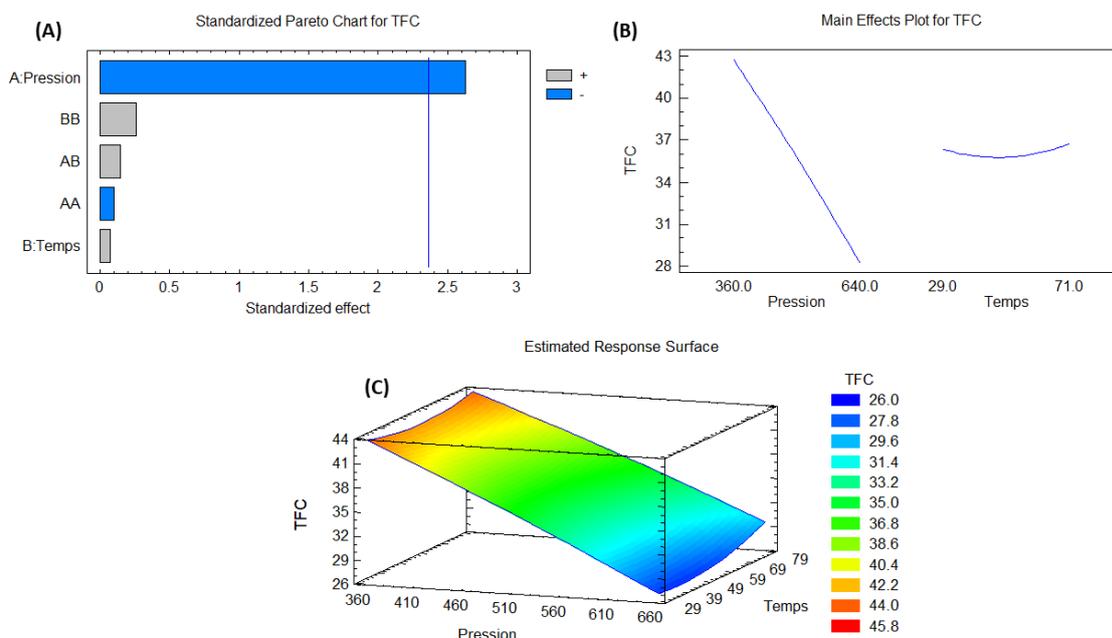


Figure 36- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 1

Les températures de traitement sont liées aux pressions de vapeur saturée adoptées. Selon l'équation d'Antoine pour l'eau pure (7) (Wang et al. 2007), nous pouvons déterminer à quelles températures nous avons traité nos rhizomes en fonction de la pression de vapeur saturée injectée. Des pressions de vapeur saturée allant de 300 à 700 kPa correspondent à des températures variant entre 134 et 165 °C. Les flavonoïdes sont thermosensibles et cela a été prouvé dans plusieurs travaux tels que ceux de Chaaban et al., (2017), qui ont constaté que des températures supérieures à 100°C, dégradent fortement les flavonoïdes.

$$P_v = 10^{10.09938 - \frac{1681}{(-43.037+T)}} \quad (7)$$

Où P_v est la pression de vapeur saturée (Pa) et T est la température (K)

L'équation polynomiale (8) estimée à partir du RSM de la **Figure 36-C** indique avec $R^2=50,14\%$ que les variables indépendantes expliquent à moitié la variation de la teneur totale en flavonoïdes des extraits. L'élimination de la source de variation provenant de l'hétérogénéité des rondelles de rhizomes pourra peut-être renforcer la relation entre les variables indépendantes de la DIC et la teneur totale en flavonoïdes

$$TFC = 66,445 - 0,045P - 0,260t + 0,000015P^2 + 0,00019Pt + 0,0017t^2 \quad (8)$$

L'équation (8) a également confirmé que les conditions DIC de pression de vapeur saturée de $P = 300$ kPa et de temps de traitement thermique de $t = 20$ s, se rapportent à la valeur optimale de TFC à 47,9 mg EQ/g extrait, qui est environ 26 % plus élevée que la teneur en flavonoïdes de la matière première.

1.2.3. Activité antioxydante

Le **Tableau 20** est une évaluation des activités antioxydantes des différents extraits à travers la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH (IC50).

Comme pour les deux autres variables réponses, les valeurs de IC50 des points centraux présentent une forte variabilité. Sachant que l'activité antioxydante dans les rhizomes de *R. ribes* L. est en lien avec la présence des métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes (Abdulla et al., 2014), cette corrélation positive entre les valeurs de TPC/TFC et l'activité antioxydante des échantillons était attendue. La **Figure 37** met en

évidence que l'échantillon 2 ($81,47 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$), traité à 700 kPa pour une durée de 50 secondes, est celui qui a l'activité antioxydante la plus faible. Or cet échantillon est également celui qui a la teneur en flavonoïdes la plus basse. Ce constat se vérifie aussi pour l'échantillon 6 ($68,51 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$), traité à 640 kPa pour 29 secondes, qui présente également une basse teneur en flavonoïdes et une faible activité antioxydante.

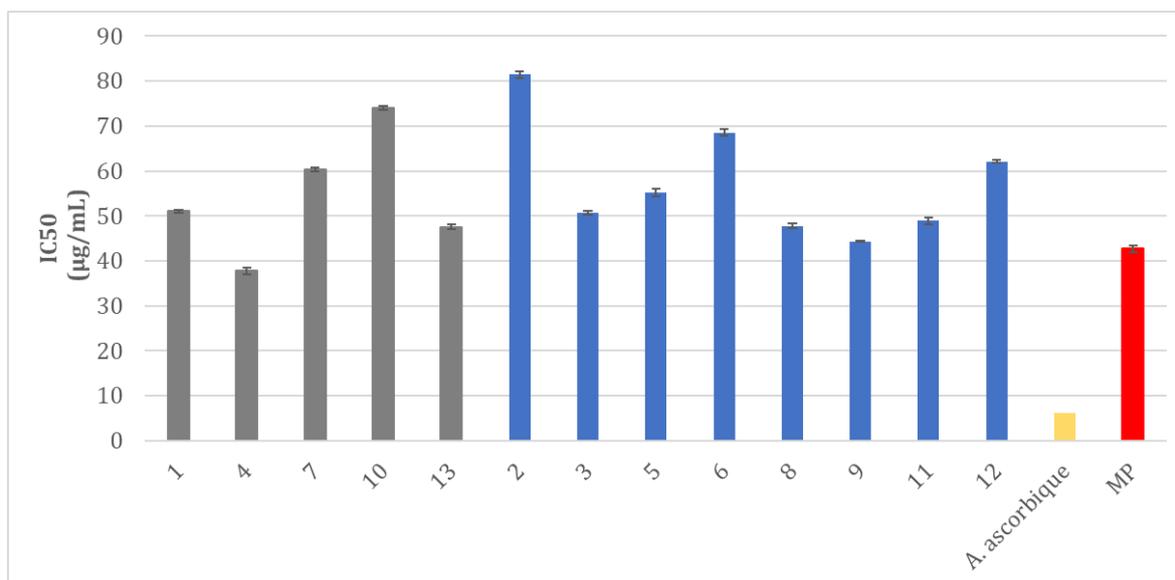
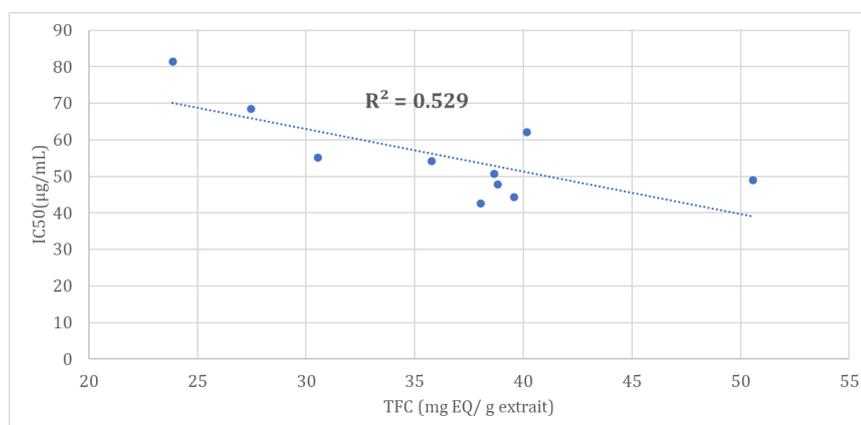


Figure 37- Valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC et pour l'acide ascorbique

Les régressions linéaires simples montrent que les valeurs de TFC dépendent plus ou moins des valeurs de IC50 ($R^2 = 0,529$), alors qu'il existe une très faible liaison entre les valeurs de TPC et celles de IC50 ($R^2 = 0,203$) (**Figure 38**).



(A)

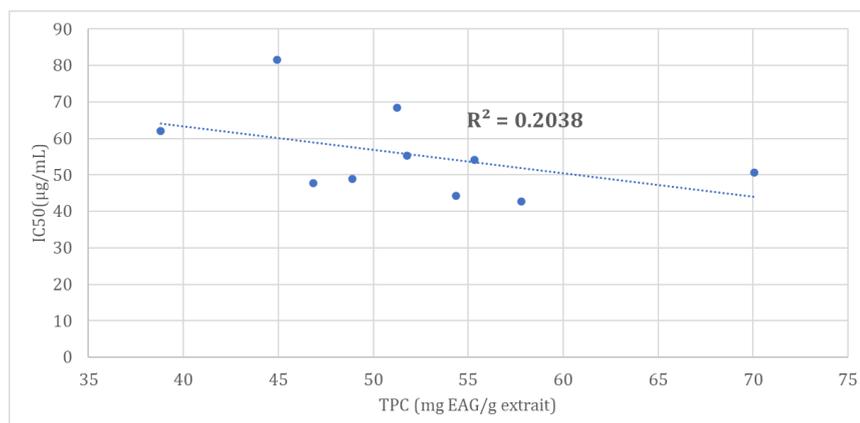
**(B)**

Figure 38- Régressions simples de TFC vs IC50 (A) et de TPC vs IC50 (B)

Ces relations entre les variables de réponse se traduisent bien dans le diagramme de Pareto (**Figure 39-A**). Ce dernier montre que la variation de la pression de vapeur saturée est le seul paramètre à avoir un effet significatif sur l'activité antioxydante des échantillons, comme c'était le cas pour les valeurs de TFC, d'où la moyenne relation entre les valeurs de TFC et de IC50.

Plusieurs études ont rapporté le manque de corrélation entre le contenu phénolique total et les capacités antioxydantes d'un certain nombre d'extraits de plantes médicinales (Kaur, 2014; Wong et al., 2006b). En effet, la capacité antioxydante ne provient pas uniquement du contenu phénolique des plantes, mais pourrait être due à la présence d'autres composés phytochimiques, tels que l'acide ascorbique, le tocophérol et les pigments, etc., qui contribuent également à la capacité antioxydante totale (Kaur, 2014). Une autre source d'erreur pourrait provenir du manque de spécificité de la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu utilisée pour déterminer les composés phénoliques totaux (Wong et al., 2006b). En effet, le réactif de Folin Cio-Calteu ne quantifie pas seulement les phénols totaux, mais réagit également avec n'importe quel agent réducteur de la solution testée, ce réactif n'est pas suffisamment sélectif (Xiaowei et al., 2021).

Le diagramme des effet principaux (**Figure 39-B**) illustre la corrélation négative qui existe entre les valeurs de IC50 des échantillons et la pression de vapeur saturée. Cela peut revenir à la dégradation des flavonoïdes aux hautes températures.

L'équation polynomiale (9) estimée à partir du RSM (**Figure 39-C**) indique avec $R^2=54,12\%$ que les variables indépendantes expliquent à moitié la variation des activités

antioxydantes des extraits. De même, l'élimination de la variation au niveau des rondelles de rhizomes pourra peut-être renforcer la relation entre les variables indépendantes de la DIC et l'activité antioxydante des échantillons.

$$IC50 = 53,916 - 0,083P + 0,341t + 0,00019P^2 - 0,00084Pt - 0,0011t^2 \quad (9)$$

L'équation (9) a également confirmé que les conditions optimales de pression de vapeur saturée de $P = 387$ kPa et de temps de traitement thermique de $t = 80$ s, permettent d'atteindre la valeur optimale de IC50 à $44,76 \mu\text{g/mL}$. Cette valeur optimale de IC50 reste supérieure à celle de l'échantillon MP ($42,67 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le traitement par de hautes pressions de vapeur saturée entraîne une certaine dégradation thermique des composés thermosensibles à pouvoir antioxydant.

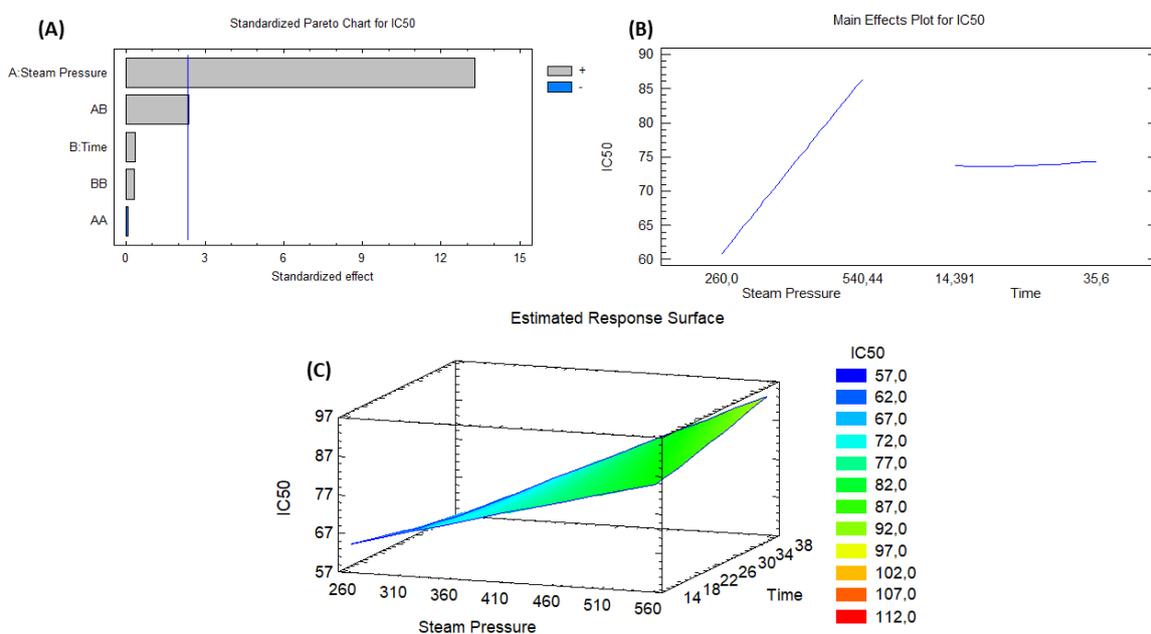


Figure 39- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les valeurs de IC50 des échantillons du DOE1

2. Le deuxième plan d'expériences (DoE 2)

2.1. Rappel du dispositif expérimental

En se basant sur les résultats du premier plan d'expériences, nous avons décidé de modifier l'état des rhizomes avant leur traitement, ainsi que les valeurs des paramètres indépendants de la DIC. Ainsi, le deuxième plan d'expériences a été effectué sur des rhizomes de *R. ribes* L. broyés. Seules les particules de diamètre compris entre 0,4 et 2 mm

ont été retenues pour l'application du traitement DIC. L'effet négatif de la haute pression de vapeur sur les échantillons du DOE1 a été également pris en considération. Pour cela, les niveaux de pression adoptés pour le DOE2 ont varié entre 200 et 600 kPa, pour un temps de traitement entre 10 et 40 secondes. Les variables réponses (TPC, TFC et activité antioxydante) des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC sont répertoriées dans ce qui suit.

2.2. Criblage phytochimique et activité antioxydante

2.2.1. Teneur phénolique totale

Les résultats de la teneur phénolique des extraits traités et non-traités (MP) par DIC sont répertoriés dans le **Tableau 21**. Comme le montre la **Figure 40**, les valeurs de TPC les plus élevées sont enregistrées pour les échantillons 8 ($91,6 \pm 1,7$ mg EAG/g extrait), 11 ($92,1 \pm 0,3$ mg EAG/g extrait) et 9 ($94,0 \pm 0,9$ mg EAG/g extrait). Ces échantillons ont été traités à 260, 200 et 260 kPa pendant 14, 25 et 36 secondes, respectivement. Toutefois, les valeurs de TPC les plus faibles sont attribuées aux échantillons 5 ($69,4 \pm 0,2$ mg EAG/g extrait), 2 ($72,1 \pm 1,9$ mg EAG/g extrait), 3 ($77,7 \pm 0,9$ mg EAG/g extrait) et 6 ($79,6 \pm 0,8$ mg de EAG/g extrait) traités à 540, 600, 400 et 540 kPa pendant 36, 25, 40 et 14 secondes, respectivement. Ces résultats révèlent que plus la température, positivement corrélée avec la pression de vapeur saturée, est élevée, plus le niveau de composés phénoliques est faible.

Par ailleurs, il convient de noter que seuls les échantillons 8, 11 et 9 de rhizomes traités par DIC avaient une teneur en TPC supérieure à l'échantillon MP ($89,3 \pm 1,5$ mg EAG/g extrait). Deux mécanismes peuvent expliquer la perte de composés phénoliques, notamment pour les échantillons traités à des pressions de vapeur saturante élevées. Soit l'autovaporisation contribue à expulser les polyphénols dans le réservoir à vide, soit ces derniers ont subi une dégradation thermique en raison de leur exposition à une pression de vapeur saturante élevée. Pour tester la première hypothèse, les eaux condensées résultants du traitement DIC ont été récupérées du réservoir à vide pour déterminer leur teneur phénolique. La valeur moyenne de TPC des condensats était d'environ 0,06 mg EAG/g MS (matière sèche), ce qui est négligeable par rapport à la teneur phénolique de la matière première et des extraits traités par DIC. Par conséquent, l'hypothèse la plus

probable est que la pression de vapeur saturée élevée provoque une dégradation thermique des composés phénoliques.

Kamal et al., (2015), ont également signalé une diminution de la valeur de TPC dans les échantillons de feuilles de "henné" traitées à des températures élevées, probablement en raison de la dégradation thermique. Des études antérieures ont montré que les polyphénols des oignons rouges sont gravement endommagés à des températures élevées (Liu et al., 2014). De plus, Arapitsas and Turner, (2008), ont adopté un DoE pour optimiser les conditions les plus adéquates pour l'extraction des polyphénols dans le chou rouge.

Leurs résultats ont confirmé que des températures supérieures à 120°C ont été fortement destructrices pour les polyphénols.

En se basant sur ces résultats, et sur l'équation d'Antoine pour l'eau pure (7), nous pouvons déterminer la raison pour laquelle les composés phénoliques des rhizomes de *Rheum ribes* L. ont été protégés de la dégradation thermique à de faibles pressions de vapeur saturée.

Tableau 21- Conditions expérimentales des différents essais du DoE2 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP) par DIC

	Essai n°	Pression (kPa)	Temps (s)	TPC (mg EAG/g extrait)	TFC (mg EQ/g extrait)	IC50 (µg/mL)
Points centraux	1			80,47±0,30	90,19±1,54	73,58±0,13
	4			79,64±1,03	90,83±1,38	73,32±0,08
	7	400	25	80,39±1,24	90,07±0,31	73,53±0,19
	10			78,60±0,81	90,93±2,03	74,09±0,39
	13			79,01±0,45	90,53±0,88	73,81±0,20
	2	600	25	72,15±1,97	63,60±1,48	89,97±0,87
	3	400	40	77,68±0,90	88,39±0,53	78,08±0,28
	5	540	36	69,36±0,22	85,61±1,40	89,39±0,36
	6	540	14	79,57±0,81	88,96±1,04	86,34±0,15
	8	260	14	91,60±1,71	92,04±0,13	64,61±0,43
	9	260	36	94,00±0,95	101,14±0,74	54,56±0,19
	11	200	25	92,14±0,32	99,35±1,21	57,34±0,09
	12	400	10	86,68±0,85	87,50±1,53	70,97±0,44
	MP	-	-	89,29±1,51	80,74±2,39	71,30±0,50

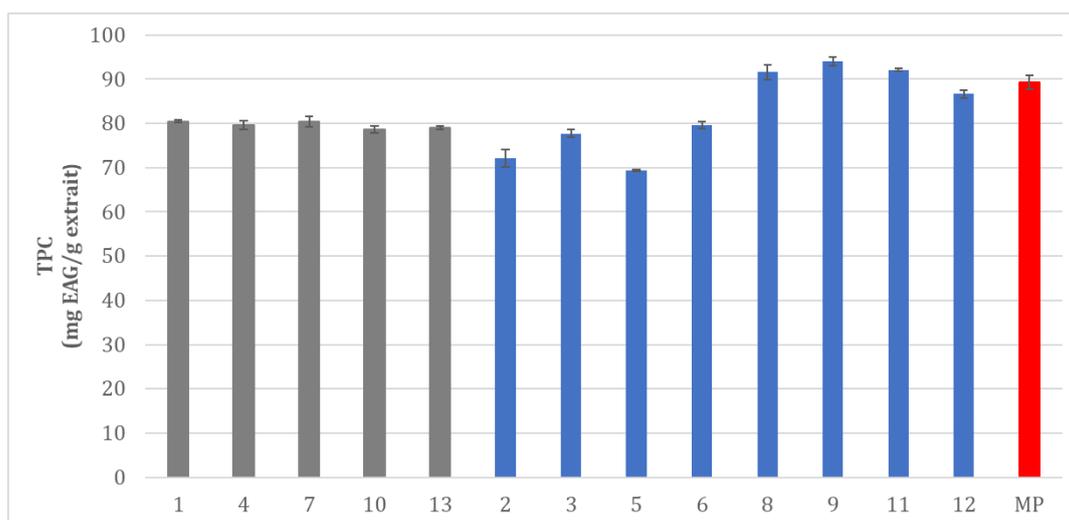


Figure 40- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE2)

Les valeurs de TPC figurant dans le **Tableau 21** ont été analysées statistiquement et le résultat est illustré à travers le diagramme de Pareto, les tendances principales des paramètres de fonctionnement de la DIC et la surface de réponse (RSM) (**Figure 41**).

Le diagramme de Pareto (**Figure 41-A**) montre que les variations des deux paramètres « P » et « t » de la DIC ont un effet significatif sur les valeurs de TPC. Cependant, la variation de la pression de vapeur saturée était la plus importante, alors que les effets séparés (**Figure 41-B**) révèlent qu'il existe un effet négatif des deux paramètres, pression de vapeur saturée et temps de traitement, sur la teneur phénolique.

L'équation polynomiale (**10**) estimée à partir de RSM indique avec $R^2 = 96,49\%$ la haute qualité d'ajustement du modèle de TPC. Les résultats globaux ont révélé que le traitement DIC des rhizomes de *R. ribes* L. à basse pression de vapeur saturée permet une augmentation de l'extractibilité des contenus phénoliques.

$$TPC = 112,054 - 0,0773P - 0,227t + 0,000089P^2 - 0,002Pt + 0,0162t^2 \quad (10)$$

L'équation (**10**) a également confirmé que les conditions DIC de pression de vapeur saturée de $P = 200$ kPa et de temps de traitement de $t = 40$ s, permettent d'atteindre la valeur optimale de TPC de $100,5$ mg EAG/g extrait, qui est environ $12,63\%$ plus élevée que celle de la matière première.

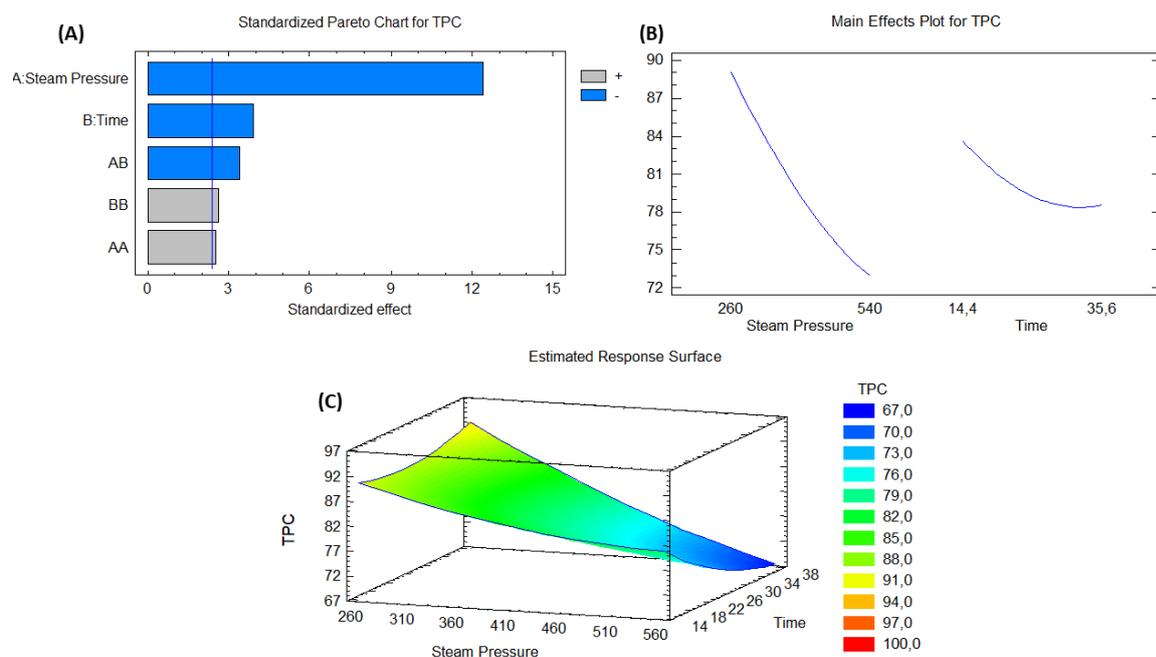


Figure 41- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs phénoliques totales des échantillons du DOE 2

2.2.2. Teneur totale en flavonoïdes

Les résultats de la détermination des flavonoïdes dans les extraits aqueux traités ou non-traités par DIC sont répertoriés dans le **Tableau 21**. Les trois valeurs de TFC les plus élevées ont été enregistrées pour les mêmes échantillons qui présentaient les valeurs de TPC les plus élevées, c'est-à-dire les échantillons 8 ($92,0 \pm 0,1$ mg EQ/g extrait), 11 ($99,4 \pm 1,2$ mg EQ/g extrait) et 9 ($101,1 \pm 0,7$ mg EQ/g extrait). Ces échantillons ont été traités à 260, 200 et 260 kPa pendant 14, 25 et 36 secondes, respectivement. Toutefois, la valeur de TFC la plus basse est attribuée à l'échantillon 2 ($63,6 \pm 1,5$ mg EQ/g extrait), traité à 600 kPa pendant 25 secondes. Le même échantillon avait également une faible teneur phénolique totale. La valeur TFC de la matière première ($80,7 \pm 2,4$ mg EQ/g extrait) était inférieure à toutes les autres valeurs TFC des rhizomes traités par DIC, à l'exception de l'échantillon 2 qui a été traité avec la pression de vapeur saturée la plus élevée (**Figure 42**).

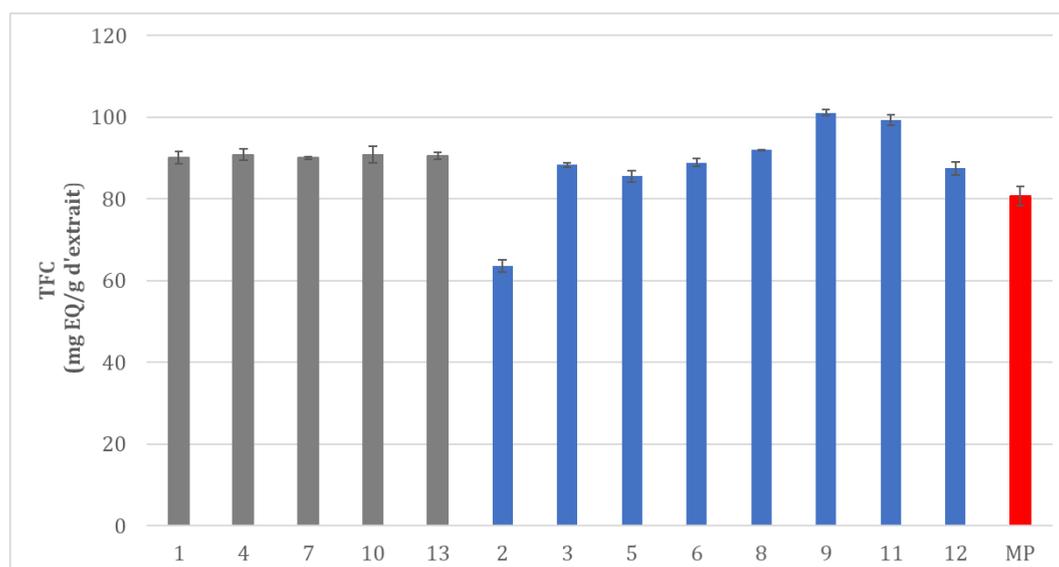


Figure 42- Teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC du DOE 2

Le diagramme de Pareto (**Figure 43-A**) montre que la variation de pression de vapeur saturée est le seul paramètre opérationnel de la DIC à avoir un effet significatif sur les valeurs de TFC. Le diagramme d'effet principal (**Figure 43-B**) révèle qu'il existe une corrélation négative entre la pression de vapeur saturée et la teneur totale en flavonoïdes des échantillons traités. La présentation de la surface de réponse (**Figure 43-C**) révèle l'équation polynomiale (11) estimée à partir du RSM avec $R^2 = 75,45 \%$, ce qui indique la qualité de l'ajustement du modèle TFC par rapport à P et t.

$$TFC = 74,321 + 0,0992P + 0,60441t - 0,00013P^2 - 0,002Pt + 0,00574t^2 \quad (11)$$

De plus, l'équation (5) permet d'optimiser les conditions de traitement DIC. À une pression de vapeur saturée de $P = 200$ kPa et une durée de traitement thermique de $t = 40$ s, la valeur optimale de TFC était de 105,8 mg EQ/g extrait, soit environ 31 % de plus que la matière première. Les résultats globaux ont révélé que le traitement DIC des rhizomes de *R. ribes* L. à basse pression de vapeur saturée permet une augmentation de l'extractibilité des flavonoïdes.

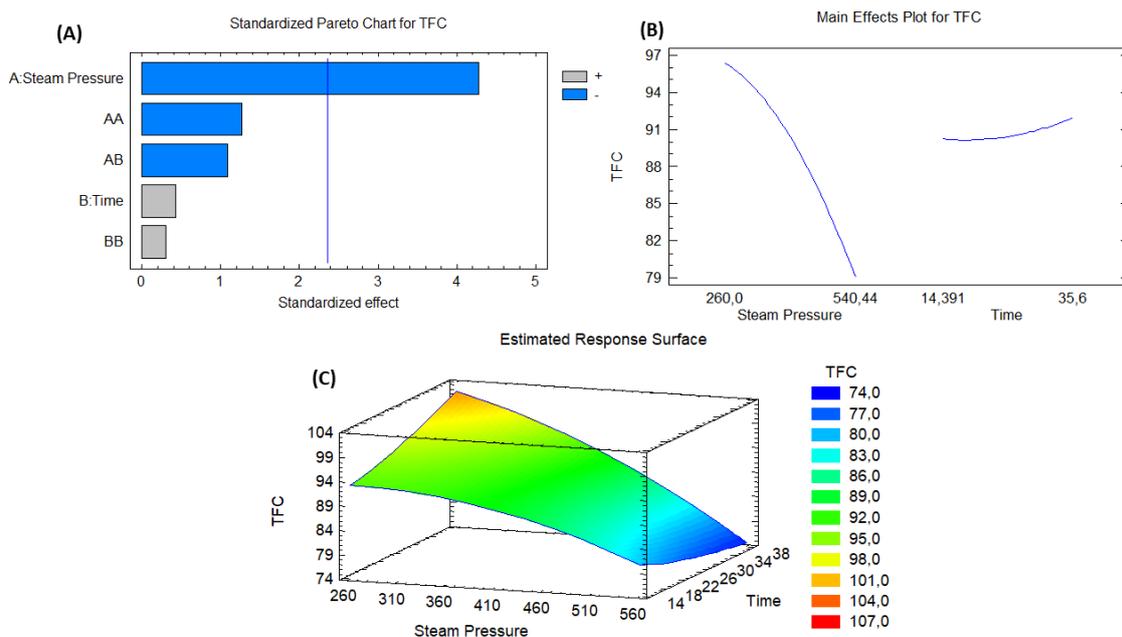


Figure 43- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 2

2.2.3. Activité antioxydante

Les activités antioxydantes des échantillons de rhizomes traités et non-traités par DIC sont présentées dans le **Tableau 21**. Les activités antioxydantes les plus élevées sont, à nouveau ; celles des échantillons 9 ($54,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$), 11 ($57,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), et 8 ($64,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), qui enregistraient auparavant les valeurs de TPC et TFC les plus élevées. La valeur de IC₅₀ la plus élevée de tous les extraits a été enregistrée pour l'échantillon 2 ($90,0 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) qui a été traité avec la pression de vapeur saturée la plus élevée (600 kPa) (**Figure 44**).

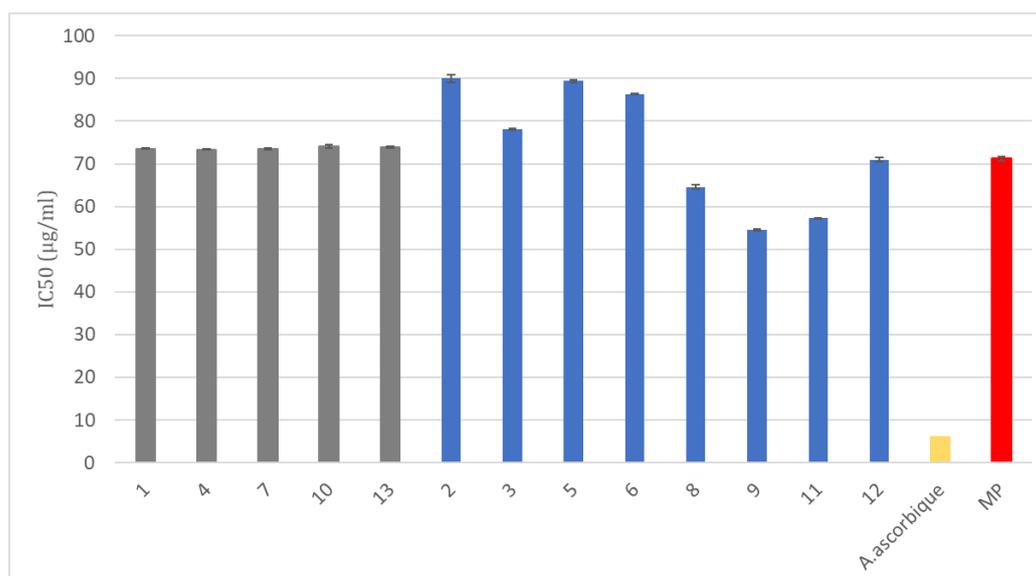


Figure 44- Valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non-traités (MP) par DIC du DOE 2

Le diagramme de Pareto (**Figure 45-A**) montre que la variation de pression de vapeur saturée est la seule à avoir un effet significatif sur les valeurs de IC50. De plus, le graphique des effets principaux (**Figure 45-B**) révèle que la IC50 des rhizomes traités est corrélée positivement avec la pression de vapeur saturante. L'équation polynomiale estimée à partir du RSM est présentée en (12) avec $R^2 = 96,3 \%$ ce qui indique que le modèle ajusté explique bien la variabilité de la IC50.

$$IC50 = 58,64 + 0,04215P - 0,96328t - 0,000005P^2 + 0,00213Pt + 0,002895t^2 \quad (12)$$

L'observation du graphique de surface de réponse (**Figure 45-C**) confirme que les conditions de pression de vapeur saturée $P = 200$ kPa et du temps de traitement $t = 40$ s correspondent à la valeur optimale de IC50 soit $49,9 \mu\text{g/mL}$, ce qui est d'environ $29,9 \%$ inférieur à la IC50 de la matière première.

Les résultats globaux ont révélé que le traitement DIC des rhizomes de *R. ribes* L. à basse pression de vapeur saturante augmente l'activité antioxydante des extraits aqueux, sans effet significatif du temps de traitement. Ce résultat est en cohérence avec les résultats précédents, où l'échantillon 2 enregistrait la plus faible concentration en TPC et TFC.

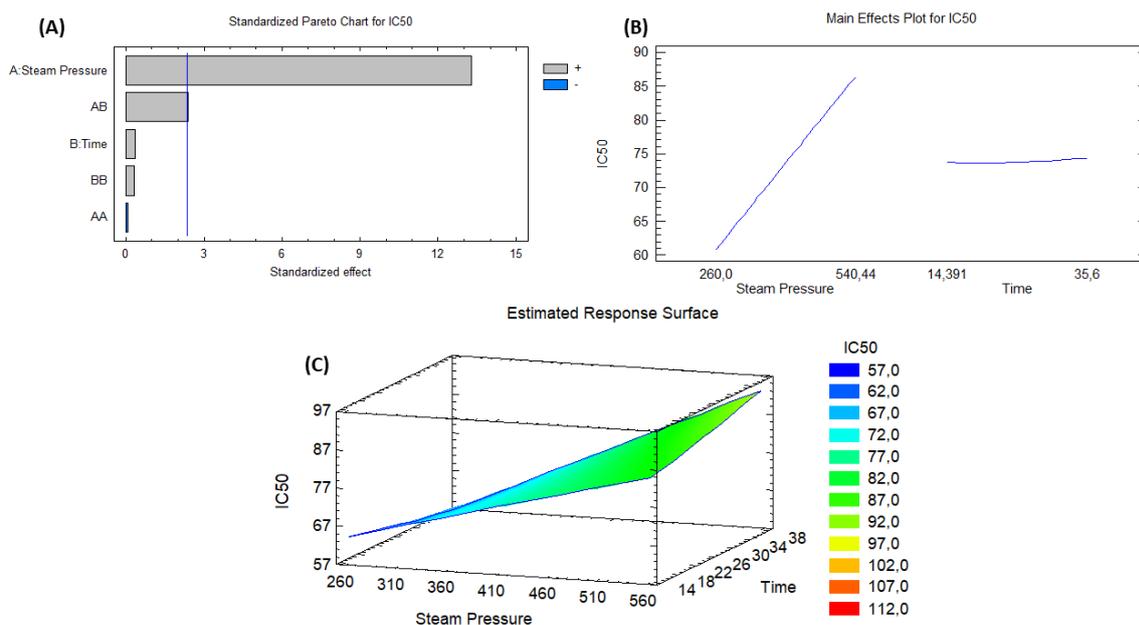


Figure 45- Diagramme de Pareto (A), effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les valeurs de IC50 des échantillons du DOE 2

Une simple régression de TPC vs IC50 donne un coefficient de corrélation de -0,919, ce qui implique une relation relativement forte et négative entre les deux variables dépendantes. D'autres chercheurs ont déjà montré qu'il existe une corrélation positive entre le contenu phénolique total et la capacité antioxydante (Öztürk et al., 2007).

Une autre régression simple de TFC vs IC50 donne un coefficient de corrélation de -0,778, impliquant une relation moyennement forte et négative entre les deux variables.

De ces résultats, il convient de conclure que le TPC est le facteur principal pour la détermination de l'activité antioxydante d'un extrait, tandis que le TFC est un facteur secondaire, ce qui implique que les principaux polyphénols antioxydants ne sont pas de type flavonoïde. Un autre constat peut expliquer la moyenne corrélation entre les valeurs de TFC et l'activité antioxydante. En effet, seuls les flavonoïdes ayant une certaine structure et présentant en particulier un groupement hydroxyle en une position spécifique de la molécule (Aryal et al., 2019), peuvent agir comme donneurs de protons et donc présenter une activité antioxydante (Kaur, 2014; Nickavar et al., 2007; Wojdyło et al., 2007).

2.3. Cinétique d'extraction des rhizomes traités et non traités (MP)

Le suivi de la teneur en matières solubles (exprimée en °Brix) des solutions d'extraction des échantillons traités et non-traités par DIC sur une durée de 24 heures sont présentés dans la **Figure 46**.

Seuls les points 2, 5 et 6 présentent des valeurs de °Brix plus élevées que celle du point MP après 24 heures de macération. De même, les concentrations finales en matières solubles des extraits provenant des points 2, 5 et 6 sont plus élevées que celles de tous les autres échantillons. Or, ces points sont ceux qui ont été traités avec les plus fortes pressions de vapeur saturée (600 et 540 kPa). En se basant sur les résultats du criblage phytochimique du DOE 2, nous pouvons noter que les points 2, 5 et 6 sont aussi ceux ayant les plus basses valeurs de TPC, TFC et les plus faibles activités antioxydantes. Par conséquent, nous pouvons conclure que cette augmentation dans le rendement d'extraction ne concerne pas les molécules bioactives à pouvoir antioxydant.

Sachant que les rhizomes de *R. ribes* L. contiennent des sucres tel que le fructose, maltose, saccharose, etc., nous pouvons supposer que les hautes pressions du traitement DIC ont abouti à l'augmentation de l'extraction des sucres solubles dans les solutions de macération.

Ces résultats nous amènent aussi vers une autre hypothèse en relation avec certains composés dits polyphénols glycosylés présents dans les matières végétales. En effet, Öztürk et al., (2007), ont rapporté la présence du physcion-8-O-glucoside et de l'aloemodin-8-O-glucoside dans les rhizomes de *R. ribes* L. La disponibilité des parties glycosylées, qui est peut être à l'origine de l'augmentation du °Brix des solutions d'extraction des points 2, 5 et 6, serait basée sur la dégradation des composés phénoliques auxquels elles étaient attachées (Kamal and Allaf, 2013; Usha Rani and Anu Appaiah, 2012). Ainsi, ce raisonnement expliquerait la raison pour laquelle les extraits 2, 5 et 6, qui présentaient les valeurs de TPC et TFC les moins élevées, sont les mêmes à être les plus concentrés en matière solubles. Nous pouvons supposer que les fortes pressions de vapeur saturée du traitement DIC sont responsables de la libération des fractions glycosylées d'une part et, par voie de conséquence, de la dégradation des polyphénols auxquels ces sucres étaient joints, d'autre part.

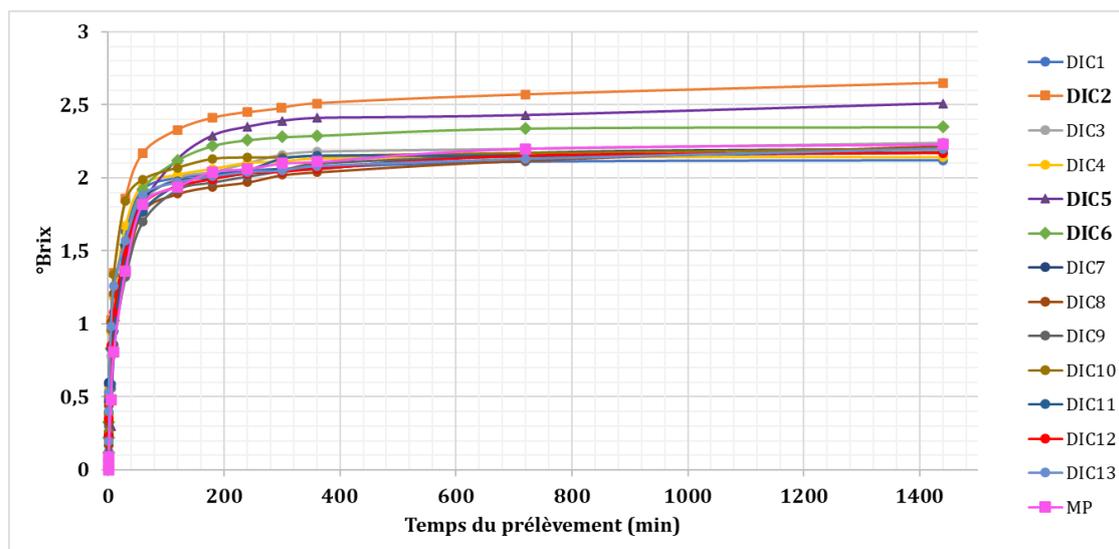


Figure 46- Suivi de la teneur en matières solubles (°Brix) des solutions d'extraction des échantillons traités et non-traités par DIC sur une durée de 24 heures

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les données expérimentales des deux premiers plans d'expériences de notre étude. Les résultats couvrent les criblages phytochimiques (TPC et TFC) ainsi que les mesures des activités antioxydantes des extraits du DoE 1 et du DoE 2. Le suivi de la teneur en matières solubles des solutions d'extraction des échantillons du DOE 2 a été également présenté.

Un manque de répétabilité au niveau des valeurs de TPC, TFC et IC₅₀ des points centraux du DOE 1 a été observé. En revanche, ceci n'a pas été le cas au niveau des résultats des points centraux du DoE 2 où les rhizomes ont subi un broyage mécanique avant leur traitement par DIC. Il convient de conclure que la variabilité provenant de l'hétérogénéité de la matière première du DoE 1 a masqué l'effet des variables opératoires du traitement par DIC. La pression de vapeur saturée semblait ne pas avoir un effet significatif sur les valeurs de TPC des échantillons du DoE 1, contrairement à ce qu'il a été constaté aux niveaux des résultats de TFC et de l'activité antioxydante. En effet, les valeurs de ces derniers ont été négativement corrélées avec l'augmentation de la pression de vapeur. Ceci pourrait être à l'origine de la dégradation des molécules à pouvoir antioxydant, y compris les flavonoïdes, ce qui explique la présence d'une corrélation négative.

D'autre part, les résultats obtenus à partir du DOE 2 ont révélé que la technologie DIC a un impact sur l'extractibilité des molécules actives des rhizomes de *Rheum ribes* L. Il a été

possible d'optimiser les paramètres opératoires de la DIC ($P = 200$ kPa et $t = 40$ sec) pour toutes les variables réponses. En effet, pour les trois facteurs réponses testés, les valeurs de TPC, TFC et les activités antioxydantes les plus élevées ont été attribuées aux échantillons traités à faible pression. Finalement, le suivi de la teneur en matières solubles des solutions d'extraction des échantillons du DoE 2 a montré, qu'après 24 heures de macération, seuls les points traités à pression de vapeur saturée élevée, présentent des valeurs de °Brix plus importantes que celle du point non traité (MP). Ce résultat nous conduit à 2 hypothèses plus ou moins liées : une dégradation des polyphénols glycosylés ou une augmentation de l'extraction des sucres solubles dans les solutions de macération.

Chapitre IV

Le troisième plan d'expériences : un plan à trois paramètres opératoires

1. Rappel du dispositif expérimental

En se basant sur les résultats des deux premiers plans d'expériences, on a envisagé d'effectuer un troisième plan d'expériences en adoptant des pressions de vapeur saturée encore plus basses que celles employées dans le DoE 2. On a également souhaité d'étudier d'une part l'impact de la variation de la teneur en eau « W » des rhizomes broyés sur les variables réponses, et d'une autre part la relation qui existe entre la variation de « W » et la phase de transition vitreuse « T_g » de la matière. Une macération dans de l'éthanol pur d'un échantillon non traité par DIC (MP alcoolique) et selon le même protocole de l'extraction aqueuse a été également effectuée.

2. Variation de l'humidité initiale de la matière première

2.1. Notion de la température de transition vitreuse

Par définition, la transition vitreuse est la frontière qui sépare l'état caoutchouteux de la matière de son état vitreux. Cette frontière est variable en fonction de la nature de la matière et de sa teneur en eau « W ».

Il existe un certain nombre de modèles qui peuvent être utilisés pour décrire mathématiquement les températures de transition vitreuse des mélanges de composants, tel que l'équation de Gordon-Taylor **(13)** qui est généralement utilisée pour la prédiction de la T_g d'un mélange de composés (Gordon and Taylor, 1952). Cette équation est basée sur la théorie d'additivité des propriétés thermo-physiques de base de chaque composant dont l'eau. Pratiquement pour appliquer cette équation, il faut connaître les températures de transition vitreuse (« T_{g1} », « T_{g2} », etc.) des corps purs, leurs fractions massiques (« w₁ », « w₂ », etc.) et le coefficient de courbure « k », qui est ajusté à partir de plusieurs valeurs mesurées de T_g avec des compositions variables (Schugmann and Foerst, 2022):

$$T_g = \frac{w_1 * T_{g1} + k * w_2 * T_{g2}}{w_1 + k * w_2} \quad (13)$$

2.1. Traitement DIC : Positionnement par rapport à la courbe de la transition vitreuse

La **Figure 47-A** montre, dans le cas idéal, la position du traitement DIC par rapport à la phase de transition vitreuse. Le point A₀ représente la matière initiale avant son

traitement. Le passage de A_0 à B_0 illustre la phase d'injection de la vapeur d'eau saturée. L'état de la matière en phase de post-injection se traduit par le point B_0 où la matière subit un transfert de chaleur et de matière, notamment de l'eau condensée. Le passage de B_0 à C_0 représente la chute de pression brutale vers le vide qui est caractérisée par le phénomène d'autovaporisation, qui devrait impliquer une texturation et un refroidissement immédiat de ce matériau. Ce dernier évolue d'un état de haute température-haute humidité (B_0), vers un état de basse température-basse humidité (C_0) (Mounir et al., 2011). Suite à cette chute de pression, le produit traverse la transition vitreuse en passant de la zone caoutchouteuse à la zone vitreuse (phénomène de vitrification) (Mounir, 2007), au niveau de laquelle le matériau pourra préserver sa nouvelle structure (Turnbull and Cohen, 1961).

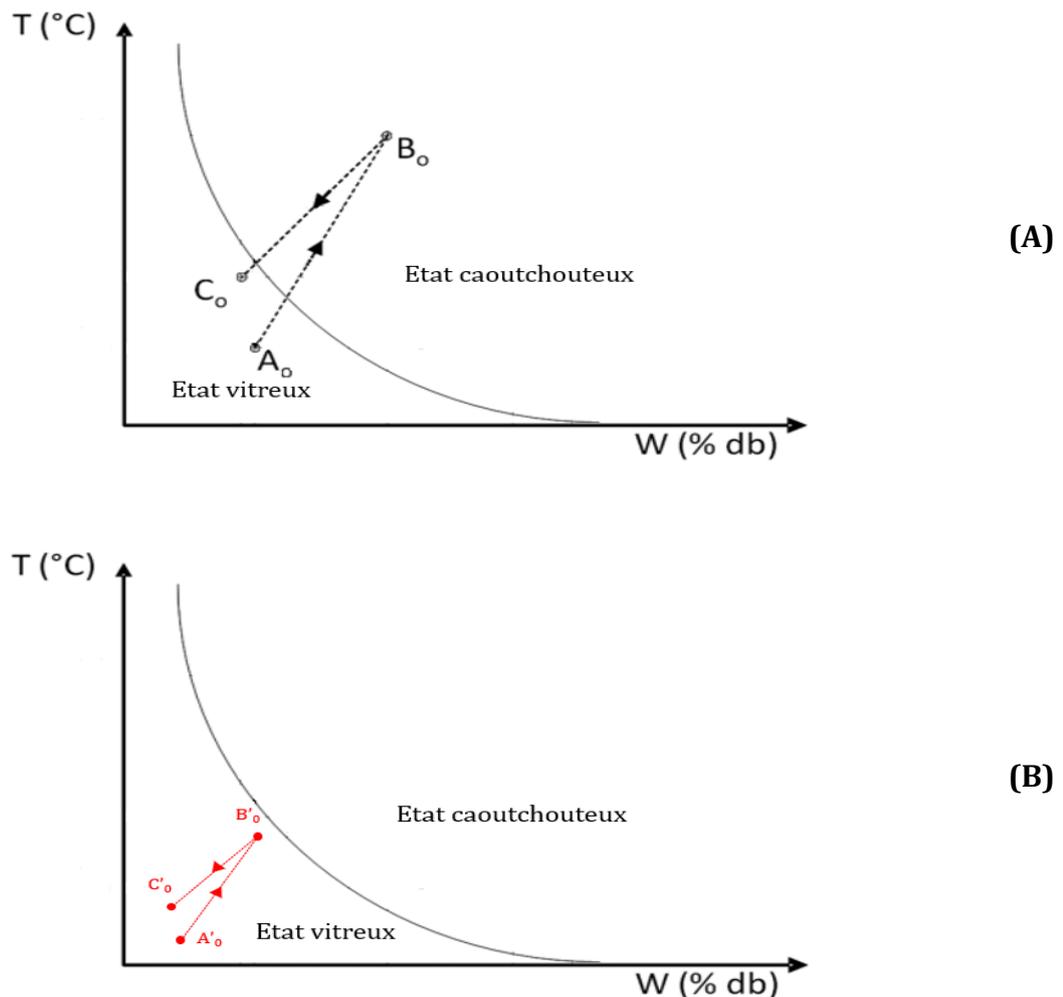


Figure 47- La position du traitement DIC par rapport à la phase de transition vitreuse dans le cas idéal (A) et dans le cas contraire (B)

La variation de l'humidité avant le traitement des rhizomes par DIC a été effectuée dans le but d'évaluer la possibilité de positionner la matière, en phase B₀, dans la zone dite caoutchouteuse et dans laquelle la matière se caractérise par un comportement rhéologique viscoélastique. Théoriquement, si avant la décompression la matière tombe dans la zone vitreuse (B'₀) (**Figure 47-B**), elle sera dans un état assez rigide pour subir un bon transfert de chaleur et de matière. Par conséquent la chute de pression ne va pas réussir à expanser la matière, dont l'intérêt de faire positionner B₀ dans la zone viscoélastique.

Ainsi, un traitement DIC optimisé exige que le produit soit en position B₀ dans la zone caoutchouteuse donnant ainsi un matériau sujet à la texturation. En outre, il faut que le produit en position C₀ soit au voisinage de la zone vitreuse aboutissant ainsi à un matériau poreux capable de préserver sa nouvelle structure.

2.2. Détermination de la teneur en eau du matériel traité à chaque stade du traitement DIC

Un des piliers de base du traitement par DIC est la phase d'injection de la vapeur d'eau saturée. Cette dernière vient en contact directe avec la paroi froide de la matière où elle se condense et se propage à son intérieur. A ce stade, et selon la pression de vapeur d'eau saturée préalablement fixée par l'expérimentateur, la teneur en eau de la matière traitée augmente pour atteindre un niveau « W' ». Ensuite, la chute brutale vers le vide génère le phénomène d'autovaporisation qui conduit le produit à céder une quantité d'eau pour d'atteindre son équilibre thermique et se trouver finalement à une teneur en eau finale « W'' ». Il est remarquable que les teneurs en eau de la matière avant et après son traitement par DIC subsiste généralement quasiment identique (W ≈ W''). La variation de la teneur en eau de la matière tout au long du traitement par DIC peut être déterminée en appliquant les équations **(14)** et **(15)** ci-dessous (Mounir et al., 2011).

$$W' = \frac{(C_{p(s)} + W C_{p(eau)})(T_t - T_i)}{L} + W \quad (14)$$

$$W'' = \frac{(C_{p(s)} + W' C_{p(eau)})(T_e - T_t)}{L} + W' \quad (15)$$

Où W = teneur en eau initiale (niveau A₀) (g H₂O/g MS)

W' = teneur en eau de la matière après l'injection de vapeur (niveau B_0) (g H₂O/g MS)

W'' = teneur en eau après la chute de pression (niveau C_0) (g H₂O/g MS)

$C_{p(s)}$ = chaleur spécifique du solide (J.kg⁻¹.K⁻¹)

$C_{p(eau)}$ = chaleur spécifique de l'eau (J.kg⁻¹.K⁻¹)

L = chaleur latente de vaporisation ou de condensation de l'eau (J.kg⁻¹)

T_i = température initiale de la matière (K)

T_t = température du traitement (K)

T_e = température de la matière à l'équilibre (K)

2.3. Estimation de la température de transition vitreuse des rhizomes de *Rheum ribes* L.

Dans notre étude il s'agit d'une matrice végétale complexe formée d'un mélange de composant de différentes natures. Par conséquent, une détermination précise de la température de transition vitreuse (T_g) des rhizomes de *R. ribes* L. reste compliquée surtout que jusqu'à présent, les chercheurs ont été plutôt intéressés par l'identification des composants des extraits des rhizomes plus que la détermination de la composition des rhizomes eux-mêmes.

En se basant sur diverses études, on a pu prédire la composition des rhizomes de *R. ribes* L. (Andiç et al., 2009; Erecevit and Kırbağ, 2017; Keser et al., 2019). Les températures de transition vitreuse (T_g) des carbohydrates non structurés constitués d'un seul ou de plusieurs monomères et d'un type de liaison glycosidique (T_g (glucose) = 38.87°C, T_g (maltose) = 97.02°C (Schugmann and Foerst, 2022), T_g (fructose) = 5°C (Roustapour et al., 2006) , T_g (saccharose) = 60°C (Roe and Labuza, 2007), etc...), des carbohydrates structurés (T_g (cellulose) = 210°C (Szcześniak et al., 2008)) et des protéines végétales (T_g (protéine végétales) = 100 °C (Guilbert, 2002) ont été déjà étudiées.

La formule de Gordon-Taylor permet de réaliser une évaluation approximative de la T_g des rhizomes broyés quand ils sont totalement secs ($W= 0$ g H₂O/g MS) **(16)**. Puisqu'il s'agit d'une estimation de la valeur de T_g , seuls les composants principaux des rhizomes, mentionnés dans les études de Andiç et al., (2009) et Jalill et al., (2015), ont été pris en considération. La T_g moyenne des sucres totaux a été calculée en considérant les T_g du maltose, du fructose, du glucose et du saccharose, dont la présence dans les rhizomes de

R. ribes L a été signalée par des études antérieures. De plus, nous supposons que la cellulose représente la catégorie des fibres brutes des rhizomes. Nous avons supposé que le coefficient de courbure « k » est égal à 1.

$$T_g = \frac{\%m(\text{protéines}) * T_g(\text{protéines}) + \%m(\text{sucres}) * T_g(\text{sucres})_m + \%m(\text{fibres}) * T_g(\text{fibres})}{\sum \%m} \quad (16)$$

$$= \frac{1,29 * 100 + 1,98 * 50 + 2,51 * 210}{5,78} = 130,65 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Où %m (protéines) = pourcentage massique des protéines végétales

T_g (protéines) = température de transition vitreuse des protéines végétales

%m (sucres) = pourcentage massique des sucres totaux

T_g (sucres)_m = température de transition vitreuse moyenne des sucres totaux

%m (fibres) = pourcentage massique des fibres brutes

T_g (fibres) = température de transition vitreuse des fibres brutes

Etant donné que la T_g de l'eau est estimée à -139°C (Angell, 2002), cela implique que plus l'humidité du produit est élevée, plus sa T_g diminue.. Ainsi la teneur en eau de la matrice et sa T_g sont inversement proportionnelles. Par exemple, en passant de 0,2 g H₂O/g MS (teneur en eau initiale des rhizomes) à 2,2 g H₂O/g MS, la « T_g » de la matière va diminuer de 85°C à -55°C (**Figure 48**).

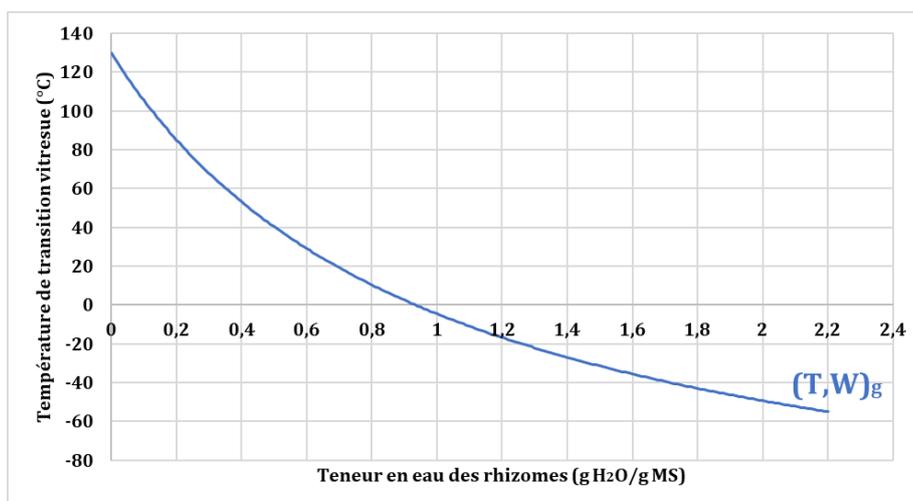


Figure 48- La variation de la température de transitions vitreuse « T_g » des rhizomes en fonction de leur teneur en eau « W »

3. Criblage phytochimique et activité antioxydante

3.1. Teneur phénolique totale

Les résultats de la méthode de Folin Cio-Calteu pour la détermination de la teneur phénolique totale des échantillons du DOE 3 figurent dans le **Tableau 22**. Il est remarquable que le solvant d'extraction des échantillons non-traités présente une influence majeure sur leur teneur phénolique totale. Cette dernière est de 160% plus élevée dans l'extrait alcoolique non-traité (MP alcoolique) que dans l'extrait aqueux non-traité (MP aqueuse).

Ce résultat est similaire à celui d'une étude réalisée par Oktay et al., (2007), dans laquelle l'effet du solvant d'extraction sur la teneur phénolique de plusieurs parties de la plante de *R. ribes* L. a été étudié. L'extrait éthanolique des rhizomes était trois fois plus concentré en molécules phénoliques que l'extrait aqueux. La différence entre les teneurs phénoliques des échantillons éthanoliques et aqueux observée dans l'étude d'Oktay et al., (2007), est supérieure à celle enregistrée dans notre étude et cela peut revenir à plusieurs raisons, comme l'adoption de différentes méthodes de préparation des extraits. Pareillement, un résultat semblable sur une autre espèce de *Rheum*, a été menée par Rajkumar et al., (2011) qui ont montré que la teneur phénolique totale de l'extrait alcoolique de rhizomes de *Rheum emodi* W. est le double de celle de l'extrait aqueux. Diverses autres études menées sur d'autres plantes ont rapporté des valeurs de TPC plus élevées dans les extraits alcooliques que dans les extraits aqueux (Addai et al., 2013; Cho et al., 2020; Krishnaiah et al., 2011).

Un autre but de la préparation de l'extrait MP alcoolique était de comparer sa teneur phénolique avec ceux des autres échantillons traités par DIC. La **Figure 49** montre que la valeur de TPC de l'échantillon alcoolique était significativement plus élevée que celle des échantillons traités, même ceux qui ont enregistré des teneurs plus élevées que celle de MP aqueuse. Ceci signifie que l'effet du solvant d'extraction sur la disponibilité des polyphénols est bien supérieur à l'effet que le traitement par DIC a pu apporter. Plusieurs études ont montré que la polarité des solvants influence l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (Kaczorová et al., 2021). Certaines références ont rapporté que la teneur phénolique totale augmente principalement avec l'augmentation de l'indice de polarité du solvant (polarité (éthanol) > polarité (méthanol) > polarité (acétone)) et

diminue soudainement à de très hautes polarités (Wakeel et al., 2019). En effet, l'eau est considérée le solvant le plus polaire avec un indice de polarité de 10,2 contre 4,3 pour l'éthanol absolu (Ngo et al., 2017). En revanche, d'autres études ont prouvé que le méthanol (Babbar et al., 2014; Mohammed et al., 2022; Savitri et al., 2019) et l'acétone (Sasadara and Wirawan, 2021) soient des meilleurs solvants d'extraction des composés phénoliques que l'éthanol. Or, les résultats des différentes recherches dépendent des matrices végétales étudiées ainsi que de la nature des composés phénoliques qu'elles contiennent. En effet, le méthanol s'est généralement avéré plus efficace dans l'extraction des polyphénols de faibles poids moléculaire et l'acétone dans l'extraction des polyphénols de poids moléculaire élevé (Do et al., 2014).

Toutefois, des études ont rapporté que les solvants organiques absolus sont moins efficaces dans l'extraction des composés phénoliques que les solvants présentant une fraction aqueuse (Sultana et al., 2009). Dans les travaux de Ngo et al., (2017), les teneurs phénoliques totales des extraits hydroalcooliques (50% éthanol) étaient plus élevées que celles des extraits préparés dans de l'éthanol pur. Les mêmes résultats ont été aussi observés dans l'extraction avec l'acétone pure et 50% acétone (Ngo et al., 2017).

Si on compare les teneurs phénoliques des échantillons aqueux traités et non-traités, on remarque que comme pour le cas du DoE 2, les valeurs de TPC des points centraux traités avec les mêmes conditions expérimentales sont répétables (**Figure 49**). A part des points centraux, les points 6, 9, 15 et 20 ont été ceux ayant les teneurs phénoliques les plus élevées et également les seules à avoir des valeurs de TPC respectivement de 8,91%, 3,36%, 3,57% et 8,14% supérieures à celle de la matière aqueuse non traitée. La plus basse valeur de TPC a été enregistrée pour le point 18 ($75,91 \pm 0,30$ mg EAG/g extrait) ayant une teneur en eau égale à 1,8 g H₂O/ g MS et traité avec une pression de vapeur saturée de 300 kPa pour une durée de 26 secondes. Les autres points qui ont été traités avec des hautes pressions (les points 2, 3, 5, 11, 12, 14 et 21 et les points centraux) ont également montré des valeurs de TPC plus basses que celle de MP aqueuse.

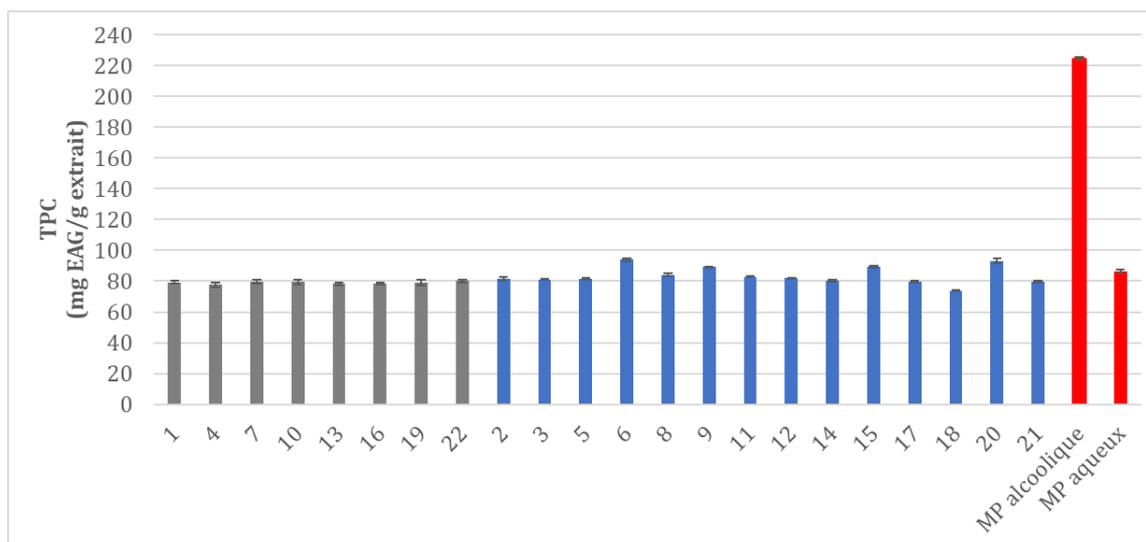


Figure 49- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3)

Le diagramme de Pareto illustre l'effet de la variation des trois paramètres opératoires sur les valeurs de TPC (**Figure 50-A**). La variation de la pression de vapeur saturée et de la teneur en eau des échantillons, présentent des effets significatifs sur les valeurs de TPC. En effet, les tracés des effets principaux (**Figure 50-B**) montrent que des corrélations négatives existent entre la variation de ces deux derniers paramètres et la teneur phénolique des échantillons.

Pour mieux évaluer l'effet de la variation de la teneur en eau des échantillons, prenons les points 8 et 20 qui ont subi le même traitement DIC en termes de pression et de temps de traitement et qui ont des teneurs en eau de 1,8 et 0,6 g H₂O/g MS respectivement. Il est remarquable qu'entre ces deux échantillons la valeur de TPC la plus élevée correspond à l'échantillon 20, celui dont la teneur en eau est la moins élevée. Ce raisonnement s'applique également sur les points 11 et 18. En effet, la **Figure 51** montre les différentes étapes du traitement des échantillons 11 et 18 avec les mêmes conditions opératoires de la DIC. Les polyphénols totaux ont été probablement plus disponibles dans l'échantillon 11 puisqu'en position C le produit se situe au voisinage de la température de transition vitreuse et par la suite il pourra préserver l'expansion créée par le traitement DIC. Par conséquent, l'extraction donnera un meilleur rendement que celui du point 18 qui n'affranchit pas la zone vitreuse en position C. Cependant ce raisonnement ne s'applique pas pour divers autres échantillons, à titre d'exemple les échantillon 9 et 15 d'une part et

12 et 14 d'une autre part. Cela reflète que la variation de la teneur en eau n'a pas énormément d'effet sur les valeurs de TPC même qu'elle soit statistiquement significative.

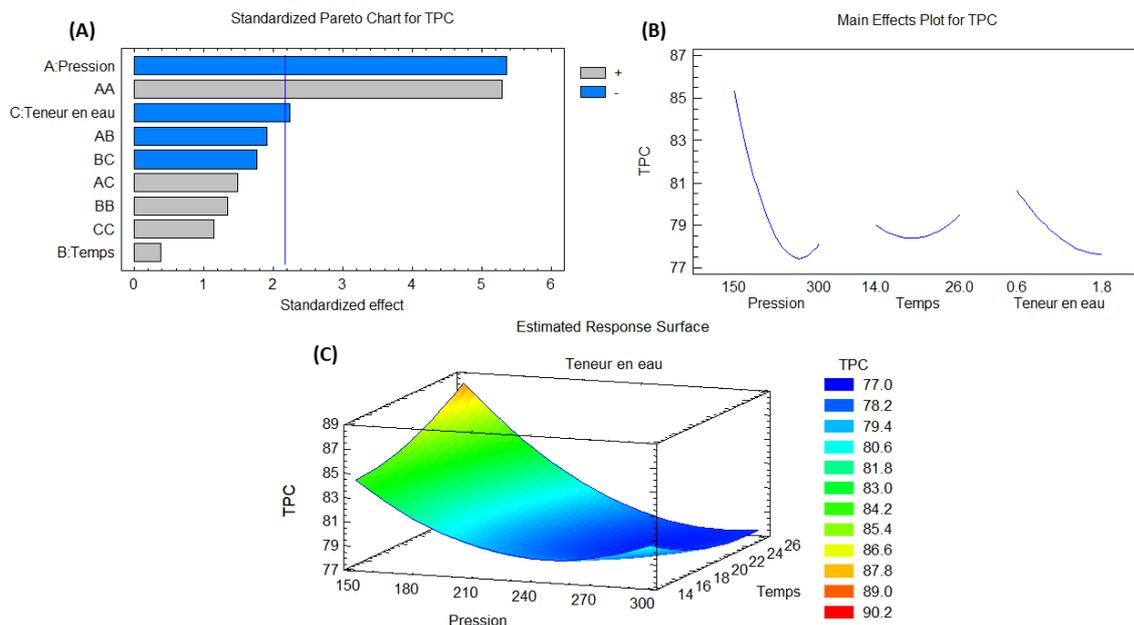


Figure 50- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs phénoliques totales des échantillons du DOE 3

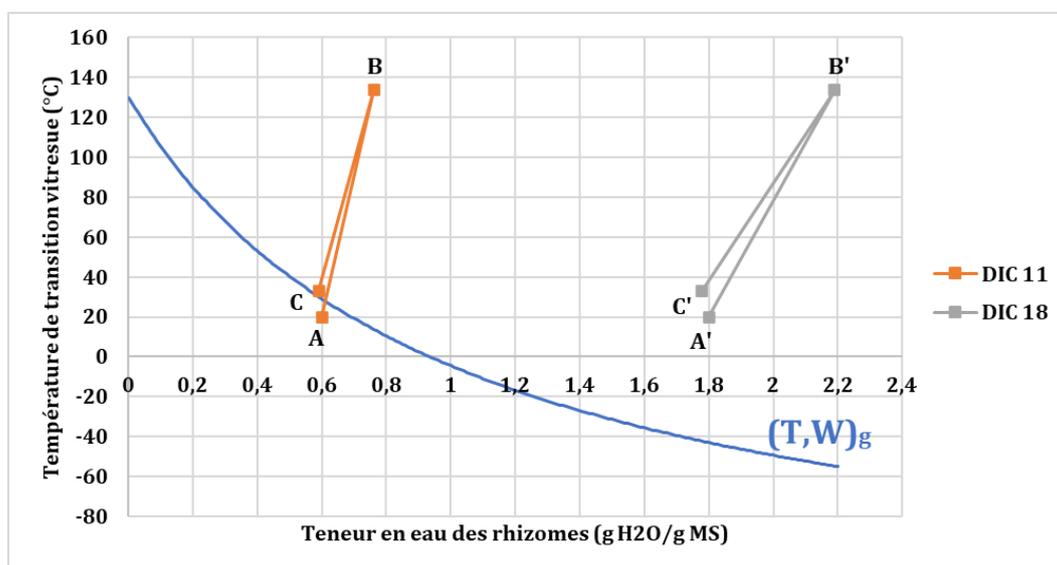


Figure 51- Position des traitements DIC des échantillons 11 et 18 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de *R. ribes L.*

En revanche, l'effet négatif de la pression sur les teneurs phénoliques des échantillons est vrai pour tous les échantillons traités. Prenons par exemple les points 11 et 20, les points

5, 6 et les points centraux, les points 12 et 15 et finalement les points 8 et 18. Cela s'explique dans le diagramme de Pareto qui montre que la variation de la pression présente le niveau de significativité le plus important.

La variation du temps de traitement est non significative, comme dans la plupart des cas où on a traité des rhizomes finement broyés.

L'équation polynomiale (17) estimée à partir de la méthode de surface de réponse de (Figure 50-C) indique avec $R^2= 86\%$ la haute qualité d'ajustement du modèle de TPC.

Les résultats des teneurs phénoliques totales des échantillons du DoE 3 sont cohérents avec les résultats du DoE 2. En effet, les dernières valeurs de TPC ont encore une fois souligné le fait que le traitement DIC des rhizomes de *R. ribes* L., à basse pression de vapeur saturée, permet une augmentation de l'extractibilité du contenu phénolique.

$$\begin{aligned} TPC = 115,253 - 0,28P + 0,456t - 5,477 W + 0,0006P^2 - 0,0037Pt + \\ 0,03 PW + 0,024t^2 - 0,439 tW + 2,07 W^2 \end{aligned} \quad (17)$$

L'équation (17) a également confirmé que les conditions DIC de pression de vapeur saturée de $P = 105$ kPa et de temps de traitement de $t = 30$ s et une teneur en eau initiale des rhizomes de $W = 0,2$ g H₂O/g MS se rapportent à la valeur optimale de TPC de 113 mg EAG/g extrait, qui est environ de 31 % plus élevée que celle de la matière première aqueuse. D'ailleurs, l'amélioration que le DoE 2 a apporté au niveau des teneurs phénoliques des échantillons (100,5 mg EAG/g extrait avec un optimum de pression de $P = 200$ kPa) est inférieure à celle du DoE 3, ceci confirme l'intérêt de traiter les rhizomes avec des faibles pressions de vapeur saturée.

3.2. Teneur totale en flavonoïdes

Le **Tableau 22** résume les résultats de la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium pour le dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits de rhizomes de *R. ribes* L. traités et non traités (MP alcoolique et MP aqueuse) par DIC.

Comme pour le cas des teneurs phénoliques totales des échantillons non traités aqueux et alcoolique, on remarque que la teneur totale en flavonoïdes de ce dernier est de 87% plus importante que celle du point MP aqueux. D'une autre part, on constate que l'échantillon alcoolique est également beaucoup plus riche en flavonoïdes que tous les autres échantillons traités par DIC et même ceux qui présentent des valeurs de TFC

supérieures à celle de l'échantillon MP aqueux. À ce niveau, nous pouvons également conclure que l'effet du solvant d'extraction sur la disponibilité des flavonoïdes dans les extraits dépasse celui du traitement DIC même dans les conditions opératoires optimales. Dans une autre étude, les teneurs totales en flavonoïdes de l'extrait éthanolique (5,38 mg Equivalent Rutine/g) de courge amère étaient également beaucoup plus importantes que celles de l'extrait aqueux (0,66 mg ER/g) (Tan et al., 2014). En effet, dû au manque de solubilité des flavonoïdes dans les solutions aqueuses, leurs utilisations en industrie pharmaceutique ont été fortement limitées (Emeraux, 2019).

Quand nous passons à la comparaison des extraits aqueux traités par DIC, on remarque qu'il existe une bonne répétabilité entre les valeurs de TFC des points centraux (**Figure 52**). En plus, nous constatons que les valeurs de TFC des échantillons 6, 8, 9, 15 et 20 sont les seules à être supérieures à la TFC de l'échantillon MP aqueux.

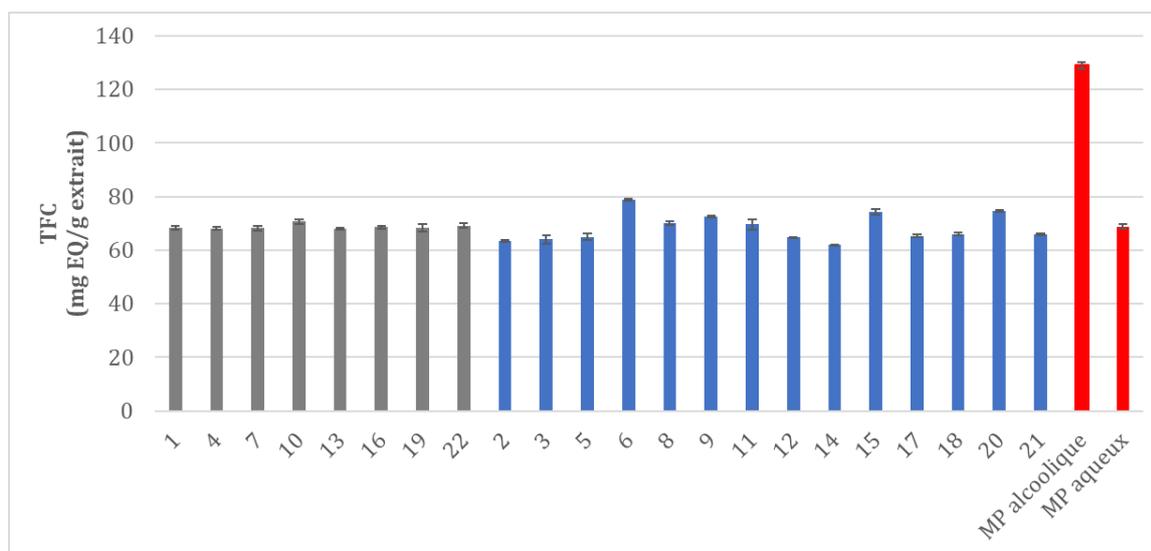


Figure 52- Les teneurs totales en flavonoïdes des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3)

Ces points partagent le fait qu'ils soient traités avec des basses pressions/ basses températures (100 et 150 kPa ce qui vaut respectivement 99,5 et 111 °C). Le reste des points traités avec 225, 300 et 350 kPa (correspondant à 124, 133 et 139 °C respectivement) ont donné des valeurs de TFC inférieures à celle de l'échantillon MP aqueux. En effet, on constate que l'influence de la température en terme de dégradation des flavonoïdes est bien révélée, sachant qu'il s'agit de molécules thermosensibles, susceptibles à la dégradation surtout au-delà de 100°C (Chaaban et al., 2017). Ainsi, et

comme le montre le diagramme de Pareto de *la Figure 53-A*, la variation de la pression de vapeur saturée est le paramètre opératoire qui influence le plus les valeurs de TFC des points traités. Une corrélation négative existe entre les valeurs de TFC et la pression de vapeur saturée (**Figure 53-B**).

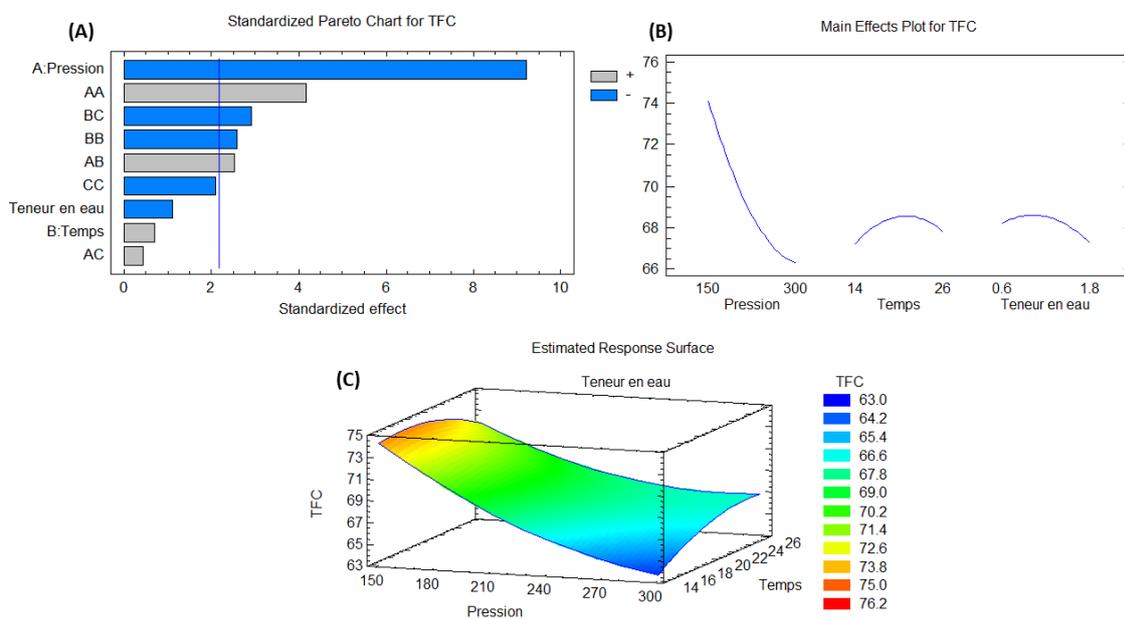


Figure 53- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 3

Pareil aux résultats des teneurs phénoliques totales, l'effet de la variation de la teneur en eau initiale des échantillons (W) n'a pas montré un effet statistiquement significatif sur les valeurs de TFC. Peut-être que l'effet majeur de la pression de vapeur saturée nous a empêchés de bien évaluer l'influence de la variation de la teneur en eau sur les valeurs de TFC. On s'attendait par exemple à de meilleures valeurs de TFC pour les points 14 et 21, puisque leurs teneurs en eau initiale sont faibles et par conséquent, il est fortement probable qu'ils soient, en positions C, respectivement au voisinage et dans la zone vitreuse de la matière ($W \approx W''$) (**Figure 54**). En revanche, la forte pression (350 kPa) appliquée sur les points 14 et 21 a peut-être atténué tout autre effet possible.

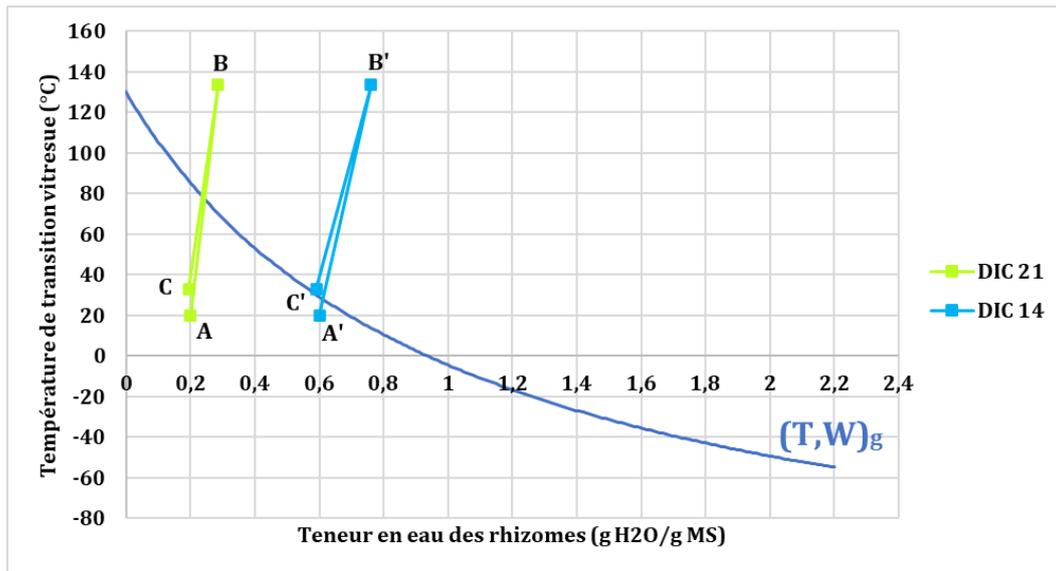


Figure 54- Position des traitements DIC des échantillons 14 et 21 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de *R. ribes L.*

Toutefois, si on compare les teneurs en flavonoïdes des échantillons 8 et 20, ayant $W=1,6$ et $0,8$ g H₂O/g MS respectivement, traités avec une basse pression de vapeur saturée ($P=150$ kPa et $t=26$ s), on remarque que la TFC la plus élevée est celle de l'échantillon 20. Nous croyons dans ce cas-là que la basse pression appliquée n'a pas pu atténuer l'effet de la variation de W . Par conséquent, on suppose que les flavonoïdes étaient plus disponibles dans le cas de l'échantillon 20 puisqu'en position C, ce dernier se situe au voisinage de la zone vitreuse des rhizomes (**Figure 55**).

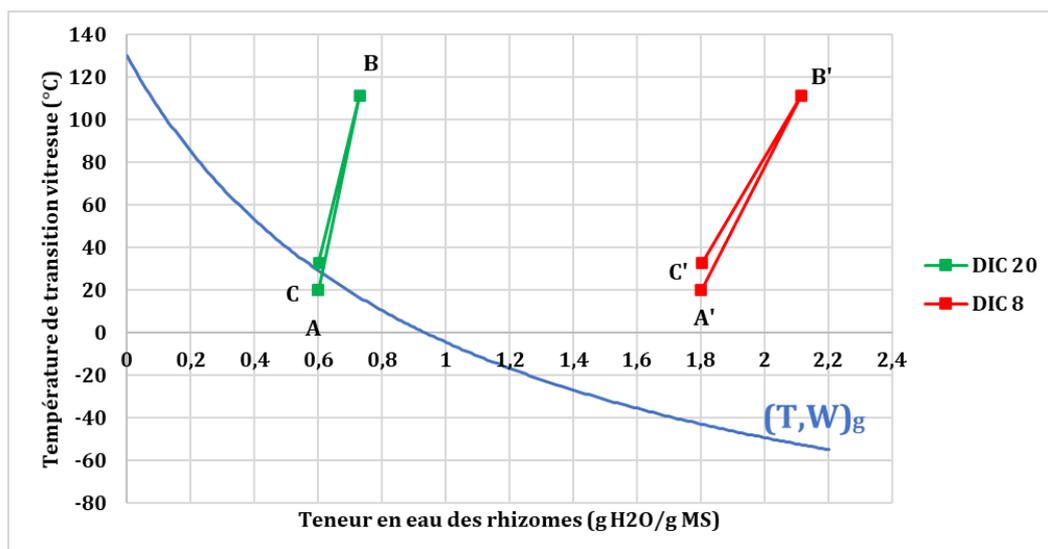


Figure 55- Position des traitements DIC des échantillons 8 et 20 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de *R. ribes L.*

L'équation polynomiale (18) estimée à partir de la méthode de surface de réponse de (Figure 53-C) indique avec $R^2= 91,61\%$ la haute qualité d'ajustement du modèle de TFC.

Les résultats des teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DoE 3 sont cohérents avec les résultats du DoE 2 qui ont également montré que plus la pression de vapeur saturée est élevée, moins les flavonoïdes sont disponibles.

$$TFC = 84,985 - 0,254P + 1,049t + 12,67 W + 0,00029P^2 - 0,0030Pt + \quad (18) \\ 0,0055 PW - 0,028t^2 - 0,453 tW - 2,07 W^2$$

L'équation (18) nous informe sur les conditions optimales de la DIC se rapportent à une valeur optimale de TCF de 81,21 mg EQ/g extrait, qui est environ de 18 % plus élevée que celle de la matière première.

3.3. Activité antioxydante

Les pouvoirs de piégeage des radicaux libres de DPPH de chacun des extraits traités, non traités (MP alcoolique et MP aqueuse) et du contrôle positif (l'acide ascorbique) sont exprimés par leur IC50 (Tableau 22)

L'activité antioxydante de l'échantillon éthanolique est trois fois plus élevée que celle de l'échantillon aqueux (Figure 56). En effet, l'activité antioxydante des extraits de plantes dépend de leur concentration en agents antioxydants, particulièrement en métabolites secondaires. En se basant sur nos résultats précédents, et après avoir comparé les teneurs phénoliques totales des extraits MP alcoolique et aqueux, on trouve que c'est logique que l'extrait éthanolique soit plus performant que l'extrait aqueux en termes de piégeage des radicaux libres. Un résultat similaire a été rapporté par Oktay et al., (2007).

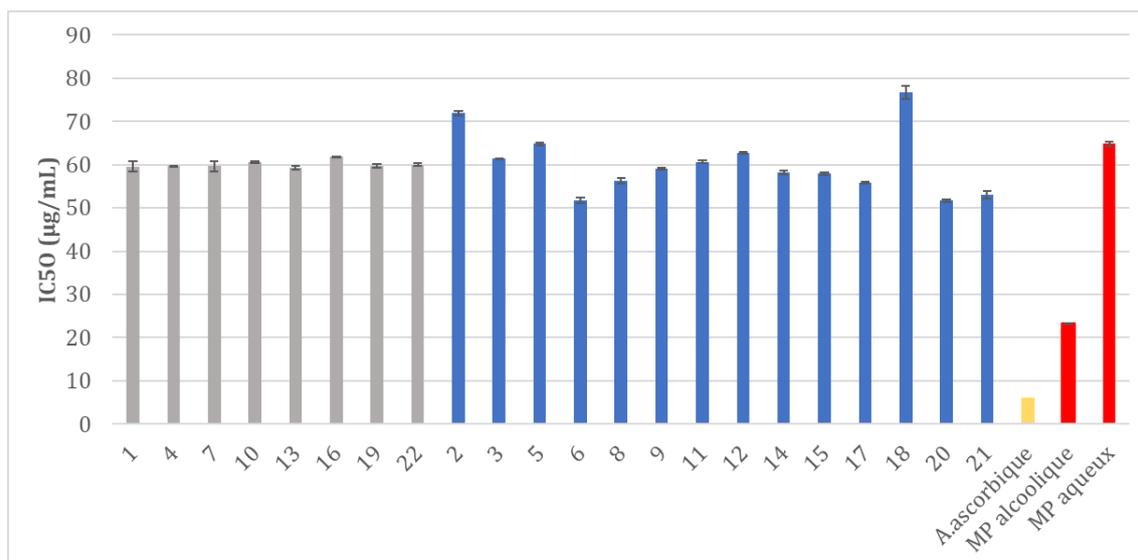


Figure 56- Les valeurs de IC50 des différents échantillons traités et non traités (MP) par DIC (DOE 3)

L'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif a enregistré une activité antioxydante supérieure à celles de tous les échantillons traités par DIC (**Figure 56**). La IC50 de l'acide ascorbique est de 88,4 % moins inférieure que celle de l'échantillon 6. De même, l'activité antioxydante du contrôle positif est supérieure à celle de MP alcoolique. Il est remarquable que le décalage observé entre ces deux valeurs soit moins important que celui enregistré entre le contrôle positif et MP aqueuse. Ainsi, l'activité antioxydante de l'acide ascorbique est de 4 fois supérieure à celle de MP alcoolique et jusqu'à 10 fois plus importante que celle de MP aqueuse. D'autres types d'extraits de rhizomes de *R. ribes* L. (méthanolique et chloroformique) n'ont également pas réussi à dépasser le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique (Öztürk et al., 2007).

Les points traités par DIC ont également tous montré un pouvoir antioxydant plus faible que l'extrait MP alcoolique ce qui confirme que l'effet du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante a été plus important que celui du traitement par DIC.

Il est remarquable que les valeurs de IC50 soient répétables entre les points centraux traités avec les mêmes conditions opératoires (**Figure 56**). Hormis les points centraux, les valeurs de IC50 des points 2 ($71,93 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$), 5 ($64,83 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$) et 18 ($76,77 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$) ont été les seules supérieures à celle de MP aqueuse. Ces trois échantillons ont été traités avec des hautes pressions de vapeur saturée (225, 350 et 300 kPa respectivement) et par la suite la dégradation des molécules thermosensibles à pouvoir antioxydant aurait

pu être causée par les hautes températures. En revanche, il est remarquable que les activités antioxydantes des points 11, 12, 14 et 21 ont été meilleurs que les points précédents, même qu'ils soient traités avec des hautes pressions de vapeur saturée (300 et 225 kPa). Or, les composés phénoliques ne sont pas les seuls contributeurs au pouvoir antioxydant des extraits (Terpinc et al., 2012) et cela peut être confirmé par le manque de corrélation ($R = -0,52$) qui existe entre les valeurs de TPC et IC50 (**Figure 57**), qui a été également observé dans les travaux de Terpinc et al., (2012).

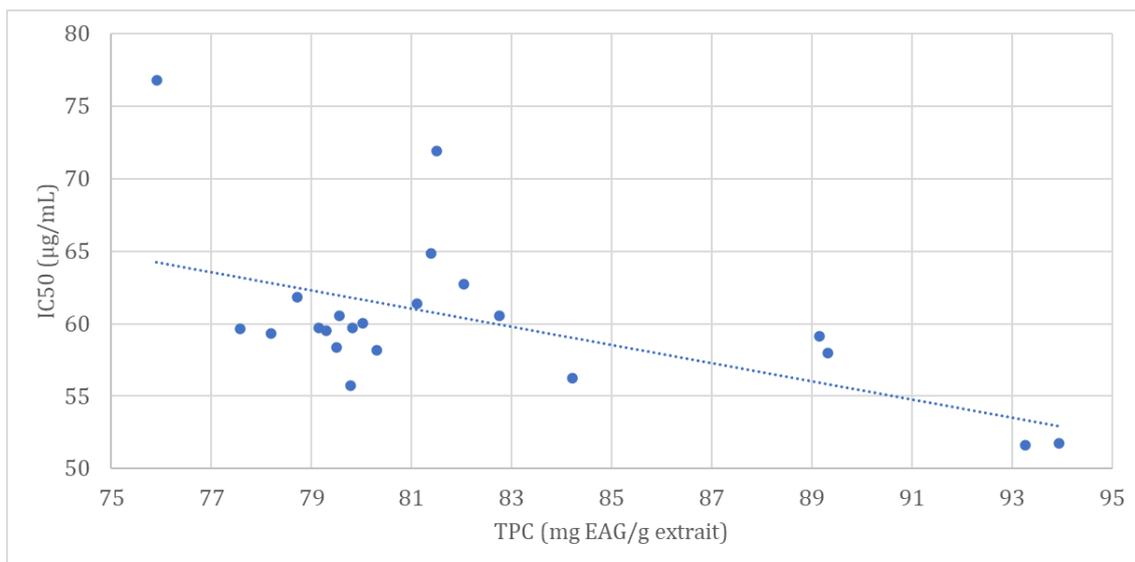


Figure 57- Régression simple entre les valeurs de TPC et IC50 des échantillons traités par DIC

Pour concrétiser ce raisonnement, il suffit de prendre l'exemple du point 14 qui a donné de très basses valeurs de TPC et TFC mais une activité antioxydante élevée. Ceci dit que les hautes pressions ont augmenté la disponibilité d'agents antioxydants n'appartenant pas à la famille des polyphénols. Une autre théorie peut être à l'origine de l'augmentation de l'activité antioxydante des échantillons traités avec une pression de vapeur saturée élevée est que les produits de dégradation des polyphénols se sont révélés être des agents antioxydants plus puissants que les molécules d'origine elles-mêmes (Hanuka Katz et al., 2020). En revanche, cette idée ne s'applique que sur les échantillons peu humides traités avec des pressions élevées ce qui rend le premier raisonnement plus logique.

En plus, nous avons remarqué que les activités antioxydantes sont faibles quand un traitement combine à la fois des hautes pressions de vapeur saturée et des teneurs en eau élevées (comme pour le cas des échantillons 2, 5 et 18). Cela peut être expliqué par le diagramme de Pareto qui montre l'effet négatif de l'augmentation de W sur l'activité

antioxydante des échantillons (**Figure 58-A**) et le tracé des effets principaux qui révèle également la corrélation positive entre W et IC_{50} (**Figure 58-B**). En effet, on suppose qu'après le traitement par DIC des échantillons 2, 5 et 18, ces derniers étaient, en position C, dans la zone caoutchouteuse de la matière ce qui ne les a pas permis de conserver leur nouvelle structure. Par conséquent les molécules à pouvoir antioxydant, hormis les polyphénols, n'ont pas été mieux extraites comme dans le cas des points 11, 14 et 21.

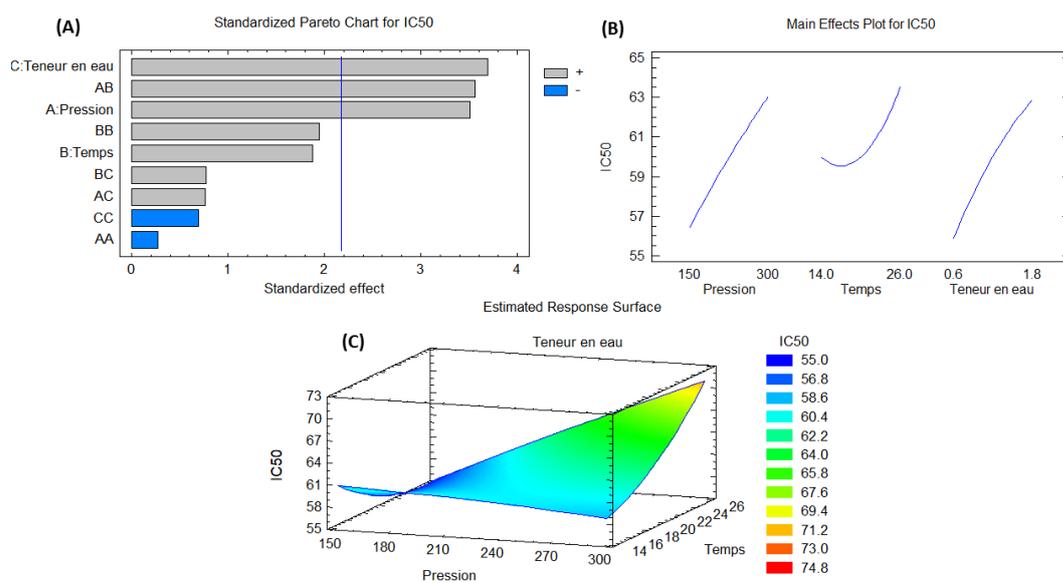


Figure 58- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et la méthode de surface de réponse (C) pour les teneurs totales en flavonoïdes des échantillons du DOE 3

Les échantillons traités avec des basses pressions de vapeur saturée (points 8, 9, 15 et 20) ont tous enregistré des activités antioxydantes supérieures à celle de MP aqueuse. En effet, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été attribués aux mêmes échantillons montrant des activités antioxydantes importantes. Le diagramme de Pareto (**Figure 58-A**) montre que la variation de pression de vapeur saturée a un effet significatif sur les valeurs de IC_{50} . De plus, le graphique des effets principaux (**Figure 58-B**) révèle que l' IC_{50} des rhizomes traités est corrélée positivement avec la pression de vapeur saturée. L'équation polynomiale estimée à partir du RSM est présentée en (19) avec $R^2 = 80\%$ ce qui indique que le modèle ajusté explique bien la variabilité des IC_{50} .

$$\begin{aligned}
 IC_{50} = & 108,46 - 0,15P - 4,20t - 0,18W - 0,000045P^2 + 0,0098 Pt \\
 & + 0,021 PW + 0,0487t^2 + 0,27 tW - 1,77 W^2
 \end{aligned}
 \tag{19}$$

Les résultats de la méthodologie de surface de réponse (**Figure 58-C**) ont confirmé que les conditions optimales du traitement DIC tel que $P = 100$ kPa et $t = 30$ s avec une teneur en eau initiale des rhizomes de $W = 0,2$ g H₂O/g MS se rapportent à une valeur optimale de IC₅₀ de 41,5 µg/mL, ce qui est d'environ 36 % inférieur à l'IC₅₀ de la matière première.

Tableau 22- Conditions expérimentales des différents essais du DoE 3 avec le contenu phénolique total (TPC), le contenu total en flavonoïdes (TFC) et la IC50 des extraits traités et non traités (MP alcoolique et MP aqueuse) par DIC

	Essai n°	Pression (kPa)	Temps (s)	W (g H ₂ O/g MS)	TPC (mg EAG/g extrait)	TFC (mg EQ/g extrait)	IC50 (µg/mL)
Points centraux	1				79,29±0,96	68,21±0,74	59,54±1,20
	4				77,57±1,51	68,10±0,50	59,64±0,17
	7				79,81±1,20	68,15±0,83	59,69±1,20
	10	225	20	1,2	79,54±1,44	70,63±0,81	60,55±0,22
	13				78,18±1,15	67,89±0,40	59,34±0,48
	16				78,70±0,55	68,54±0,51	61,82±0,07
	19				79,14±1,05	68,25±1,40	59,72±0,50
	22				80,01±1,07	69,10±0,94	60,02±0,25
	2	225	30	1,2	81,49±1,10	63,48±0,36	71,93±0,56
	3	225	20	2,2	81,11±0,23	64,04±1,53	61,36±0,09
	5	350	20	1,2	81,39±0,63	64,92±1,32	64,83±0,31
	6	100	20	1,2	93,93±0,66	78,93±0,36	51,73±0,63
	8	150	26	1,8	84,20±0,71	70,15±0,64	56,24±0,61
	9	150	14	0,6	89,14±0,24	72,51±0,19	59,13±0,23
	11	300	26	0,6	82,76±0,30	69,61±1,82	60,66±0,25
	12	300	14	1,8	82,05±0,28	64,72±0,27	62,72±0,25
	14	300	14	0,6	80,31±0,84	61,86±0,23	58,19±0,40
	15	150	14	1,8	89,32±0,40	74,36±1,11	57,99±0,32
	17	225	10	1,2	79,78±0,64	65,28±0,53	55,76±0,22
	18	300	26	1,8	73,91±0,30	66,00±0,42	76,77±1,45
	20	150	26	0,6	93,26±1,31	74,69±0,41	51,65±0,37
	21	225	26	0,2	79,50±0,57	65,87±0,39	53,06±0,89
	MP alcoolique	-	-	0,2	224,51±0,82	129,01±1,18	23,28±0,13
	MP aqueuse	-	-	0,2	86,24±1,11	68,83±0,77	64,81±0,53

4. Activité antimicrobienne des extraits de rhizomes de *R. ribes* L.

Suite aux résultats du criblage phytochimique et de l'activité antioxydante des échantillons du DoE 3, nous avons choisi d'évaluer l'activité antibactérienne des six échantillons suivants : trois échantillons présentant des valeurs élevées de TPC, TFC et d'activités antioxydantes (les points 6, 15 et 20), un échantillon central (le point 22) et les deux échantillons MP aqueux et alcoolique.

Afin de tester la sensibilité des souches pures de *S. aureus* et *E. coli* contre les différents extraits, deux méthodes ont été adoptées. Le but de ces dernières était de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la croissance bactérienne et les concentrations minimales bactéricides (CMB). Par définition la CMI est la plus faible concentration inhibant $\geq 80\%$ la croissance bactérienne par rapport au contrôle négatif (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Par contre, la CMB est définie comme la plus faible concentration de l'extrait capable de tuer complètement les cellules bactériennes testées (Sykes and Rankin, 2014).

4.1. Macro-dilution en bouillon

4.1.1. Macro-dilution en bouillon des extraits aqueux

4.1.1.1 Effet des extraits aqueux sur *S. aureus*

La **Figure 59** représente le taux d'inhibition de la croissance de *S. aureus* que chacun des extraits aqueux a exercé.

L'inhibition de la croissance bactérienne au niveau de tous les extraits s'avère d'une manière dose dépendante. Toutefois, aucun des échantillons aqueux, même à la concentration la plus élevée (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'a réussi à inhiber plus que 40% de la croissance bactérienne, et par conséquent la CMI d'aucun des extraits n'a pu être identifiée aux concentrations testées. Dans une étude de Önem *et al.*, (2020), la CMI de la croissance d'une même souche de *S. aureus* (ATCC 25923) d'un échantillon aqueux de rhizome de *R. ribes* L. était de 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ce résultat contredit ceux présentés dans la **Figure 59**. Cela peut être dû à plusieurs facteurs : en effet, le protocole d'extraction des rhizomes peut affecter considérablement le pouvoir antibactérien des extraits.

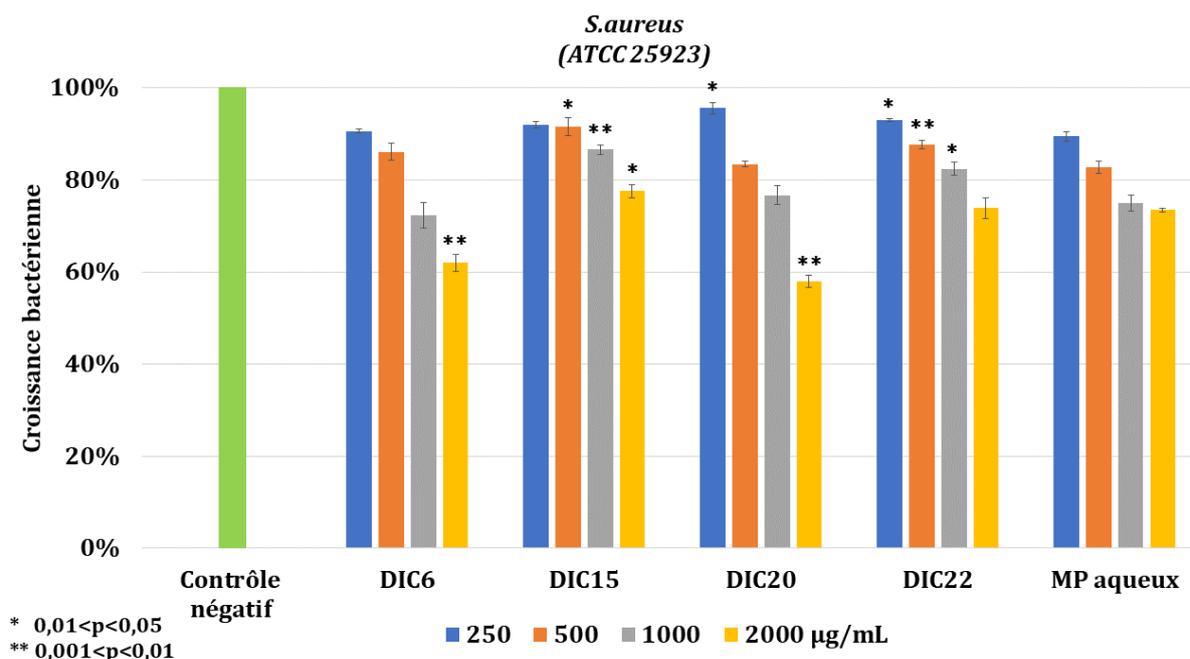


Figure 59- Effet des extraits aqueux de rhizomes de *R. ribes L.* traités et non traités (MP aqueuse) par DIC sur la croissance de *S. aureus*.

Les bactéries *S. aureus* ont été inoculées dans le bouillon Mueller Hinton avec les concentrations indiquées d'extraits ($\mu\text{g/mL}$) avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h. Des bactéries inoculées dans le bouillon Mueller Hinton ont servi de contrôle négatif. Les histogrammes représentent les moyennes de trois répétitions (\pm écart type). Les différences statistiquement significatives entre les mêmes concentrations des points traités par DIC et MP aqueuse sont représentées par :
* si $0,01 < p < 0,05$ et ** si $0,001 < p < 0,01$

Dans l'étude de Önem et al., (2020), les rhizomes ont été extraits dans un bain ultrasonique, contrairement à nos travaux, où les extraits ont été issus d'une simple macération à température ambiante. Noori et al., (2022) ont montré que l'extraction ultrasonique produit des extraits de rhizomes de *R. ribes L.* plus riches en composés phénoliques et, par conséquent, exerçant des activités antioxydantes plus importante que celles des extraits issus d'une simple macération. Cela explique la contradiction observée au niveau de nos travaux et ceux de Önem et al., (2020), sachant que les polyphénols sont des contributeurs principaux aux activités antibactériennes des extraits de plantes (Abdulla et al., 2014; Xie et al., 2017). La différence entre les régions de collecte des rhizomes peut également être liée au manque de similarité entre les résultats, s'avérant que le contenu phénolique d'une même espèce de *R. ribes L.* est susceptible d'être variable entre les pays, en réponse aux différents niveaux de stress hydrique et thermique (Oloumi, 2011) (**Tableau 5**).

Si on compare l'activité antibactérienne des différents extraits à la concentration la plus élevée on remarque que seuls les extraits DIC6 et DIC20 ont significativement dépassé le pouvoir d'inhibition de la croissance de *S. aureus* de la matière première non traitée. Ces deux points ont été traités respectivement à 100 et à 150 kPa, c'est-à-dire à des pressions de vapeur saturée très basses et cela correspond bien aux résultats précédents où ces deux échantillons ont enregistré les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes les plus élevées et les activités antioxydantes les plus importantes.

En revanche, l'échantillon DIC22 (représentant les points centraux) a montré un pouvoir d'inhibition légèrement inférieur à celui de MP aqueuse à une concentration de 2000 µg/mL. Eventuellement, la valeur de TPC de l'échantillon 22 est bien inférieure à celle du point MP aqueux, ainsi que sa teneur totale en flavonoïdes, qui est légèrement supérieure à celle du point aqueux non-traité par DIC. Par contre, on ne s'attendait pas que l'activité antibactérienne de l'échantillon 15 soit inférieure à celle du point MP aqueux (différence statistiquement significative aux niveaux des concentrations 500, 1000 et 2000 µg/mL), surtout que le point 15 est plus riche en polyphénols, plus particulièrement en flavonoïdes, que l'échantillon aqueux non-traité. Toutefois, nous supposons que cela est le résultat des conditions de traitement du point 15 qui ont peut-être diminué l'extraction des phyto-constituants antibactériens agissant sur *S. aureus*.

4.1.1.2 Effet des extraits aqueux sur *E. coli*

La **Figure 60** représente le taux d'inhibition de la croissance de *E. coli* effectué par chacun des extraits aqueux.

Comme dans le cas de *S. aureus*, la CMI d'aucun des extraits aqueux n'a pu être atteinte aux concentrations testées. Ce qui est très remarquable est que le pourcentage d'inhibition de *E. coli* est relativement inférieur à celui de *S. aureus*. À titre d'exemple, l'extrait DIC20 à une concentration de 2000 µg/mL a pu inhiber 40% de la croissance bactérienne de *S. aureus* alors que dans le cas de *E. coli* le pouvoir d'inhibition du même extrait à la même concentration est inférieur à 8%. Cela suggère la possibilité que les extraits aqueux de rhizomes de *R. ribes* L. soient plus efficaces dans l'inhibition de la croissance des bactéries gram positif que les bactéries gram négatif. Ce constat est en fait cohérent avec celui d'autres études (Abdulla *et al.*, 2014; Alaadin *et al.*, 2007; Azadpour *et al.*, 2020; Önem *et al.*, 2020; Sayyahi *et al.*, 2019).

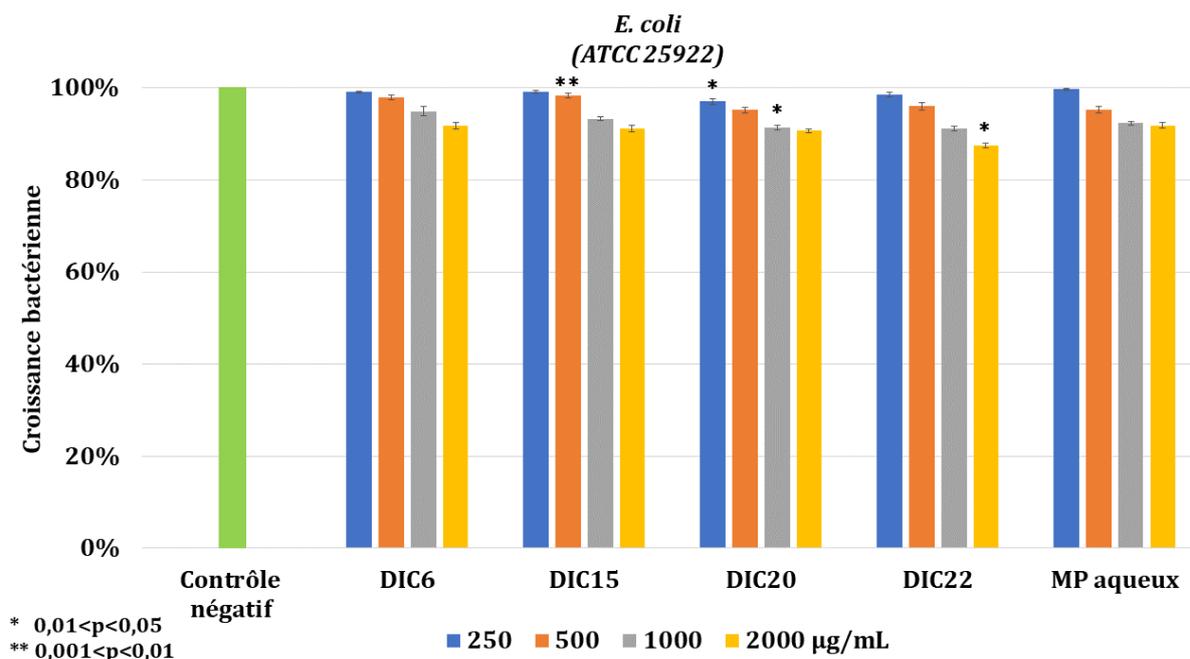


Figure 60- Effet des extraits aqueux de rhizomes de *R. ribes* L. traités et non traités (MP aqueuse) par DIC sur la croissance de *E. coli*.

Les bactéries *E. coli* ont été inoculées dans le bouillon Mueller Hinton avec les concentrations indiquées d'extraits (µg/mL) avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h. Des bactéries inoculées dans le bouillon Mueller Hinton ont servi de contrôle négatif. Les histogrammes représentent les moyennes de trois répétitions (± écart type). Les différences statistiquement significatives entre les mêmes concentrations des points traités par DIC et MP aqueuse sont représentées par * si 0,01 < p < 0,05 et ** si 0,001 < p < 0,01

Si on compare l'activité antibactérienne des différents extraits à la concentration la plus élevée (**Figure 60**), on remarque que tous les extraits ont dépassé le pouvoir d'inhibition du point MP aqueux à la même concentration. En revanche, seul l'extrait DIC22 (un point central) a significativement dépassé le pouvoir d'inhibition de la matière première aqueuse non traitée ($p < 0,05$). La valeur de TPC du point 22 est inférieure à celle de MP aqueuse, toutefois son pouvoir antioxydant est plus important que celui du point aqueux non traité. Nous supposons ainsi que, soit la croissance de *E. coli* a été inhibée par des agents antioxydants hormis les polyphénols, ou bien que les molécules produites par la dégradation thermique ($P=225$ kPa) affecte bien la croissance de cette souche bactérienne. C'est vrai que les autres extraits aqueux (DIC6, DIC15 et DIC20) présentent des pouvoirs antioxydants supérieurs à celui de DIC22, mais cela est peut-être le résultat de leur teneur phénolique élevée.

4.1.2. Macro-dilution en bouillon de l'extrait alcoolique

4.1.2.1 Effet sur *S. aureus* de l'extrait alcoolique

Les activités antibactériennes de l'échantillon alcoolique non-traité par DIC (MP alcoolique) et du contrôle négatif sont présentées dans la **Figure 61**

Contrairement aux extraits aqueux, l'extrait alcoolique a prouvé son efficacité dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus*. Il est remarquable que la capacité d'inhibition de l'échantillon MP alcoolique à la concentration la moins élevée (250 µg/mL) vaut à peu près celle de l'échantillon 20 à la concentration la plus élevée (2000 µg/mL). En effet, une capacité d'inhibition supérieure à 80% a été observée à partir de 1000 µg/mL, d'ailleurs la CMI est de 1000 µg/mL. L'extrait alcoolique a donc prouvé être un antibactérien plus puissant que les extraits aqueux ce qui a également été démontré par le travail d'autres chercheurs (Abdulla *et al.*, 2014; Engin *et al.*, 2018; Keser *et al.*, 2019). D'ailleurs, la haute teneur phénolique totale, plus particulièrement la teneur en flavonoïdes et le puissant pouvoir antioxydant de l'extrait MP alcoolique, justifie totalement son importante activité antibactérienne par rapport aux autres extraits aqueux (**Figure 61**).

Pour s'assurer que l'effet antibactérien observé ne résulte de la présence de l'éthanol pur (initialement utilisé dans la préparation de la solution mère), nous avons appliqué le même protocole expérimental à une série de dilutions n'incluant pas l'extrait alcoolique. Les résultats ont montré que l'éthanol lui-même a faiblement inhibé la croissance de *S. aureus*, même à la concentration la plus élevée.

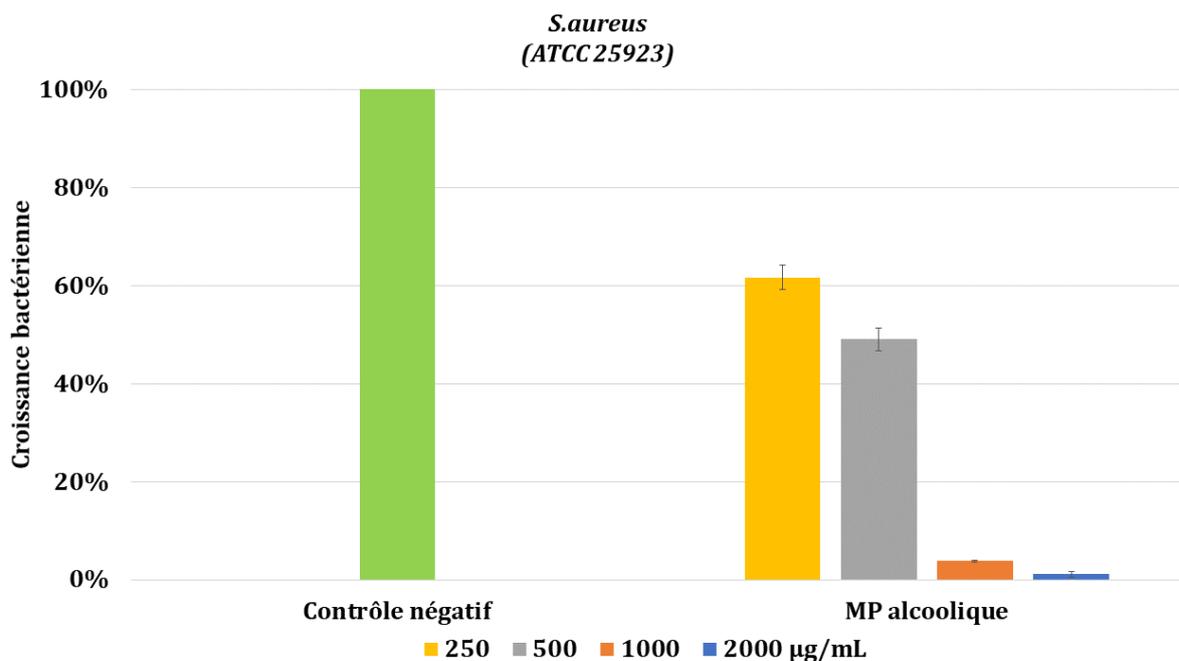


Figure 61- Effet de l'extrait alcoolique de rhizomes de *R. ribes* L. non traités par DIC sur la croissance des *S. aureus*.

Les bactéries *S. aureus* ont été inoculées dans le bouillon Mueller Hinton avec les concentrations indiquées d'extraits (µg/ml) avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h. Des bactéries inoculées dans le bouillon Mueller Hinton et l'éthanol aux concentrations correspondant à celles de l'extrait alcoolique ont servi de contrôle négatif. Les histogrammes représentent les moyennes de trois répétitions (\pm écart type).

Pour déterminer la CMB de l'extrait, 10 µL provenant des trois tubes les plus concentrés en extrait alcoolique d'une part et en éthanol d'autre part ont été striés sur des plaques de gélose Muller Hinton (MHA). Les plaques ont été ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C. Comme le montre la **Figure 62**, l'éthanol n'a pas inhibé la prolifération bactérienne de *S. aureus* même à la concentration la plus élevée. En revanche, aucune prolifération bactérienne n'a été observée dans les plaques contenant 2000 µg/mL de MP alcoolique. Ceci dit que la CMB de l'extrait MP alcoolique est de 2000 µg/mL. Par ailleurs, dans une étude de Tartik et al., (2015), il fallait une dose dix fois plus élevée de l'extrait alcoolique de rhizomes de *R. ribes* L. (20 000 µg/mL) que celle enregistrée dans notre étude pour diminuer le taux de croissance de *S. aureus*. Ceci signifie que notre extrait alcoolique de rhizomes est un inhibiteur de croissance des bactéries de *S. aureus* plus puissant que celui étudié par Tartik et al., (2015).

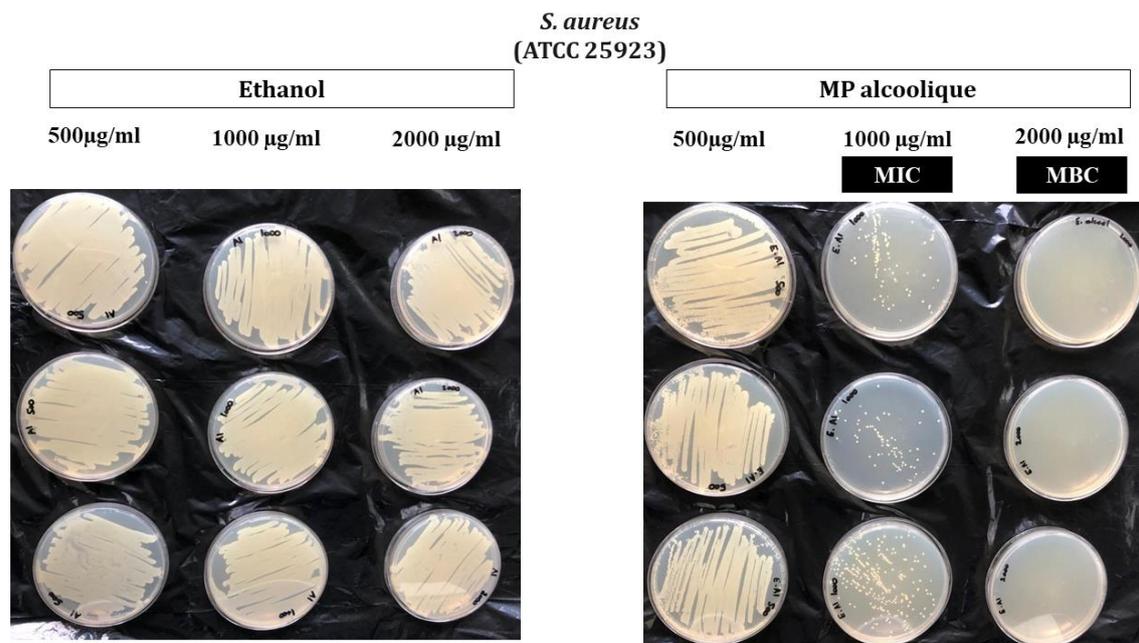


Figure 62- Culture des solutions d'éthanol pur (à gauche) et de l'extrait alcoolique (à droite) de différentes concentrations sur des géloses Mueller-Hinton

4.1.2.2 Effet sur *E. coli* de l'extrait alcoolique

La **Figure 63** illustre les effets antibactériens de l'extrait MP alcoolique d'une part, et du contrôle négatif d'autre part, sur la croissance de *E. coli*.

Dans cette partie également, il est remarquable que l'alcool utilisé comme solvant n'ait pas un effet inhibiteur significatif sur la croissance bactérienne. En plus, l'extrait alcoolique a prouvé ne pas être assez efficace dans l'inhibition de la croissance de *E. coli* : même à la concentration la plus élevée, juste 50% de la croissance bactérienne a été inhibée. Par la suite, la CMI de l'extrait alcoolique contre *E. coli* ne peut pas être identifiée dans notre intervalle de concentrations.

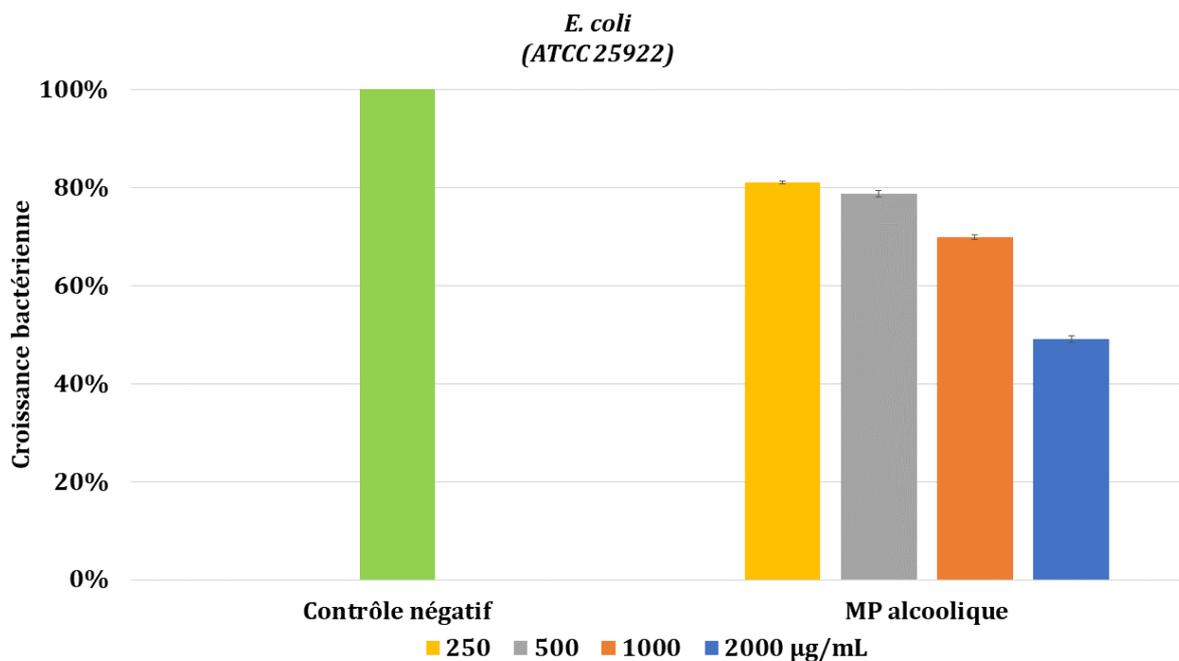


Figure 63- Effet de l'extrait alcoolique de rhizomes de *R. ribes* L. non traités par DIC sur la croissance de *E. coli*.

Les bactéries *E. coli* ont été inoculées dans le bouillon Mueller Hinton avec les concentrations indiquées d'extraits (µg/mL) avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h. Des bactéries inoculées dans le bouillon Mueller-Hinton et l'éthanol aux concentrations correspondant à celles de l'extrait alcoolique ont servi de contrôle négatif. Les histogrammes représentent les moyennes de trois répétitions (\pm écart type).

Ce résultat est différent de celui d'une étude faite par Tartik et al., (2015), où une concentration de 600 µg/mL était suffisante pour inhiber fortement la croissance de *E. coli*. Comme pour les extraits aqueux, le pourcentage d'inhibition des extraits alcooliques dans le cas de *E. coli* est relativement inférieur par rapport à celui de *S. aureus*, ce qui montre de nouveau la possibilité que les extraits de rhizomes de *R. ribes* L. soient plus efficaces dans l'inhibition de la croissance des bactéries gram positif que les bactéries gram négatif.

En comparant les extraits aqueux et l'extrait alcoolique, on constate que ce dernier, même qu'il ne soit pas assez efficace dans l'inhibition de *E. coli*, mais il représente quand même un pouvoir antibactérien beaucoup plus important que tous les autres extraits aqueux.

4.2. Dilution en milieu gélosé

4.2.1. Résultats de la dilution en milieu gélosé des extraits aqueux

4.2.1.1 Effet sur *S. aureus* et *E. coli*

La méthode de dilution de l'extrait dans un milieu gélosé est une méthode semi-quantitative contrairement à la macro-dilution dans le bouillon qui est une méthode quantitative. Les résultats de la dilution en milieu gélosé ont été alors analysés par une simple observation des plaques inoculées.

La **Figure 64** montre différentes plaques contenant les extraits aqueux traités et non traités (MP aqueuse) à la plus haute concentration adoptée (16 mg/mL). Comme le montre la **Figure 64** ci-dessous, tous les extraits aqueux n'ont pas réussi à inhiber la croissance

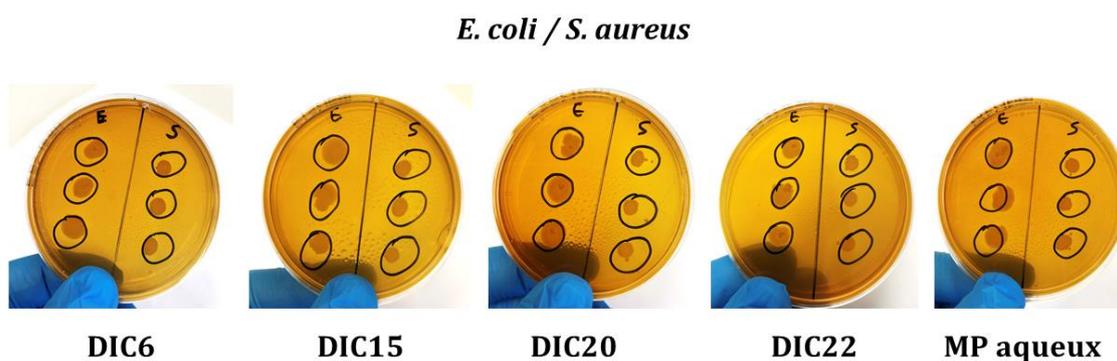


Figure 64- Résultats de la dilution en milieu gélosé des extraits aqueux à une concentration de 16 mg/mL

4.2.2. Résultats de la dilution en milieu gélosé des extraits alcooliques

4.2.2.1 Effet sur *S. aureus* et *E. coli*

La **Figure 65** montre la série de dilution de l'extrait MP alcoolique (série supérieure) et les contrôles négatifs (série inférieure) qui ont été faits pour pouvoir mieux évaluer l'effet de l'extrait alcoolique sur la croissance bactérienne de *S. aureus* (compartiment gauche de la boîte de pétri) et *E. coli* (compartiment droit de la boîte de pétri). Il est remarquable qu'à partir de 8000 µg/mL la croissance de *S. aureus* a été totalement inhibée. En revanche, la même concentration n'a pas réussi à arrêter la croissance de *E. coli*. Cependant, il est clair que les colonies de *E. coli* sont moins denses dans la plaque

contenant 16 000 µg/mL de l'extrait alcoolique. Cela suggère qu'une concentration un peu plus élevée serait nécessaire pour l'inhibition de la croissance de *E. coli*.

Les méthodes de la macro-dilution et de la dilution en milieu gélosé de l'extrait alcoolique ont donné les mêmes résultats au niveau de la croissance de *S. aureus* même si la CIM dans la première méthode était de 1000 µg/mL et de 8000 µg/mL dans la deuxième. Cela revient à la différence entre les densités de la suspension bactérienne : selon les protocoles expérimentaux, dans la macro-dilution la suspension ajustée à 0,5 McFarland doit être diluée d'un facteur de 1 : 100 alors que dans la dilution dans le milieu gélosé la même solution ajustée doit être diluée d'un facteur de 1 : 10.

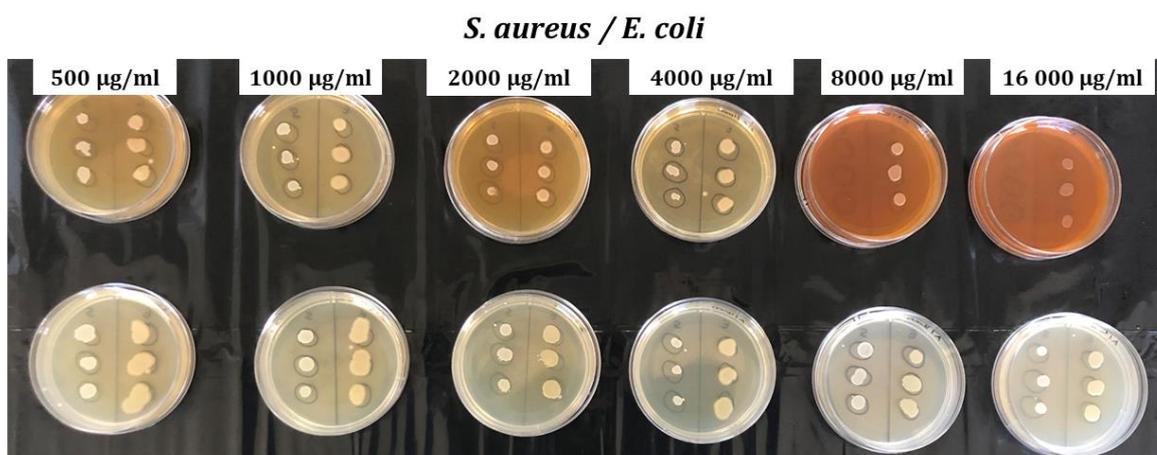


Figure 65- Résultats de la dilution en milieu gélosé de l'extrait MP alcoolique (série supérieure) et de l'éthanol (série inférieure)

5. Activité antiproliférative des extraits de *R. ribes* L.

L'histogramme de la **Figure 66** présente les résultats du test MTT de viabilité des cellules cancéreuses de mélanome humain A2058.

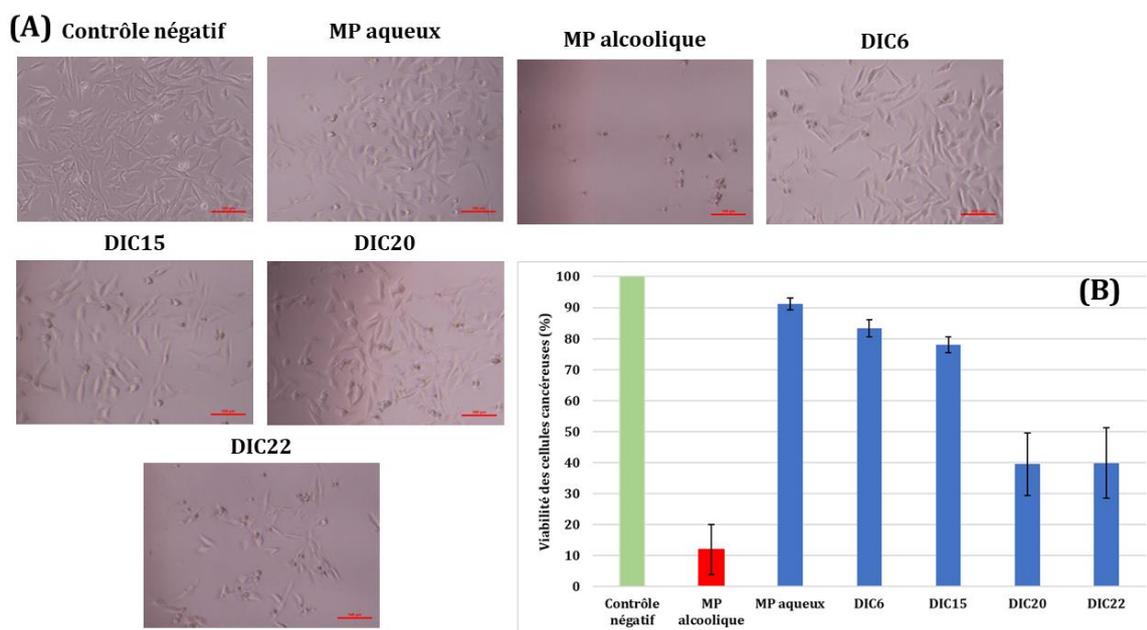


Figure 66- (A) Photos microscopiques (x400) représentatives des cellules de mélanome A2058 traitées par des extraits de rhizomes de *R. ribes* L. traités et non traités (MP aqueuse et MP alcoolique) par DIC (100 µg/mL) et incubées pour une durée de 72 h à 37°C. (B) Les résultats du test MTT montrant les effets des extraits de rhizomes (100 µg/mL) traités et non traités (MP aqueuse et MP alcoolique) par DIC sur la viabilité des cellules de mélanome.

Un mélange du milieu de culture cellulaire avec 1 % de DMSO a servi de contrôle négatif. Le sel de formazan insoluble métabolisé par les cellules vivantes a été solubilisé dans du DMSO à 37°C pendant 5 min. Une lecture de l'absorbance des solutions a été finalement effectuée à 550 nm.

La prolifération des cellules cancéreuses a été à 88% inhibée par l'extrait MP alcoolique. Ce résultat est cohérent avec ceux du criblage phytochimique, qui ont prouvé la richesse de l'extrait MP alcoolique en composés phénoliques à pouvoir antioxydant, sachant que ces derniers sont connus pour leurs puissantes activités anticancéreuses ainsi que pour leur pouvoir de lutter contre diverses maladies associées au stress oxydatif (Anantharaju et al., 2016). En comparant la photomicrographie de l'essai témoin avec celle de l'extrait MP alcoolique (**Figure 66**), il est remarquable que la morphologie des cellules cancéreuses ait totalement changé, où on observe un détachement de la surface et un rétrécissement cellulaire. Cette nouvelle morphologie suggère la possibilité d'une mortalité cellulaire. L'extrait alcoolique de rhizomes de *R. ribes* L. a également prouvé

être un agent antiprolifératif des cellules de cancer de prostate à de très basse concentration (Tartik et al., 2015).

L'activité antiproliférative de l'extrait MP aqueux était de dix fois moins importante (8,8%) que celle de MP alcoolique après 48 heures d'incubation. Comme c'était le cas pour le criblage phytochimique et les activités d'inhibition de la croissance bactérienne de *S. aureus* en particulier, on remarque que l'extrait alcoolique possède un pouvoir anticancéreux plus important que l'extrait aqueux non-traité. L'effet du solvant d'extraction sur le pouvoir antiprolifératif des extraits a été également souligné par Al-Khatib et al., (2022), où l'extrait éthanolique de rhizomes de *R. ribes* L. était efficace dans l'inhibition de la croissance des cellules d'un cancer colorectal HT29, contrairement à l'extrait aqueux qui n'a pas significativement impacté leur viabilité. Kirmit et al., (2020), ont étudié l'effet des extraits hydroalcooliques 50% (éthanol : eau) provenant de différentes parties de la plante de *R. ribes* L., y compris les rhizomes, sur la prolifération des cellules de mélanome murin B16F10. La lignée testée par Kirmit et al., (2020), est distincte de celle utilisée dans notre étude, toutefois les résultats ont montré que l'activité antiproliférative des rhizomes de *R. ribes* L. était la plus importante par rapport aux autres parties de la plante.

En comparant l'extrait aqueux non traité avec ceux traités par DIC, on remarque que les activités antiprolifératives de ces derniers sont plus importantes que celle de l'extrait MP aqueux, surtout aux niveaux des échantillons 20 et 22. En effet, les photomicrographies de ces deux derniers échantillons montrent peu de cellules cancéreuses adhérentes à la surface par rapport à l'observation de MP aqueuse.

En termes de teneurs phénoliques totales, le **Tableau 22** montre que l'échantillon 22 est moins riche en polyphénols que l'extrait MP aqueux, toutefois l'activité antiproliférative du point 22, traité à une haute pression de vapeur saturée, est assez plus importante que celle de l'extrait aqueux non traité par DIC. On suppose que les sous-produits de la dégradation des composés phénoliques ont attribué à l'extrait 22 son pouvoir anticancéreux. Pour s'assurer de cette hypothèse, une identification de la nature des sous-produits de dégradation est recommandée.

Tant qu'à l'échantillon 20, sa teneur phénolique et son activité antioxydante sont plus importantes que l'échantillon MP aqueux non-traité et par conséquent c'est logique que

ses deux pouvoirs antibactériens et antiprolifératifs soient supérieurs à ceux de l'extrait aqueux non-traité. Cependant, on remarque que les extraits 6, 15 et 20 présentent des teneurs phénoliques totales et des activités antioxydantes voisines, ce qui n'est pas le cas pour leurs activités cytotoxiques où l'extrait 20 a montré être un agent antiprolifératif plus puissant que les extraits 6 et 15. En comparant les photomicrographies des échantillons 6, 15 et 20, on remarque que celle du dernier représente une moindre densité de cellules cancéreuses adhérentes et plus de cellules rétrécies et mortes. Or, ce qui est remarquable est que ces trois points ont été traités avec presque les mêmes pressions de vapeur saturée (100-150 kPa), cependant, l'élément qui les différencie est leur différente teneur initiale en eau. Comme le montre la **Figure 67**, suite au traitement par DIC des points 6 et 15, ceux-ci se situent en position C et C' respectivement dans la zone caoutchouteuse de la matière. En revanche, l'échantillon 20 se situe au voisinage de la zone vitreuse des rhizomes suite à son traitement par DIC (position C'').

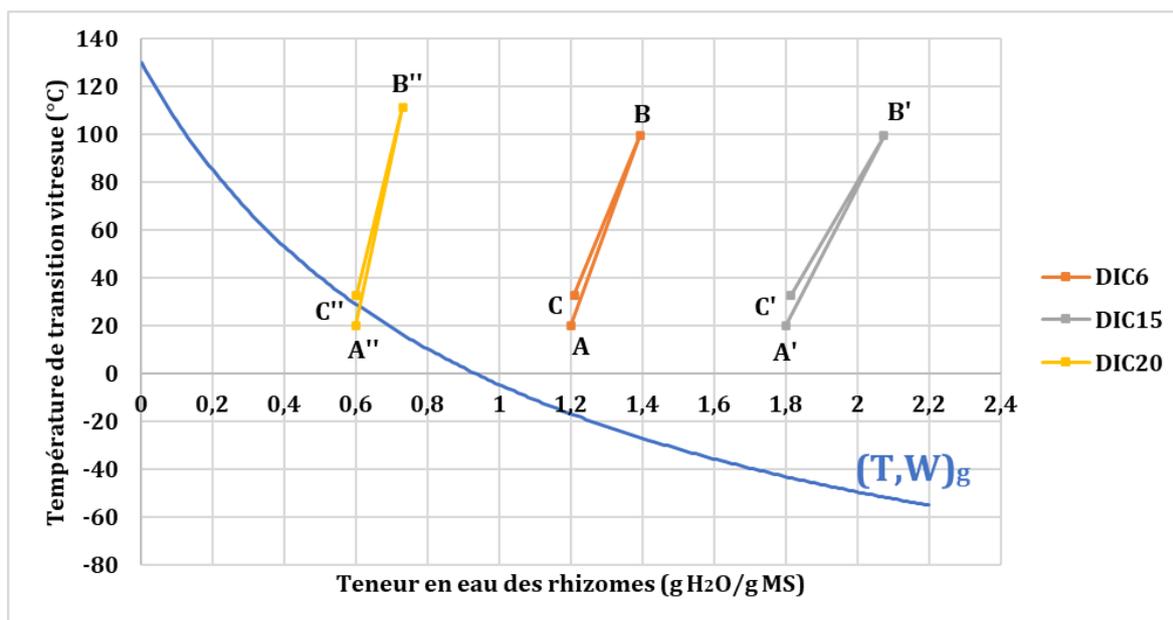


Figure 67- Position des traitements DIC des échantillons 6, 15 et 20 par rapport à la courbe de transition vitreuse $(T,W)_g$ des rhizomes de *R. ribes L.*

Les positions de ces trois échantillons par rapport à la courbe $(T,W)_g$ indiquent que les points 6 et 15 étaient susceptibles à l'effondrement après leur texturation, contrairement au point 20 qui pourrait conserver sa nouvelle texture suite à son traitement par DIC. Par conséquent, l'extraction des molécules à pouvoir antiprolifératif a peut-être été mieux effectuée dans le cas du point 20, lui donnant ainsi son importante activité antiproliférative.

6. Dosage des molécules intéressantes par HPLC

Le protocole adopté pour le dosage des molécules recherchées était convenable pour la séparation des molécules standards. La **Figure 68** montre les chromatogrammes typiques des sept analytes standards visualisés aux longueurs d'onde optimales et selon le protocole optimisé.

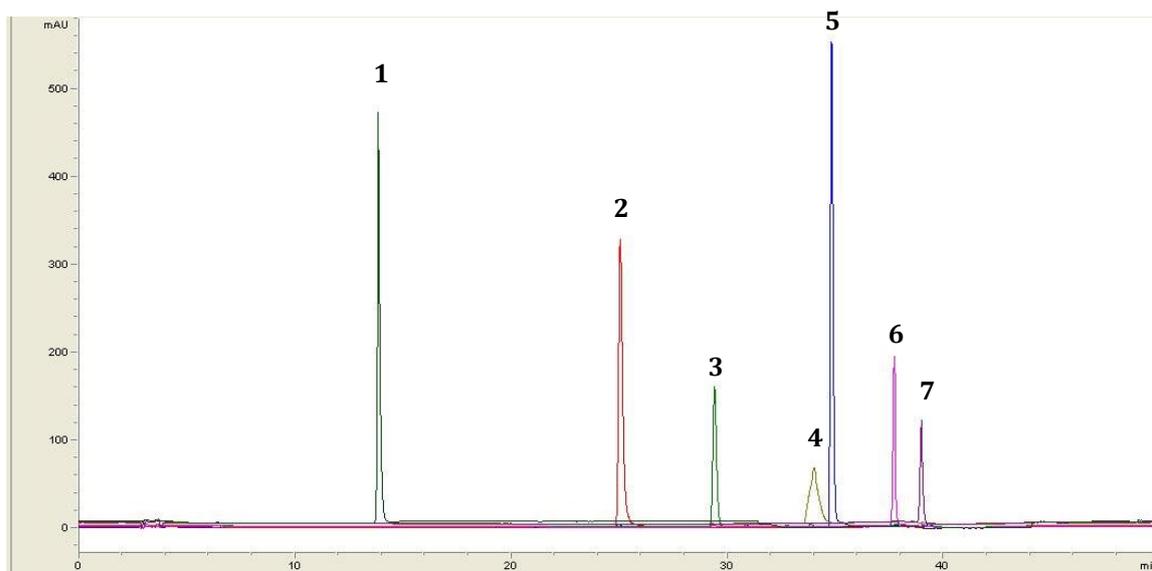


Figure 68- Chromatogrammes enregistrés des diverses molécules standards
(1) Rhaponticine, (2) Kaempferol, (3) Aloe émodine, (4) Emodine, (5) Rhein,
(6) Chrysophanol, (7) physcion

En revanche, le protocole de dosage des molécules constituant les extraits de rhizomes n'a pas abouti à une séparation complète des pics, malgré les modifications apportées. En effet, l'extrait de *R. ribes* L. a prouvé être un mélange assez complexe présentant un signal de pics très dense surtout au niveau des 25 premières minutes du dosage chromatographique. Nous soupçonnons que ces grands pics, dont nous ignorons la nature, entrent en interférence avec les pics des molécules intéressantes sortant avant 25 mins (rhaponticine et kaempferol). Cependant, l'optimisation de la méthode et le bon choix de la concentration de la solution de l'extrait *R. ribes* L. injectée, nous a au moins aidé à rendre les pics sortant après 25 mins clairs et espacés. Il existe, parmi ces derniers, des pics correspondant aux molécules recherchées (**Figure 69**).

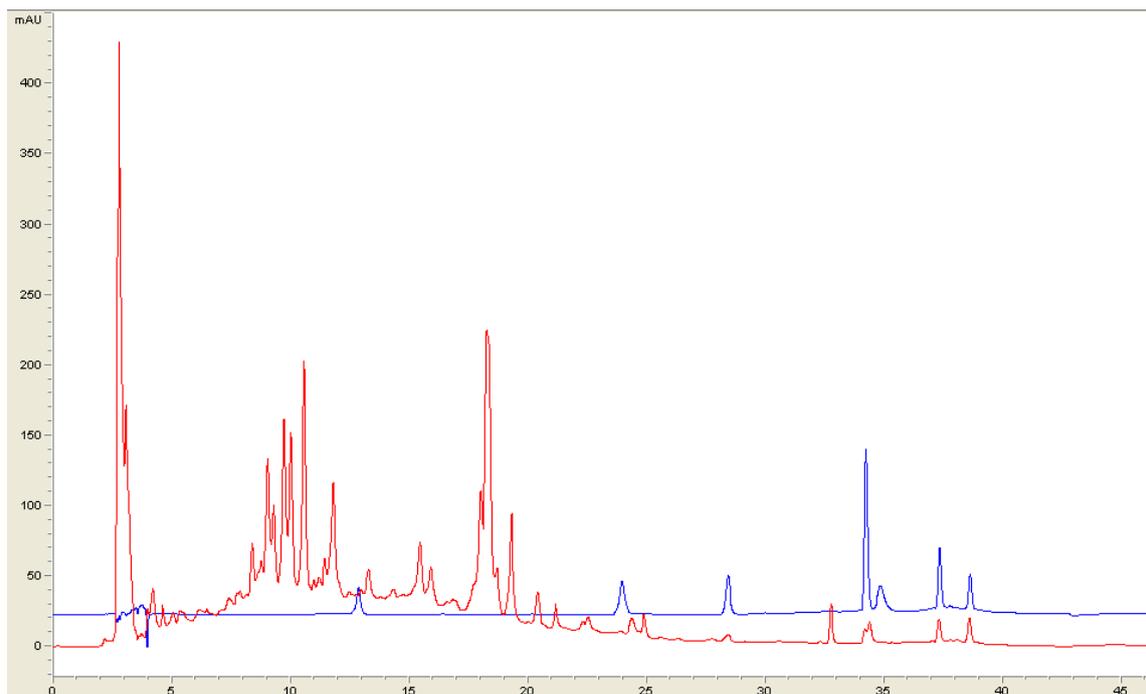


Figure 69- Chromatogrammes d'un mélange des sept molécules standards (en bleu) et d'un échantillon aqueux de *Rheum ribes L.* (en rouge)

6.1. Effet de l'extraction alcoolique sur la composition des extraits

Une comparaison entre les chromatogrammes des extraits non traités aqueux et alcoolique était nécessaire pour mieux comprendre les résultats des expériences précédentes, et la raison pour laquelle l'extrait alcoolique a prouvé être un puissant agent antioxydant, antibactérien et antiprolifératif.

Comme le montre la **Figure 70**, on remarque que le chromatogramme de MP alcoolique (en bleu) se caractérise par les mêmes pics que l'extrait MP aqueux (en rouge), c'est-à-dire que les deux extraits comportent les mêmes molécules. Cependant, les amplitudes des pics de MP alcoolique sont relativement supérieures à celles de MP aqueuse. Il s'agit alors simplement d'une question de différence de polarité entre les deux solvants. Autrement dit, les molécules intéressantes biologiquement actives sont plus solubles dans l'alcool pur que dans l'eau distillée, et par conséquent elles sont fortement plus disponibles dans l'extrait alcoolique que dans l'extrait aqueux. Diverses études comme celles de Cowan, (1999) et Borges et al., (2020), ont montré que l'éthanol a une haute capacité d'extraction des composés phénoliques. En effet, les phénols comprennent un ou plusieurs groupes hydroxyle (partie polaire) ce qui leur permettent de former des liaisons hydrogène avec l'eau. Cependant, ces groupes sont attachés directement à un cycle

aromatique (partie non polaire) ce qui limite leur solubilité dans l'eau (Galanakis et al., 2013).

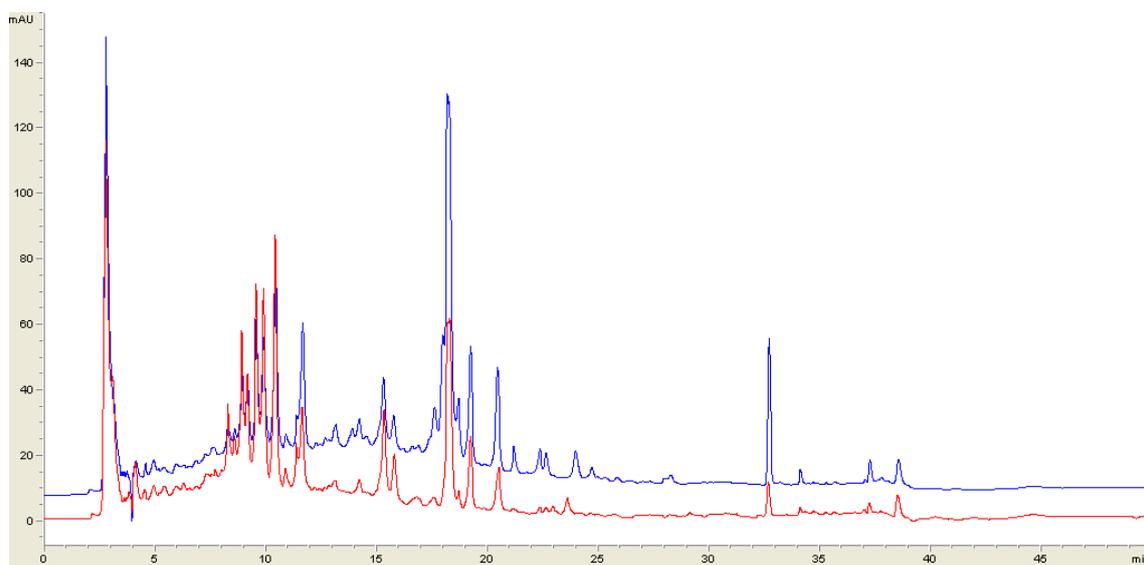


Figure 70- Superposition des chromatogrammes de MP aqueuse (en rouge) et MP alcoolique (en bleu)

6.2. Séparation en phase liquide

La séparation en phase liquide des extraits bruts aqueux et alcoolique a été adoptée afin de pouvoir éliminer les interférents masquant les composés qu'on désire identifier et quantifier. La répartition des composés de ce mélange complexe entre deux phases liquides de différentes polarités (hexane et eau) est considérée comme une sorte de filtrage qui facilite la détection et la quantification des molécules ciblées.

Pour réussir la quantification, il est crucial que les molécules d'intérêt migrent, en leur totalité, vers l'une des phases en question et qu'il ne reste aucune trace résiduelle dans l'autre phase. D'abord nous nous sommes contentés par trois cycles de lavage à l'hexane mais nous nous sommes rendus compte que ce n'était pas suffisant pour le transfert total des molécules d'intérêt vers la fraction organique. Comme le montre la **Figure 71**, des pics résiduels subsistent dans la fraction aqueuse (chromatogramme tracé en rouge) surtout au niveau du pic de l'émodine et du chrysophanol.

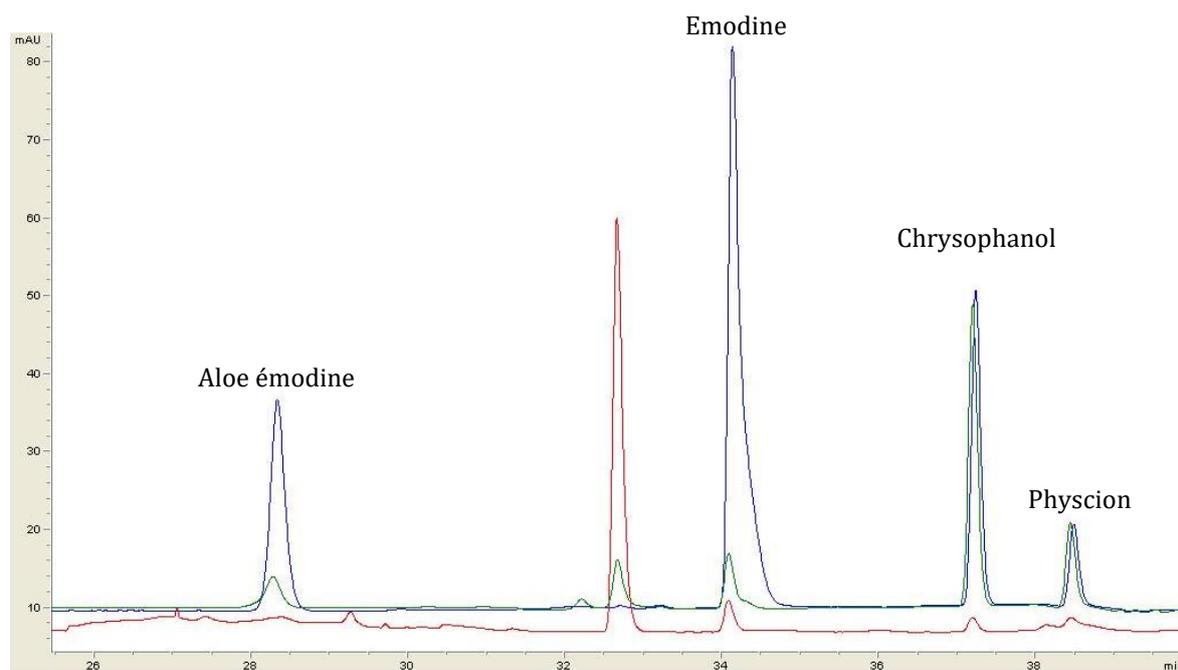


Figure 71- Superposition des chromatogrammes du mélange de standards (en bleu), de la fraction hexanique (en vert) et de la fraction aqueuse (en rouge) suite à 3 cycles de lavage

L'ajout de deux autres cycles de lavage a été alors effectué pour garantir le passage de la totalité des molécules d'intérêt dans la phase organique. Comme le montre la **Figure 72**, on remarque que la phase aqueuse ne présente plus de pics au niveau des molécules d'intérêt (chromatogramme tracé en vert). Ceci dit que 5 cycles de lavage à l'hexane sont nécessaires pour la migration des molécules recherchées vers la fraction organique.

Il est important de noter que parmi les 7 molécules recherchées, seuls l'émumine, l'aloé-émumine, le chrysophanol et le physcion (tous appartenant à la famille des anthraquinones) ont été retrouvés dans les échantillons de rhizomes de *R. ribes* L.. Ce résultat est en conformité avec les dosages chromatographiques effectués par d'autres chercheurs sur les rhizomes de *R. ribes* L. (Abdulla et al., 2014; Çınar Ayan et al., 2021; Raafat et al., 2014). En revanche, le reste des molécules d'intérêts (la rhaponticine, le kaempferol et la rheim) n'ont pas été détectées ni dans la phase aqueuse ni dans la phase organique. Cela contredit d'autres études rapportant la détection du kaempferol, de la rheim (Abdulla et al., 2014) et de la rhaponticine (Öztürk et al., 2007) qui sont avérés complètement non détectables dans notre cas.

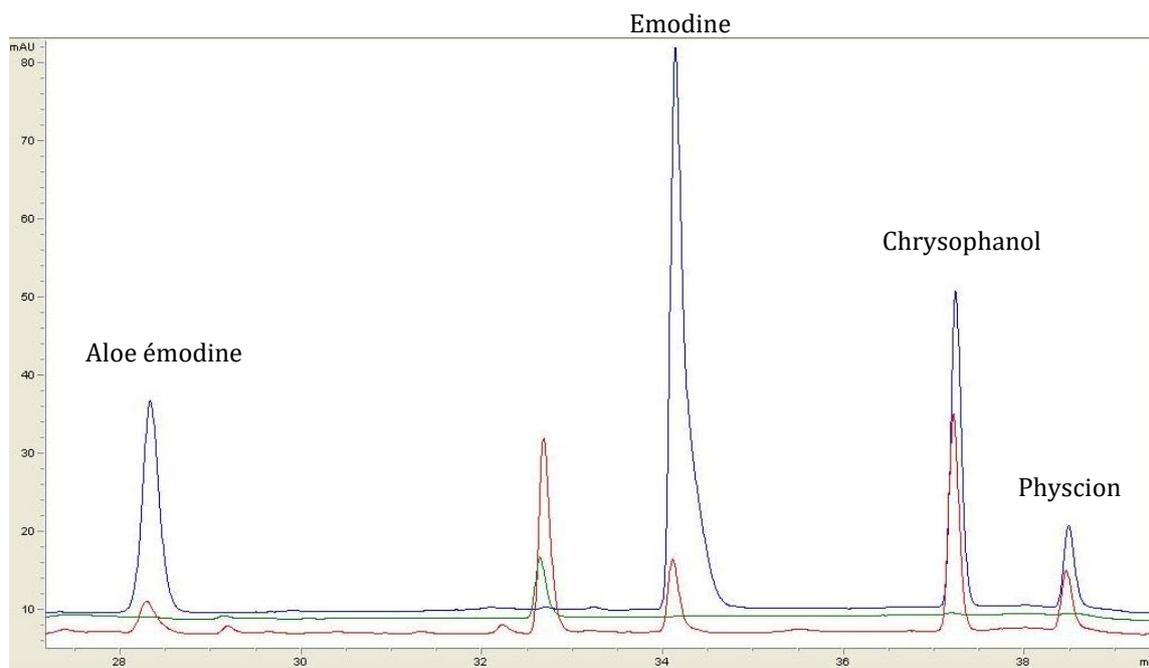


Figure 72- Superposition des chromatogrammes du mélange de standards (en bleu), de la fraction hexanique (en rouge) et de la fraction aqueuse (en vert) suite à 5 cycles de lavage

Deux théories peuvent être à l'origine du manque de molécules observé dans les échantillons testés : d'une part, il se peut que ces molécules aient subi une dégradation (entre la période de collecte des rhizomes et le dosage des extraits) ce qui les a rendues par la suite indétectables. D'une autre part, il est probable que l'espèce utilisée dans l'étude ne présente pas, dans sa composition de base, ce type de molécules.

6.3. Validation de la méthode HPLC-DAD

La méthode HPLC-DAD développée a été validée pour sa linéarité avec les quatre anthraquinones détectées dans les extraits de rhizomes. Les équations de régression pour ces molécules sont présentées dans le **Tableau 23**. Le domaine de linéarité a été estimé entre 0,5 et 78,0 µg/mL pour tous les standards d'anthraquinones. Toutes les courbes d'étalonnage (Annexe 1) ont présenté une bonne linéarité ($R^2 > 0,999$) dans le domaine testé.

Tableau 23- Données des régressions linéaires des molécules standards aux longueurs d'ondes optimales

Molécule standard	Temps de rétention (min)	Équation de régression	R ²	Domaine linéaire (µg/mL)
Émodine	34,7	$y = 0,0159x + 0,7957$	0,9999	1,2-78,0
Aloe émodine	29,5	$y = 0,0059x + 0,2994$	0,9999	0,9-59,9
Chrysophanol	37,5	$y = 0,0056x + 0,1602$	1,0000	0,9-59,9
Physcion	39,0	$y = 0,0391x - 0,0217$	0,9999	0,5-30,0

6.4. Dosage des anthraquinones dans les échantillons de *Rheum ribes* L.

Les analyses chromatographiques ont été effectuées pour les échantillons DIC6, DIC15, DIC20, DIC22, MP aqueux et MP alcoolique. Le but de ces analyses était d'évaluer, d'une part, l'impact du traitement DIC sur la disponibilité des molécules d'intérêt, et d'une autre part de comparer la concentration de l'extrait alcoolique en ces molécules avec celle des extraits aqueux, ce qui pourra aboutir, peut-être, à une meilleure compréhension des résultats biologiques obtenus.

Toutes les solutions brutes des échantillons en question ont subi le protocole de séparation en phase liquide avant qu'elles soient injectées. La présence des quatre anthraquinones a été confirmée en comparant les temps de rétention des pics avec ceux des étalons correspondants (**Figure 73**).

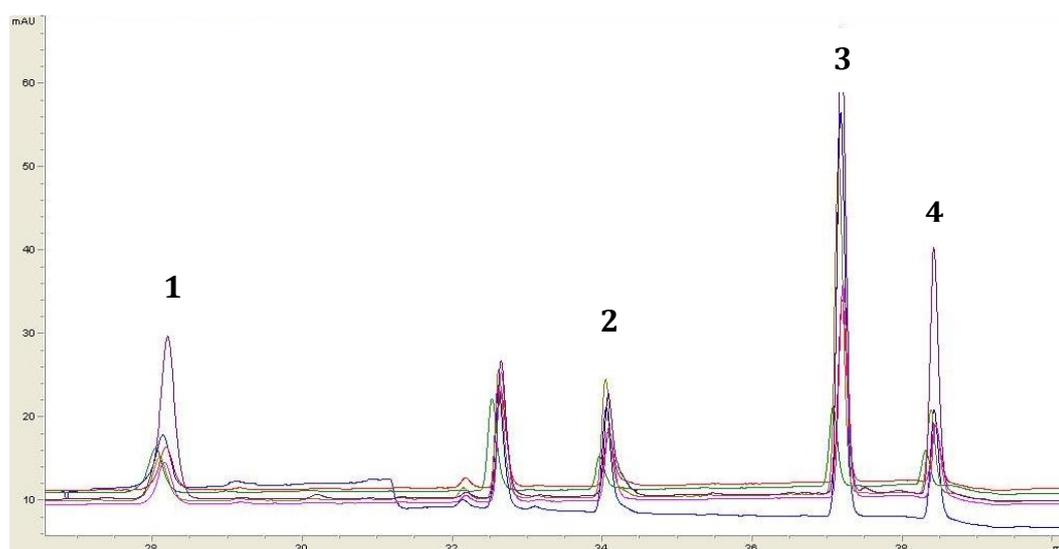


Figure 73- Les chromatogrammes des extraits de rhizomes testés montrant des pics correspondant à l'aloé émodine (1), l'émodine (2), le chrysophanol (3) et le physcion (4)

La détection des molécules d'intérêts a été suivie par la quantification de chacune d'entre elles. Ce travail a été généré par les aires des pics, obtenus par le logiciel d'intégration LC/MSD ChemStation (Agilent, Rev. B.04.01 SP1). Les histogrammes de la **Figure 74** résument les résultats des dosages effectués.

En comparant d'abord les teneurs en aloé émodyne des extraits aqueux traités et non traité par DIC (MP aqueuse), on remarque que la différence entre elles n'est pas assez importante. Une très légère augmentation de la disponibilité de l'aloé émodyne a été observée au niveau des échantillons DIC6 et DIC20. Nous supposons que le traitement par DIC n'a aucun effet sur la disponibilité de l'aloé émodyne dans les extraits de rhizomes de *R. ribes* L. Le traitement par DIC a prouvé avoir également un impact négatif sur la disponibilité de l'émodyne au niveau de tous les extraits aqueux traités. La perte a été moins prononcée au niveau de l'échantillon DIC6, précédemment traité avec une faible pression de vapeur saturée (100 kPa) et plus grave au niveau du point 22 traité avec une haute pression de vapeur saturée. Cela suggère que l'émodyne soit hautement thermosensible. Tant qu'aux chrysophanol et le physcion, on remarque qu'ils sont fortement plus disponibles dans l'échantillon DIC6 que dans le point MP aqueux. Nous supposons que les conditions opératoires avec lesquelles le point DIC6 a été traité sont favorables à l'augmentation de la disponibilité de ces deux molécules. Ce constat peut être à l'origine des hautes teneurs en polyphénol du point 6, tout en sachant que les résultats des teneurs phénoliques totales (**Tableau 22**) ne sont pas uniquement influencés par les quatre molécules dosées ci-dessous et qu'il existe certainement d'autres composés phénoliques que nous n'avons pas dosés. Les faibles teneurs du point 20 en émodyne, aloé émodyne, chrysophanol et physcion, contre sa haute teneur phénolique totale en est la preuve.

En comparant les extraits non traités aqueux et alcoolique, on remarque que toutes les molécules d'intérêts ont été plus disponibles dans l'extrait éthanolique sauf pour l'émodyne. Sachant que les molécules recherchées représentent des bio-activités diverses, et cela justifie le pouvoir antioxydant, antibactérien et antiprolifératif important de l'extrait alcoolique. Il est important de noter que la teneur en chrysophanol de l'extrait alcoolique est au voisinage de celle de l'extrait DIC6. Ceci dit, que le traitement par DIC a

réussi à rendre le chrysophanol assez disponible dans un extrait aqueux que dans un extrait alcoolique.

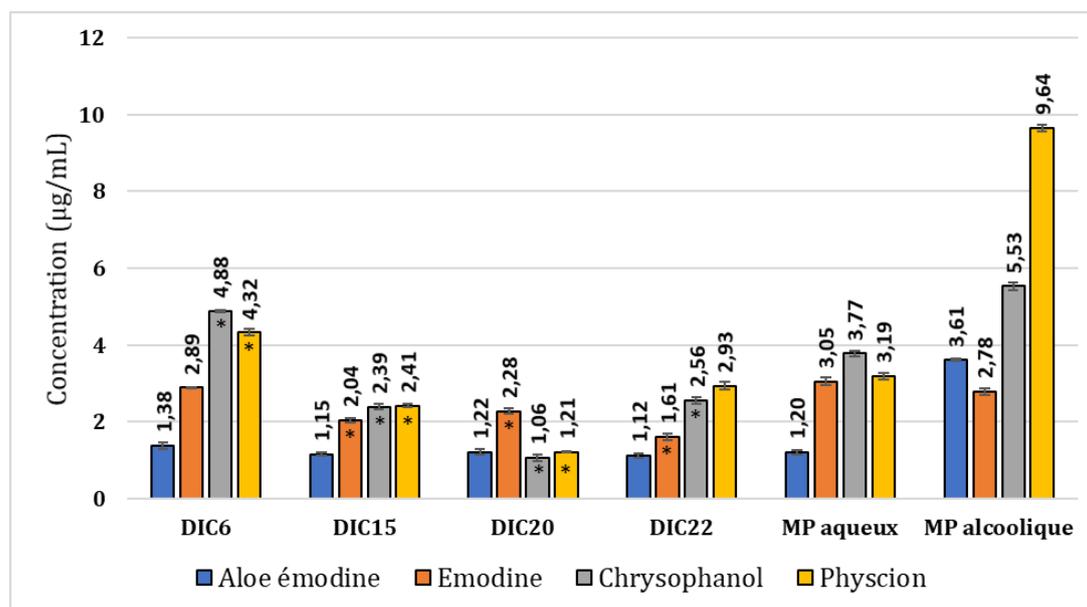


Figure 74- Les teneurs en quatre anthraquinones des extraits traités et non traités par DIC (MP aqueuse et alcoolique)

7. Screening d'un extrait de *R. ribes* L. par UHPLC

Les activités antioxydantes, antibactériennes et antiprolifératives de l'extrait de rhizomes de *R. ribes* L. ont été mises en évidence. En se basant sur d'autres études et sur les résultats du criblage phytochimique, nous avons choisi de cibler et de quantifier sept composés phénoliques théoriquement existant dans les extraits aqueux (traités et non traités) et alcoolique de ce rhizome. Malgré l'injection des standards de ces composés phénoliques en HPLC-UV et les tentatives de décomplexification des solutions de rhizomes par séparation en phase liquide, la mise en évidence s'est limitée à quatre composés parmi les sept recherchés.

A ce niveau, une analyse par spectrométrie de masse de haute résolution, plus sensible et plus spécifique que l'UV, était nécessaire. Divers objectifs sont à la base de ce type d'analyse :

1. La validation de la présence des composés déjà détectés et quantifiés par HPLC-UV.
2. Screening de la solution de macération afin d'identifier d'autres molécules pouvant être à l'origine des activités biologiques principalement observées.

- L'identification de la nature des pics interférant observés dans les chromatogrammes de l'HPLC dans le but de pouvoir choisir, dans les études futures, des cartouches de séparation en phase solide (cartouche SPE) adaptées à la purification de l'extrait de rhizomes de *R. ribes* L.

7.1. Injection du mélange de molécules ciblées

Les standards de polyphénols ciblés ont été injectés afin de vérifier leurs rapports m/z et surtout de déterminer leur temps de rétention (T_r) (**Figure 75**). Le couple m/z et T_r est ensuite utilisé pour analyser les chromatogrammes obtenus et ainsi déterminer si les composés en question sont présents ou non (**Tableau 24**).

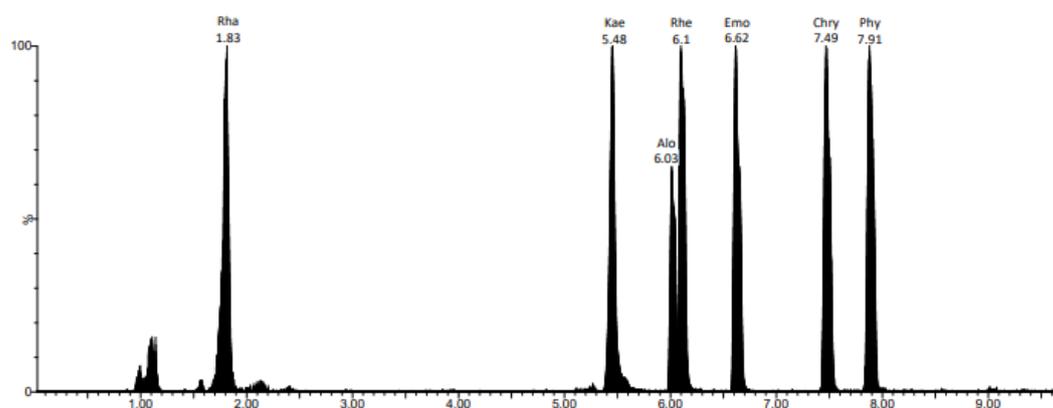


Figure 75- Chromatogramme obtenu à partir du mélange de standards

Tableau 24- Tableau montrant la formule brute, le rapport m/z et le temps de rétention des composés ciblés

Composé phénolique	Formule brute	m/z	t_r (min)
Rhaponticine	$C_{21}H_{24}O_9$	421,1499	1,83
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	287,0550	5,48
Aloe émodine	$C_{15}H_{10}O_5$	271,0601	6,03
Rhein	$C_{15}H_8O_6$	285,0394	6,10
Emodine	$C_{15}H_{10}O_5$	271,0601	6,62
Chrysophanol	$C_{15}H_{10}O_4$	255,0652	7,49
Physson	$C_{16}H_{12}O_5$	285,0758	7,91

7.2. Injection de l'extrait MP aqueux

7.2.1. Détection des composés ciblés

Les résultats de l'injection de l'échantillon MP aqueux sont présents dans la **Figure 76**. Seuls l'émodine, le chrysophanol et le physcion ont été détectés. Cela ne correspond pas totalement aux résultats des analyses effectuées en HPLC-UV où le même extrait présentait dans sa composition l'aloé émodine en plus que ces trois composés. Le dosage en spectrométrie est relativement plus rigoureux que celui fait en HPLC et cela en raison de la possibilité de la détermination des formules brutes et du rapport m/z de toutes les molécules formant le mélange. Par conséquent, nous supposons que le pic manifesté en HPLC au même temps de rétention que celui du standard de l'aloé émodine n'y correspond pas. Il se peut que deux molécules ayant des formules brutes différentes, aient le même temps de rétention. La différenciation entre elles n'est possible qu'en spectrométrie de masse. Tant qu'aux autres composés recherchés, nul entre eux n'a été détecté en UHPLC. Ce résultat confirme celui émis en HPLC et cela implique que les extraits de rhizomes de *R. ribes* L. préparés dans cette étude ne contiennent pas la rhaponticine, le kaempferol, l'aloé émodine et la rhein dans leur composition.

7.2.2. Détection des composés non-ciblés

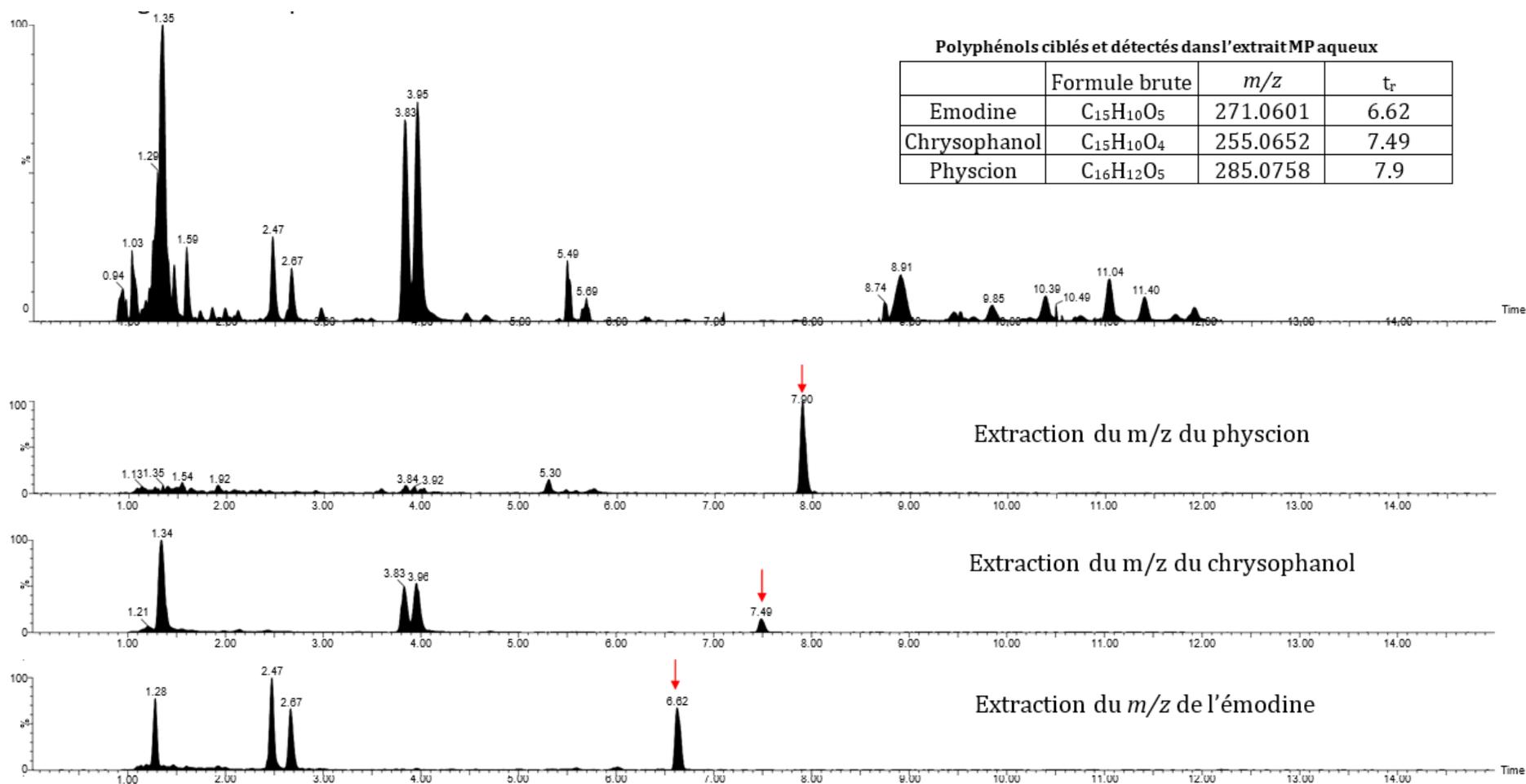
En plus des composés ciblés qu'on visait détecter et quantifier, la solution aqueuse de *R. ribes* L. a montré une richesse en d'autres composés dont les formules brutes ont été révélées grâce à la spectrométrie de masse (**Tableau 25**). Par la suite, le site CheBI (Chemical entities of biological interest) a été utilisé pour déterminer le ou les composé(s) pouvant correspondre à ces formules brutes. Les formules brutes de nombreux composés non ciblés ont été détectées et même si leur identification demeure incertaine pour la plupart, deux grandes familles de composés semblent être présentes : des glucides (et leurs dérivés) et des flavonoïdes glycosylés ou non. Ce résultat justifie l'augmentation de l'indice de réfraction (°Brix) des échantillons 2, 5 et 6 du DoE2 (**Figure 46**) qui a été précédemment liée à la dégradation des flavonoïdes glycosylés et par la suite la libération de leur partie glycosylée dans la solution de rhizomes.

Les molécules non ciblées qui ont été détectées, peuvent être le sujet d'intérêt de diverses études futures effectuées sur les rhizomes de *R. ribes* L., sachant que la plupart d'entre elles n'ont jamais été citées dans la bibliographie. Prenons à titre d'exemple le medicagol

($C_{16}H_8O_6$), une molécule appartenant à la famille des coumestans, des phytoœstrogènes à pouvoir cytotoxique important (Dutta et al., 2021). Les coumestans présentent également diverses activités thérapeutiques telles que les activités hépatoprotectrices et anti-inflammatoires (Dutta et al., 2021). En effet, ces effets thérapeutiques ont été déjà attribués aux rhizomes de *R. ribes* L. dans diverses études (Achakzai et al., 2019; Bakir et al., 2022).

Une multitude de molécules appartenant à la famille des flavonoïdes glycosylés ou non ont été détectées également dans l'extrait aqueux de *R. ribes* L (Annexe 2). En effet, ces molécules n'ont jamais été exploitées dans des études antérieures portant sur les rhizomes de *R. ribes* L. En revanche, l'identification précise n'était pas faisable vu qu'une même formule brute correspondait à plusieurs molécules. Pour une recherche plus précise des flavonoïdes en question, les molécules standards y correspondant doivent être également injectées.

Tant qu'aux glucides, ils sont présents dans l'extrait aqueux sous forme de di-, tri- et tetra-saccharides. D'autres auteurs ont également reporté la détection de molécules glucidiques dans les extraits de *R. ribes* L. (Erecevit and Kırbağ, 2017; Jalill et al., 2015). Ces composés connus pour leur haute polarité, sont suspectées d'être responsables de la grande charge de pics observée dans les chromatogrammes de l'HPLC. Afin d'éliminer les composés n'ayant aucun intérêt nous avons eu recours à la filtration de l'extrait à travers une cartouche SPE C18 en phase inverse et hydrophobe. Cette dernière sert à obtenir une meilleure rétention des composés apolaires et des analytes organiques présents dans les matrices aqueuses.



Polyphénols ciblés et détectés dans l'extrait MP aqueux

	Formule brute	m/z	t _r
Emodyne	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0601	6.62
Chrysophanol	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.0652	7.49
Physcion	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.0758	7.9

Figure 76- Chromatogramme complet de l'extrait MP aqueux obtenue en polarité positive et l'extraction des rapports m/z de trois des molécules recherchées

Tableau 25- Composés non ciblés détectés dans l'extrait MP aqueux en polarité positive

<i>m/z</i>	<i>t_r</i> (min)	Formule brute	Composés suspectés
365,1059	0,98	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na	Disaccharide
527,1587	0,98	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ Na	Trisaccharide
689,2115	0,98	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁ Na	Tetrasaccharide
587,1740	1,18	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
493,1339	1,23	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	16 candidats de type flavonoïdes
587,1740	1,24	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
403,1397	1,24	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	9 candidats de type flavonoïdes + 1 candidat de dérivé d'anthracène
587,1740	1,28	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
477,1392	1,30	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
639,1917	1,30	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
419,134	1,54	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	16 candidats de type flavonoïdes + autres
639,1917	1,68	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	1,81	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	1,94	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	2,06	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
493,1339	2,42	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	15 candidats de type flavonoïdes
493,1339	2,62	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	15 candidats de type flavonoïdes
639,1917	3,29	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
477,1392	3,78	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
477,1392	3,90	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
513,1011	4,61	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂ Na	7 candidats de type flavonoïdes + autres
403,1397	5,45	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	8 candidats de type flavonoïdes + 1 candidat de dérivé d'anthracène
297,0394	6,24	C ₁₆ H ₈ O ₆	Medicagol (ChEBI)

7.1. Injection de l'extrait MP aqueux filtré à travers une cartouche SPE C18

L'extrait de rhizomes MP aqueux a été filtré à travers une cartouche SPE C18 (double élution) puis injecté dans l'UHLC-MS. Le but était de vérifier si cette cartouche est adaptée à l'élimination des sucres pouvant être à l'origine des pics polluants tout en conservant les molécules d'intérêt à l'intérieur de l'extrait aqueux de rhizomes.

Comme on le remarque dans la **Figure 77**, les molécules d'intérêt qui ont été initialement détectées dans l'extrait MP aqueux (émodyne, chrysophanol et physcion) sont toujours présentes dans la solution éluée. En revanche, la cartouche SPE C18 a réussi à éliminer les composés glucidiques les plus polaires tout en gardant en solution les molécules intéressantes, plus précisément les flavonoïdes et leurs dérivés glycosylés, à l'exception du composé ayant une formule brute $C_{29}H_{34}O_{16}$ et sortant à 3,29 minutes. Deux théories peuvent être à la base de ce constat : des composés ayant le même rapport m/z et la même formule brute n'ont pas été éliminés par la cartouche (**Tableau 26**). Vu que la molécule en question n'a pas été précisément identifiée en raison de l'existence de quatre composés candidats (Tricin 7-O-neohesperidoside, Rhamnazine 3-rutinoside, Tricin 7-rutinoside, 3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside) il se peut qu'à ce niveau-là, la molécule en question soit différente des autres ayant la même formule brute et qu'elle ne soit pas retenue dans la cartouche. Un autre raisonnement peut aussi être probable, sachant qu'il existe divers facteurs potentiels pouvant affecter la récupération de l'extraction en phase solide (Maranata et al., 2021), nous supposons ainsi que la molécule en question est toujours présente dans la solution éluée, mais que sa concentration, après filtration par SPE C18, est au-dessous du seuil de détection par UHPLC-MS.

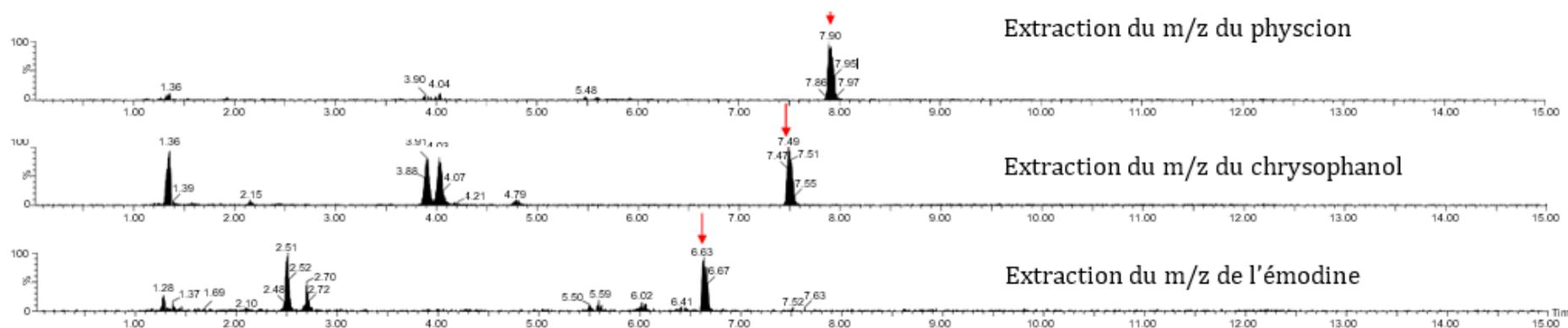


Figure 77- Extraction des rapports m/z de trois des molécules recherchées dans l'extrait MP aqueux après une double élution dans une SPE C18

Tableau 26- Composés non ciblés détectés dans l'extrait MP aqueux en polarité positive après une double élution dans une SPE C

<i>m/z</i>	<i>t_r</i> (min)	Formule brute	Composés suspectés (En rouge figurent les composés détectés dans l'extrait MP aqueux et absents des éluions SPE C18)
365,1059	0,98	C₁₂H₂₂O₁₁Na	Disaccharide
527,1587	0,98	C₁₈H₃₂O₁₆Na	Trisaccharide
689,2115	0,98	C₂₄H₄₂O₂₁Na	Tetrasaccharide
587,1740	1,18	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
493,1339	1,23	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	16 candidats de type flavonoïdes
587,1740	1,24	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
403,1397	1,24	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	9 candidats de type flavonoïdes + 1 candidat de dérivé d'anthracène
587,1740	1,28	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃ Na	Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside/3S-hydrangenol 4'-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranoside/Cascaroside D/Cascaroside C/Aloinoside A/Aloinoside B
477,1392	1,30	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
639,1917	1,30	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
419,134	1,54	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	16 candidats de type flavonoïdes + autres
639,1917	1,68	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	1,81	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	1,94	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
639,1917	2,06	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
493,1339	2,42	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	15 candidats de type flavonoïdes
493,1339	2,62	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	15 candidats de type flavonoïdes
639,1917	3,29	C₂₉H₃₄O₁₆	Tricin 7-O-neohesperidoside/Rhamnazin 3-rutinoside/Tricin 7-rutinoside/3,4'-Dihydroxy-7,3',5'-trimethoxyflavone 3-galactosyl-(1->4)-xyloside
477,1392	3,78	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
477,1392	3,90	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	Isoorientin 7,3'-dimethyl ether/Eupalitin 5-rhamnoside/Scutellarein 7,4'-dimethyl ether 6-glucoside/7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside/Orientin 7,3'-dimethyl ether
513,1011	4,61	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂ Na	7 candidats de type flavonoïdes + autres
403,1397	5,45	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	8 candidats de type flavonoïdes + 1 candidat de dérivé d'anthracène
297,0394	6,24	C ₁₆ H ₈ O ₆	Medicagol (ChEBI)

8. Conclusions

En conclusion, ce chapitre a traité l'effet de la variation de trois paramètres opératoires (la pression de vapeur saturée « P », le temps de traitement « t », et la teneur en eau « W » des rhizomes broyés) sur la teneur en polyphénol totaux et en flavonoïdes des extraits traités et non-traités par DIC, ainsi que leurs activités antioxydante, antibactérienne et antiproliférative. De plus, sept composés phénoliques ont été recherchés dans ces extraits par leur injection en HPLC.

Les résultats du criblage phytochimique ont révélé que le traitement par DIC impacte les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes, ainsi que les activités antioxydantes des extraits de rhizomes. Grâce à la méthodologie de surface de réponse, nous avons réussi à identifier les paramètres opératoires optimaux du traitement : soit une pression de vapeur saturée $P = 100$ kPa, une durée de traitement $t = 30$ s et une teneur initiale en eau des rhizomes $W = 0,2$ g H₂O/g MS. Nous avons également constaté que l'effet de la nature du solvant d'extraction sur les valeurs de TPC, TFC et IC₅₀ est relativement supérieur à celui du traitement des rhizomes par DIC.

Les pouvoirs d'inhibition de la croissance bactérienne de quelques extraits issus de ce plan d'expériences et des échantillons non-traités (MP aqueux et alcoolique) ont été testées. Les résultats ont révélé que les extraits aqueux traités ou non-traités par DIC sont relativement inefficaces dans l'inhibition de la croissance bactérienne d'*E. coli* et de *S. aureus*. En effet, aucun des extraits traités n'a pu dépasser 40% et 11% d'inhibition de *S. aureus* et d'*E. coli* respectivement, et par conséquent il était impossible de déterminer la CMI des extraits aqueux même à la concentration la plus élevée. Toutefois, et contrairement à ce que les extraits aqueux ont montré, l'extrait alcoolique a prouvé son efficacité dans l'inhibition de 99% de *S. aureus*, avec une CMI de 1000 µg/mL et une CMB de 2000 µg/mL. En effet, les teneurs très élevées en polyphénols totaux, particulièrement en flavonoïdes, et l'activité antioxydante très importante de l'échantillon alcoolique, sont à l'origine de l'effet antibactérien observé. En revanche, la CMI de la croissance de *E. coli* par ce type d'extrait n'a pas été déterminée puisque la concentration la plus élevée a juste inhibé 57% de la croissance bactérienne.

Les activités antiprolifératives des extraits traités et non-traités par DIC ont été également testées. Les résultats ont montré que tous les extraits traités exercent des pouvoirs

antiprolifératifs supérieurs à celui de l'extrait MP aqueux, surtout au niveau des échantillons 20 et 22. D'autre part, le pouvoir antiprolifératif de l'extrait MP alcoolique était de 10 fois plus important que celui de l'extrait MP aqueux.

Finalement, les dosages chromatographiques ont révélé que les rhizomes étudiés ne présentent pas dans leur composition la totalité des molécules recherchées. En revanche, les pics correspondant à l'émodine, l'aloé émodine, le chrysophanol et le physcion ont été détectés. Les quantités de ces derniers ne sont pas plus importantes dans les extraits aqueux des matériaux traités que dans MP. En revanche, des légères augmentations des teneurs en chrysophanol et en physcion ont été remarquées au niveau de l'échantillon DIC6. D'autre part, le « screening » par UHPLC-MS a révélé l'absence de l'aloé-émodine dans l'échantillon MP aqueux. Par conséquent, nous supposons que le pic détecté en HPLC au même temps de rétention que celui du standard de l'aloé-émodine n'y correspond pas. En plus des composés ciblés qu'on visait, la solution aqueuse de *R. ribes* L. a montré une richesse en d'autres composés. Ces derniers appartiennent en général à deux grandes familles : les glucides (et leurs dérivés) et les flavonoïdes glycosylés ou non. Ces composés méritent d'être exploités dans des études ultérieures, surtout que parmi eux se présentent des molécules à effets thérapeutiques.

Chapitre V

**Quatrième plan d'expériences : un
plan prospectif**

1. Rappel du dispositif expérimental

Les paramètres opératoires optimaux de la DIC ont été déterminés dans les trois derniers plans d'expériences. En résumé, l'adoption d'une basse pression de vapeur saturée a joué un rôle majeur dans la protection des composés phénoliques thermosensibles et dans l'augmentation de leur disponibilité dans les échantillons traités. En revanche, la variation du temps de traitement n'avait pas un effet significatif.

Il serait donc intéressant de tenter des pressions de vapeur saturée encore moins importantes que celles adoptées dans le DoE 3, c'est-à-dire inférieure à 100 kPa. Tant qu'à la teneur initiale en eau des échantillons (W), il a été démontré que son augmentation n'aboutira pas à des meilleurs rendements en composés phénoliques. En prenant compte de la courbe de transition vitreuse qui a été précédemment estimée, la teneur initiale en eau des rhizomes broyés a été fixée à 0,45 gH₂O/ g MS.

2. Teneurs phénoliques totales des échantillons du DoE 4

Les diagrammes de la **Figure 78** montrent les résultats des teneurs phénoliques totales des échantillons du DoE4 traités et non traités par DIC (MP aqueuse).

D'abord, il est remarquable que tous les échantillons traités aient enregistré des valeurs de TPC supérieures à celle de MP aqueuse, ce qui n'a jamais été observé dans les résultats des trois derniers plans d'expériences. Ce résultat met de nouveau l'accent sur la thermosensibilité des composés phénoliques des rhizomes de *R. ribes* L. d'où l'intérêt d'adopter un traitement doux en terme de pression de vapeur saturée. Une marge de pression allant de 60 à 160 kPa correspond à des températures de traitement comprises entre 86 et 113 °C. A ces niveaux, les températures sont considérées comme peu nuisibles aux composés phénoliques surtout qu'il s'agit d'un traitement de courte durée (Cheng et al., 2014).

Comme c'était le cas dans les plans d'expériences 2 et 3, les valeurs de TPC des points centraux sont répétables. Les valeurs phénoliques les plus élevées ont été attribuées aux échantillons 8 (119,95±0,88 mg EAG/g extrait), 9 (121,59±0,30 mg EAG/g extrait) et 11 (133,12±0,37 mg EAG/g extrait) traités avec les pressions de vapeur saturée les moins élevées (70, 70 et 60 kPa respectivement) pour des durées de 22, 8 et 15 secondes (**Tableau 27**). Ces résultats sont cohérents avec ceux des plans d'expériences précédents

où les meilleures valeurs de TPC étaient toujours attribuées aux points traités avec la pression de vapeur la plus faible du domaine adopté.

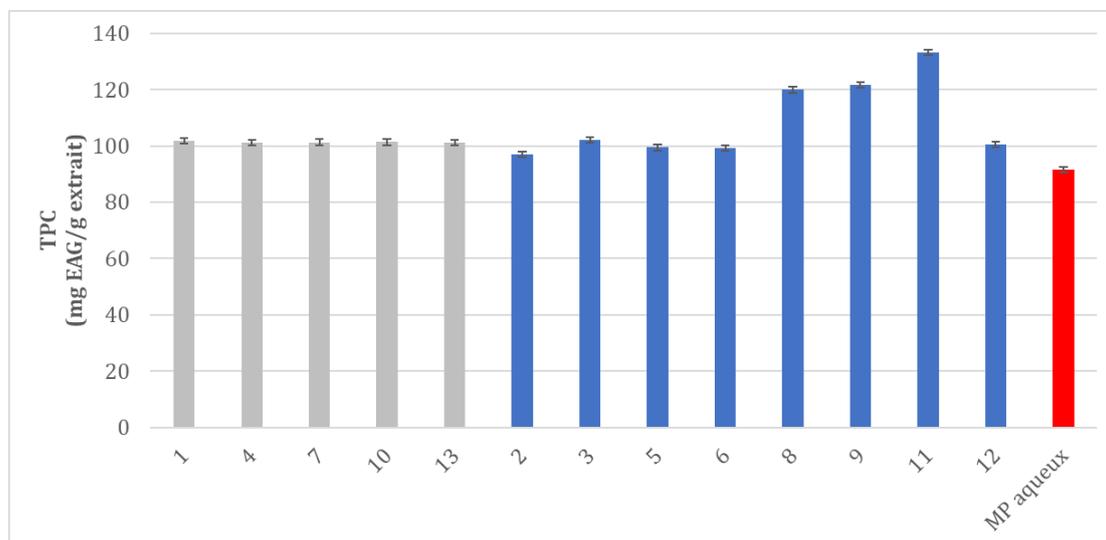


Figure 78- Teneurs phénoliques totales des différents échantillons traités et non -traités (MP) par DIC (DOE4)

Tableau 27- Conditions expérimentales des différents essais du DoE4 avec le contenu phénolique total (TPC) des extraits traités et non traités (MP) par DIC

	Essai n°	Pression (kPa)	Temps (s)	TPC (mg EAG/g extrait)
Points centraux	1	110	15	101,81±0,61
	4			101,25±0,55
	7			101,32±0,65
	10			101,35±0,23
	13			101,15±0,65
	2	160	15	96,940±0,71
	3	110	25	102,05±0,53
	5	140	22	99,440±0,42
	6	140	8	99,270±0,41
	8	70	8	119,95±0,88
	9	70	22	121,59±0,30
	11	60	15	133,12±0,37
	12	110	5	100,56±0,92
	MP aqueuse	-	-	91,450±0,29

Les résultats observés dans la **Figure 78** sont encore mieux soulignés dans le diagramme de Pareto (**Figure 79-A**) qui montre que la variation de la pression de vapeur saturée est le seul paramètre opératoire à avoir un effet significatif sur les teneurs phénoliques des échantillons traités. Les tracés des effets principaux (**Figure 79-B**) illustrent d'une part la relation négative qui existe entre l'augmentation de la pression de la vapeur saturée et les valeurs de TPC et d'autre part le manque d'effet de la variation du temps de traitement sur la même variable réponse.

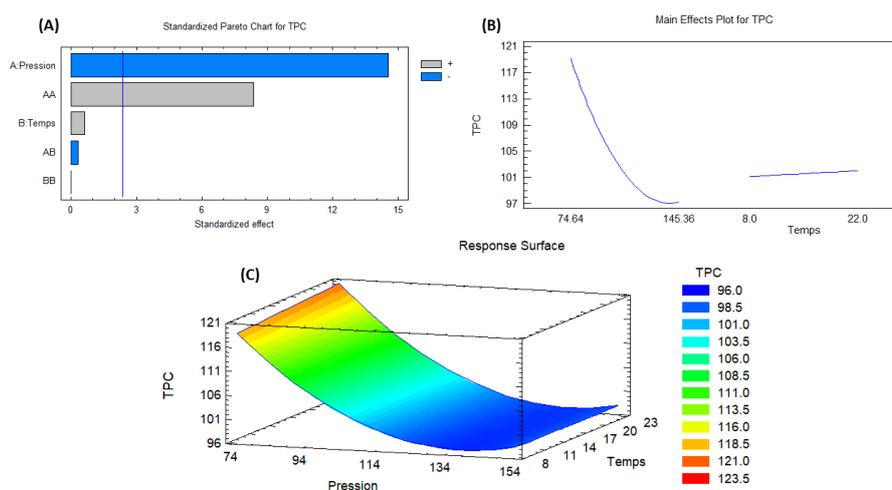


Figure 79- Diagramme de Pareto (A), tracé des effets principaux (B) et surface de réponse (C) pour les valeurs de TPC des échantillons du DOE4

L'équation polynomiale (20) estimée à partir de la méthode de surface de réponse (**Figure 79-C**) indique avec $R^2 = 98\%$ la haute qualité d'ajustement du modèle de TPC. En plus, l'équation (1) a également confirmé que les conditions DIC de pression de vapeur saturée de $P = 60$ kPa et de temps de traitement de $t = 25$ s, se rapportent à la valeur optimale de TPC de 132 mg EAG/g extrait, qui est environ 44 % plus élevée que la matière première.

$$TPC = 196,097 - 1,448P + 0,222t + 0,0052P^2 - 0,0014Pt + 0.000128t^2 \quad (20)$$

Il est important de noter que parmi tous les plans d'expériences déjà adoptés, l'amélioration la plus importante au niveau de la teneur phénolique (45%) a été atteinte dans le DoE4, d'où l'intérêt de l'optimisation des paramètres opératoires.

3. Teneurs phénoliques totales des échantillons alcooliques et hydroalcooliques

La teneur phénolique de l'extrait alcoolique, déjà effectué dans le DoE3 était relativement supérieure à celles des extrait aqueux traités et non traités (MP aqueuse) par DIC. En effet, le solvant d'extraction a impacté les activités biologiques des échantillons où l'extrait alcoolique a prouvé être un agent antibactérien et antiprolifératif plus puissant que tous les échantillons aqueux traités et non-traités par DIC. Par ailleurs, diverses études ont montré que l'éthanol 70% est le solvant le plus approprié pour l'extraction maximale des composés phénoliques des matrices végétales (Liu, 2008; Lohvina et al., 2022; Miguel et al., 2010). En effet, un solvant hydroalcoolique de ratio 70:30 éthanol:eau, permet d'extraire une variété de composés phénoliques, qui sont en effet plus solubles dans le mélange des solvants que dans l'un des solvants purs (Sánchez-Aguirre et al., 2022).

Vu que l'échantillon 11 a enregistré la valeur de TPC la plus élevée parmi celles des autres échantillons du DoE4 en extraction aqueuse, deux autres types d'extractions (hydroalcoolique et purement alcoolique) ont été effectuées sur ce même point. Le but de ces travaux était d'évaluer l'effet du solvant sur l'extraction des polyphénols d'un échantillon traité par DIC et de le comparer avec le contrôle négatif y correspondant (MP hydroalcoolique et MP alcoolique). La **Figure 80** représente les résultats des teneurs phénoliques totales suite aux trois types d'extractions appliquées sur l'échantillon 11, préalablement traité par DIC (P= 60 kPa, t= 15s).

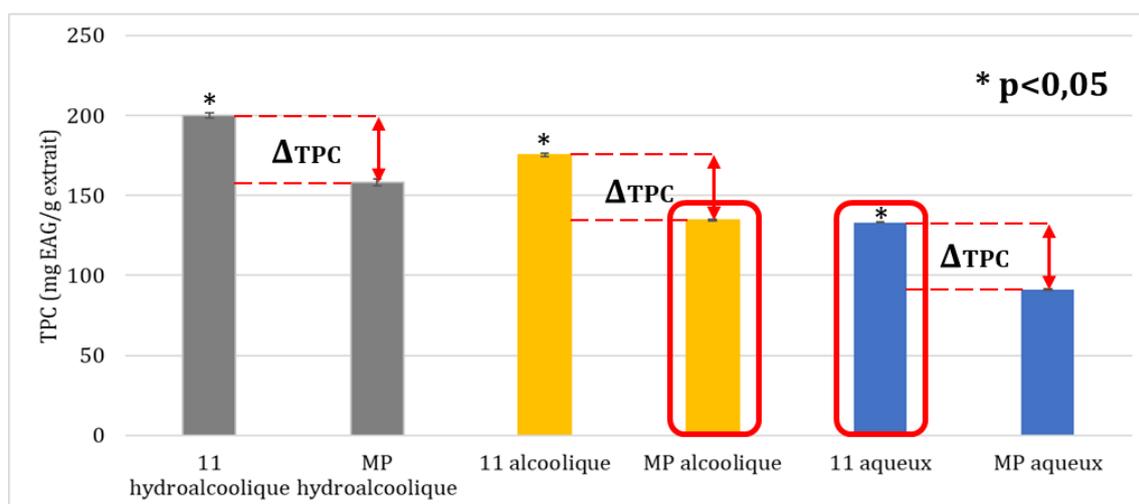


Figure 80- Teneurs phénoliques totales des échantillons 11 et MP suite à des extractions aqueuses, alcooliques et hydroalcooliques

Il est d'abord remarquable que les décalages ($\Delta\text{TPC} \approx 41 \text{ mg EAG/g extrait}$) entre les teneurs phénoliques des échantillons 11 et les contrôles négatifs y correspondants sont similaires. Ceci dit que l'effet du traitement par DIC sur l'échantillon 11 est répétable, indépendamment du solvant d'extraction choisi. De plus, les résultats ont montré que les extractions des échantillons 11 et MP avec de l'éthanol 70% a entraîné une meilleure extraction ($p < 0,05$) des composés phénoliques par rapport à l'extraction avec l'eau ou l'éthanol pur (**Tableau 28**). Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Sánchez-Aguirre et al., (2022).

Tableau 28- Teneurs phénoliques totales de l'échantillon 11 macéré dans une solution hydroalcoolique EtOH : H₂O « 11 hydroalcoolique » et dans de l'éthanol pur « 11 alcoolique »

Essai n°	Pression (kPa)	Temps (s)	TPC (mg EAG/g extrait)
11 Hydroalcoolique	60	15	200,14±1,39
MP hydroalcoolique	-	-	158,10±2,03
11 alcoolique	60	15	175,29±1,08
MP alcoolique	-	-	134,57±0,51

Les résultats du DOE 3 ont suffisamment prouvé que l'extrait macéré dans de l'éthanol pur était plus riche en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, et qu'il exerce des pouvoirs antioxydant, antibactérien et antiprolifératif relativement supérieurs à ceux des extraits aqueux, y compris ceux traités par DIC. Par ailleurs, il est notable dans la **Figure 80** que les échantillons « 11 aqueux » et « MP alcoolique » présentent presque les mêmes teneurs phénoliques (133,12±0,37 mg EAG/g MS et 134,57±0,51 mg EAG/g MS respectivement)

Ce résultat est très intéressant, sachant que l'un des objectifs de notre étude est d'optimiser l'extraction des molécules bioactives tout en respectant, au maximum possible, la méthode traditionnelle de préparation des décoctions de *R. ribes* L. Il sera donc intéressant de mener des expériences plus poussées afin d'exploiter l'impact du traitement par DIC sur les activités biologiques. Des résultats complémentaires et en faveur de ce qu'on a brièvement démontré dans ce chapitre pourront mener à la commercialisation des rhizomes traités selon les paramètres optimaux de la DIC.

4. Conclusion

La première partie de ce chapitre présente les résultats des teneurs phénoliques des échantillons du quatrième plan d'expériences (DoE 4), qui a été établi en se basant sur les paramètres optimaux conclus des trois derniers plans de l'étude. Ainsi, tous les échantillons traités dans le cadre de ce DoE4 ont montré des valeurs de TPC supérieures à celle de MP aqueuse, ce qui n'a jamais été observé dans les résultats des autres plans d'expériences. L'amélioration la plus importante au niveau de la teneur phénolique (45%) a été atteinte dans le DoE 4, d'où l'intérêt de l'optimisation des paramètres opératoires.

La deuxième partie de ce chapitre montre les résultats des teneurs phénoliques de deux types d'extractions (hydroalcoolique et purement alcoolique) du point 11. Le but était d'évaluer l'effet du solvant sur l'extraction des polyphénols d'un échantillon traité par DIC et de le comparer avec le contrôle négatif y correspondant (MP hydroalcoolique et MP alcoolique). Pareillement aux constats observés dans l'extraction aqueuse, il a été constaté que les teneurs phénoliques des extraits 11 alcooliques et 11 hydroalcoolique traités par DIC sont supérieures à celles des contrôles négatifs y correspondants. Les résultats ont également montré que l'extraction hydroalcoolique entraîne une meilleure extraction des composés phénoliques par rapport à l'extraction avec l'eau seule ou l'éthanol pur ($p < 0,05$).

Conclusions générales et perspectives

L'utilisation de produits médicinaux et de compléments à base de plantes a considérablement augmenté au cours des trois dernières décennies. Pas moins de 80 % des personnes dans le monde y ont recours pour une partie de leurs soins de santé primaires (Ekor, 2014). Il serait donc intéressant d'optimiser les paramètres de nouveaux procédés d'extraction des molécules bioactives à effets thérapeutiques. Des centaines d'études ont prouvé l'efficacité de la technologie DIC dans l'expansion des matrices végétales, permettant une meilleure pénétration des solvant d'extraction et par la suite un rendement d'extraction plus élevé. Dans cette étude nous avons visé à optimiser les paramètres opératoires du traitement des rhizomes de *R. ribes* L. par DIC, en adoptant une série de plans d'expériences.

En se basant sur les résultats des deux premiers plans d'expériences, nous avons d'une part conclu que l'étape du broyage mécanique des rhizomes avant leur traitement par DIC est cruciale. D'autre part, les résultats ont montré que le traitement des rhizomes avec des hautes pressions de vapeur saturée entraîne la dégradation des molécules phénoliques thermosensibles contenues dans les extraits de rhizomes.

Les paramètres opératoires du troisième plan d'expériences ont été choisis en fonction des constats précédents, en ajoutant un facteur supplémentaire : la teneur en eau initiale des rhizomes. À l'issue de l'application du DoE 3 et grâce à la méthode de surface de réponses, nous avons pu identifier les paramètres opératoires du traitement permettant d'atteindre les valeurs maximales de TPC, TFC et d'activité antioxydante des rhizomes. Ainsi, les paramètres optimisés sont une pression de vapeur saturée $P = 100$ kPa, une durée de traitement $t = 30$ s et une teneur initiale en eau des rhizomes $W = 0,2$ g H₂O/g MS. Nous avons également constaté que l'effet de la nature du solvant d'extraction sur toutes les variables réponses est relativement supérieur à celui du traitement des rhizomes par DIC. Sur le plan des activités antibactériennes des rhizomes, nous avons conclu que les extraits aqueux traités ou non-traités par DIC sont relativement inefficaces dans l'inhibition de la croissance bactérienne de *E. coli* et de *S. aureus*. Par contre, nous avons constaté que le traitement par DIC exerce des effets positifs sur les pouvoir antiprolifératifs des extraits de rhizomes. Par ailleurs, l'échantillon 20 précédemment

traité à une basse pression de vapeur saturée et présentant une teneur élevée en polyphénols, a réussi à inhiber jusqu'à 60% la viabilité des cellules cancéreuses.

De plus, en se basant sur les dosages chromatographiques par HPLC-UV et UHPLC-MS nous avons pu conclure que trois (émodyne, chrysophanol et physcion) parmi les sept molécules d'intérêt recherchées ont effectivement été détectées dans les extraits de rhizomes. Les résultats de la quantification nous a permis de constater que le traitement par DIC n'impacte pas ou peu les teneurs en émodyne, chrysophanol et physcion des extraits.

Enfin, le dernier plan d'expériences a confirmé l'intérêt de l'optimisation des paramètres opératoires de la DIC. En effet, l'amélioration la plus élevée (45%) au niveau de la teneur phénolique des extraits aqueux de rhizomes a été atteinte dans le cadre du DoE 4. De plus, nous avons pu conclure que l'extraction hydroalcoolique (éthanol 70%) d'un point traité avec les paramètres opératoire optimaux de la DIC donne une meilleure extraction des composés phénoliques par rapport à l'extraction avec l'eau seule ou l'éthanol pur ($p < 0,05$).

Dans la continuité des travaux de cette thèse, plusieurs perspectives sont envisageables. Tout d'abord, il serait intéressant d'effectuer des essais expérimentaux, afin d'enrichir nos connaissances sur les variables réponses du dernier plan d'expériences. Des données supplémentaires concernant les activités biologiques des échantillons du DoE 4 pourront confirmer l'amélioration importante observée au niveau des teneurs phénoliques des extraits aqueux des rhizomes.

Au-delà des effets antibactériens et antiprolifératifs déjà testés dans le cadre de cette thèse, il serait intéressant d'élargir la gamme des activités biologiques des extraits traités par les paramètres optimaux de la DIC. Par exemple, l'étude de l'effet du traitement par DIC sur le pouvoir anti-inflammatoire des rhizomes de *R. ribes* L. serait important, surtout que cet effet thérapeutique a été déjà prouvé par divers chercheurs. Par ailleurs, il serait nécessaire de tester l'effet des extraits des rhizomes sur la prolifération d'autres types de lignées cellulaires que ceux exploités dans cette thèse.

Suite aux manques de données sur la composition chimique exacte des rhizomes de *R. ribes* L., nous avons été obligés d'adopter dans nos analyses la température de transition vitreuse approximative des rhizomes. Un travail approfondi pour la détermination des

éléments constituant les rhizomes, ainsi que la fraction massique de chacun d'entre eux serait nécessaire pour un calcul rigoureux de la T_g des rhizomes et par conséquent des analyses encore plus exactes sur la position du traitement par DIC par rapport à la courbe $(T,W)_g$.

Noori et al. (2022) ont reporté des augmentations significatives des niveaux de teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ainsi que des améliorations des activités antioxydantes et antiprolifératives des rhizomes de *R. ribes* L. extraits dans un bain ultrasonique. Une étude du couplage de la technologie de la Détente Instantanée Contrôlée avec une extraction assistée par ultrasons serait donc d'une importance majeure.

Références bibliographiques

- Abdulla, K.K., Taha, E.M., Rahim, S.M., 2014. Phenolic profile, antioxidant, and antibacterial effects of ethanol and aqueous extracts of *Rheum ribes* L. roots. *Pharm. Lett.* 6, 201–205.
- Abi Aad, E., Karaky, R., Besombes, C., Haddad, J., Allaf, K., 2022. Effect of DIC Technology on Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Rheum ribes* L. rhizome Extracts. *Int. J. Appl. Eng. Technol.* 4, 7.
- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., Büsselberg, D., 2020. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules* 10, 221. <https://doi.org/10.3390/biom10020221>
- Achakzai, J.K., Anwar Panezai, M., Kakar, M.A., Kakar, A.M., Kakar, S., Khan, J., Khan, N.Y., Khilji, I., Tareen, A.K., 2019. In Vitro Anticancer MCF-7, Anti-Inflammatory, and Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) and GC-MS Analysis of Whole Plant Butanol Fraction of *Rheum ribes* (WBFRR). *BioMed Res. Int.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3264846>
- Addai, Z.R., Abdullah, A., Mutalib, S.A., 2013. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *J. Med. Plants Res.* 6. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5116>
- Adham, A.N., Naqishbandi, A.M., 2015. HPLC analysis and antidiabetic effect of *Rheum ribes* root in type 2 diabetic patients. *Zanco J. Med. Sci.* Zanco J Med Sci 19, 957–964.
- Alaadin, A.M., Al-Khateeb, E.H., Jäger, A.K., 2007. Antibacterial activity of the Iraqi *Rheum ribes*. Root. *Pharm. Biol.* 45, 688–690.
- Alan, Y., Erbil, N., Digrak, M., 2012. In vivo antimicrobial activity of *Rheum ribes* extracts obtained from various plant parts from Turkey. *JOSUNAS* 1, 23–29.
- Albitar, N., Mounir, S., Besombes, C., Allaf, K., 2011. Improving the Drying of Onion Using the Instant Controlled Pressure Drop Technology. *Dry. Technol.* 29, 993–1001. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.507912>

- Alkaya, D.B., Seyhan, S.A., Ozturk, B.N., 2019. Influence of extraction method on antioxidant properties of Rheum ribes root extract. *Ovidius Univ. Ann. Chem.* 30, 44–47. <https://doi.org/10.2478/auoc-2019-0008>
- Al-Khatib, B., Hijazi, A., Hareb, N., Diab-Assaf, M., Karaky, R., 2022. Anticancer effect of different rhizome extracts of the Lebanese Rheum ribes L. species on colorectal cancer cell lines. *Phytomedicine Plus* 2, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100321>
- Allaf, K., Besombes, C., Berka, B., Kristiawan, M., Sobolik, V., Allaf, T., 2011. Instant Controlled Pressure Drop Technology in Plant Extraction Processes, in: *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, Contemporary Food Engineering*. CRC Press, pp. 255–302. <https://doi.org/10.1201/b11241-10>
- Allaf, K., Cioffi, F., Rezzoug, S., Contento, M., Louka, N., Sanya, E., 1997. Procédé de traitement en vue de sécher, conserver, préserver, restaurer ou consolider le bois naturel, détérioré ou gorgé d'eau, et installation pour la mise en œuvre d'un tel procédé. 97 14513.
- Allaf, K., Louka, N., Bouvier, J., Parent, F., Forget, M., 1993. Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés. 93 09720.
- Allaf, K., Louka, N., BOUVIER, J.-M., Parent, F., Forget, M., 1992. Définition d'un nouveau procédé de traitementthermo-mécanique par détente instantanée contrôlée TTMDIC. 92 04940.
- Allaf, T., Allaf, K., 2016. *Instant controlled pressure drop (DIC) in food processing*. Springer.
- Allaf, T., Zougali, B.B., Van Nguyen, C., Negm, M., Allaf, K., 2014. DIC Texturing for Solvent Extraction, in: Allaf, T., Allaf, K. (Eds.), *Instant Controlled Pressure Drop (D.I.C.) in Food Processing: From Fundamental to Industrial Applications*, Food Engineering Series. Springer, New York, NY, pp. 127–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8669-5_7

- Almajano, M.P., Carbo, R., Delgado, M.E., Gordon, M.H., 2007. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J. Food Sci.* 72, C258–C263.
- Alonzo-Macías, M., Cardador-Martínez, A., Mounir, S., Montejano-Gaitán, G., Allaf, K., 2013. Comparative Study of the Effects of Drying Methods on Antioxidant Activity of Dried Strawberry (*Fragaria* Var. *Camarosa*). *J. Food Res.* 2, 92. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n2p92>
- Alsudani, A.A., Mohammed, G.J., Raheem Lateef Al-Awsi, G., 2019. In vitro, the Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts on the growth of some bacterial and fungal pathogens. *J. Phys. Conf. Ser.* 1294, 062099. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/6/062099>
- Amiri, N., Shafaghat, A., Salimi, F., 2015. Screening of the Essential Oil, Hexane Extract, Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Antimicrobial Activity of the Flower *Rheum ribes* L. from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 18, 1108–1115. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.884763>
- Anantharaju, P.G., Gowda, P.C., Vimalambike, M.G., Madhunapantula, S.V., 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.* 15, 99. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0217-2>
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., Ocak, E., Senol, K., 2009. Some Chemical Characteristics of Edible Wild Rhubarb Species (*Rheum ribes* L.). *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5.
- Angell, C.A., 2002. Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions. *Chem. Rev.* 102, 2627–2650. <https://doi.org/10.1021/cr000689q>
- Antony, J., 2014a. Case Studies, in: *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier, pp. 125–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099417-8.00009-2>
- Antony, J., 2014b. A Systematic Methodology for Design of Experiments, in: *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier, pp. 33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099417-8.00004-3>
- Arapitsas, P., Turner, C., 2008. Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta* 74, 1218–1223. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.029>

- Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N., 2019. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* 8, 96. <https://doi.org/10.3390/plants8040096>
- Aygün, A., Gülbağça, F., Nas, M.S., Alma, M.H., Çalimli, M.H., Ustaoglu, B., Altunoglu, Y.C., Baloğlu, M.C., Cellat, K., Şen, F., 2020. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Rheum ribes* and evaluation of their anticarcinogenic and antimicrobial potential: A novel approach in phytonanotechnology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 179, 113012. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113012>
- Azadpour, M., Farajollahi, M.M., Varzi, A.M., Hadipour, F., Barati, M., 2020. The evaluation of cytotoxicity effects of *Rheum ribes* L. (rubarb) extract on cancer cell lines and its antibacterial and mutagenicity activity. *Entomol. Appl. Sci. Lett.* 7.
- Babak, N., Reza, I.M., Ali, S., 2012. Effects of *Rheum rebis* Extract on the Blood Parameters and Responses of *Rutilus frisii kutum* under Heat Stress. *Glob. Vet.* 3, 222–228.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Sandhu, S.K., Bhargav, V.K., 2014. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J. Food Sci. Technol.* 51, 2568–2575. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0754-4>
- Bagheri, N., Safaei, N., Alebrahim-Dehkordy, E., Khaledi, M., Madmoli, M., Ansari-pour, S., 2019. In vitro antibacterial activity of *Bunium persicum* and *Rheum ribes* on *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Ayurvedic Med.* 10, 47–51. <https://doi.org/10.47552/ijam.v10i1.1220>
- Bai, L., Takagi, S., Ando, T., Yoneyama, H., Ito, K., Mizugai, H., Isogai, E., 2016. Antimicrobial activity of tea catechin against canine oral bacteria and the functional mechanisms. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 1439–1445. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0198>
- Bakir, A., Ekin, S., Yüksek, S., Oto, G., 2022. The Protective Effect of *Rheum Ribes* L., and Quercetin on Protein Carbonyl Levels Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver and Kidney Damage in the Rats. *Clin. Exp. Health Sci.* <https://doi.org/10.33808/clinexphealthsci.943255>

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Banerjee, S., Bueso-Ramos, C., Aggarwal, B.B., 2002. Suppression of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Carcinogenesis in Rats by Resveratrol: Role of Nuclear Factor-B, Cyclooxygenase 2, and Matrix Metalloprotease 9. *Cancer Res.* 62, 10.
- Barreca, D., Trombetta, D., Smeriglio, A., Mandalari, G., Romeo, O., Felice, M.R., Gattuso, G., Nabavi, S.M., 2021. Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends Food Sci. Technol.* 117, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.030>
- Bazzaz, B.S.F., Khajehkaramadin, M., Shokoheizadeh, H.R., 2005. In Vitro Antibacterial Activity of Rheum ribes Extract Obtained from Various Plant Parts Against Clinical Isolates of Gram-Negative Pathogens. *Iran. J. Pharm. Res.* 2, 5.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D., 2018. 1 - Overview of polyphenols and their properties, in: Galanakis, C.M. (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, pp. 3–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Ben Amor, B., Allaf, K., 2009. Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Food Chem.* 115, 820–825. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.094>
- Ben Amor, B., Lamy, C., Andre, P., Allaf, K., 2008. Effect of instant controlled pressure drop treatments on the oligosaccharides extractability and microstructure of *Tephrosia purpurea* seeds. *J. Chromatogr. A* 1213, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.065>
- Ben Ghezala, H., Chaouali, N., Gana, I., Snouda, S., Nouioui, A., Belwaer, I., Ouali, J., Kaddour, M., Masri, W., Ben Salah, D., Amira, D., Ghorbal, H., Hedhili, A., 2015. Toxic Effects of *Rhamnus alaternus*: A Rare Case Report. *Case Rep. Emerg. Med.* 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/182951>

- Berka-Zougali, B., Hassani, A., Besombes, C., Allaf, K., 2010. Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology. *J. Chromatogr. A* 1217, 6134–6142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.080>
- Bhat, K.P.L., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 2001. Estrogenic and Antiestrogenic Properties of Resveratrol in Mammary Tumor Models 8.
- Bonjar, G.S., 2004. Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. *Asian J. Plant Sci.*
- Borges, A., José, H., Homem, V., Simões, M., 2020. Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics* 9, 48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020048>
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F.O., Natali, P.G., Brunetti, M., Aiello, F.B., Piantelli, M., 2000. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 87, 595–600.
- Carter, L.G., D’Orazio, J.A., Pearson, K.J., 2014. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr. Relat. Cancer* 21, R209–R225. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0171>
- Cellini, L., Di Bartolomeo, S., Di Campli, E., Genovese, S., Locatelli, M., Di Giulio, M., 2014. In vitro activity of Aloe vera inner gel against *Helicobacter pylori* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 43–48. <https://doi.org/10.1111/lam.12241>
- Cha, T.-L., Qiu, L., Chen, C.-T., Wen, Y., Hung, M.-C., 2005. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Cancer Res.* 65, 2287–2295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3250>
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C., Charbonnel, C., Chekir, L., Ghoul, M., 2017. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Preserv.* 41, e13203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>

- Chakraborty, S., Gautam, S.P., Das, P.P., Hazarika, M.K., 2019. Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Treatment for Improving Process Performance and Milled Rice Quality. *J. Inst. Eng. India Ser. A* 100, 683–695. <https://doi.org/10.1007/s40030-019-00403-w>
- Chan, T.C., Chang, C.J., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., 1993. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 1152–1158. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1746>
- Chandrasekara, A., 2019. Phenolic Acids, in: Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*. Academic Press, Oxford, pp. 535–545. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22395-0>
- Chang, C.J., Ashendel, C.L., Geahlen, R.L., McLaughlin, J.L., Waters, D.J., 1996. Oncogene signal transduction inhibitors from medicinal plants. *Vivo Athens Greece* 10, 185–190.
- Chang, H., Mi, M.-T., Gu, Y.-Y., Yuan, J.-L., Ling, W.-H., Lin, H., 2007. Effects of flavonoids with different structures on proliferation of leukemia cell line HL-60. *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer* 26, 1309–1314.
- Chaudhary, A., Willett, K.L., 2006. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology* 217, 194–205.
- Chen, H.C., Hsieh, W.T., Chang, W.C., Chung, J.G., 2004. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 42, 1251–1257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.03.002>
- Cheng, Y., Xu, Q., Liu, J., Zhao, C., Xue, F., Zhao, Y., 2014. Decomposition of five phenolic compounds in high temperature water. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 2102–2107.
- Chiang, E.-P.I., Tsai, S.-Y., Kuo, Y.-H., Pai, M.-H., Chiu, H.-L., Rodriguez, R.L., Tang, F.-Y., 2014. Caffeic Acid Derivatives Inhibit the Growth of Colon Cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK Signaling Pathways. *PLoS ONE* 9, e99631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099631>

- Cho, W.-Y., Kim, D.-H., Lee, H.-J., Yeon, S.-J., Lee, C.-H., 2020. Journal of Food Quality Evaluation of Effect of Extraction Solvent on Selected Properties of Olive Leaf Extract. *J. Food Qual.* 2020, e3013649. <https://doi.org/10.1155/2020/3013649>
- Cichewicz, R.H., Zhang, Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., 2004. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies. *Life Sci.* 74, 1791–1799. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.08.034>
- Çınar Ayan, İ., Çetinkaya, S., Dursun, H.G., Süntar, İ., 2021. Bioactive Compounds of *Rheum ribes* L. and its Anticancerogenic Effect via Induction of Apoptosis and miR-200 Family Expression in Human Colorectal Cancer Cells. *Nutr. Cancer* 73, 1228–1243. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1792947>
- Cos, P., Bruyne, T.D., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J., 2004. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr. Med. Chem.* 11, 1345–1359.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1001. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- D Catarino, M., M Alves-Silva, J., R Pereira, O., M Cardoso, S., 2015. Antioxidant capacities of flavones and benefits in oxidative-stress related diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 105–119.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Darsanaki, R.K., Lisar, M.P., 2014. Antimicrobial Potential of Root, Stalk and Leaves Extracts of. *J. Rep. Pharm. Sci.* 3, 4.
- Dastidar, S., manna, A., Asok kumar, K., 2004. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.06.003>

- De Filippis, B., Ammazalorso, A., Fantacuzzi, M., Giampietro, L., Maccallini, C., Amoroso, R., 2017. Anticancer Activity of Stilbene-Based Derivatives. *ChemMedChem* 12, 558–570. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700045>
- De Villiers, A., Lestremau, F., Szucs, R., Gélébart, S., David, F., Sandra, P., 2006. Evaluation of ultra performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1127, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.071>
- Demiray, H., Estep, A.S., Tabanca, N., Becnel, J.J., Demirci, B., 2022. Chemical Constituents from *Rheum ribes* Shoots and its Insecticidal Activity Against *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 32, 81–85.
- Diaz-Muñoz, G., Miranda, I.L., Sartori, S.K., de Rezende, D.C., Diaz, M.A.N., 2018. Anthraquinones: An Overview, in: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 313–338. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00011-8>
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* 22, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- dos Santos, J.F.S., Tintino, S.R., de Freitas, T.S., Campina, F.F., de A. Menezes, I.R., Siqueira-Júnior, J.P., Coutinho, H.D.M., Cunha, F.A.B., 2018. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001>
- Dutta, S., Mahalanobish, S., Sil, P.C., 2021. Chapter 8 - Phytoestrogens as Novel Therapeutic Molecules Against Breast Cancer, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products*, *Natural Product Drug Discovery*. Elsevier, pp. 197–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821277-6.00008-8>
- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., Lesellier, E., 2016. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind. Crops Prod.* 94, 812–833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.056>

- Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Pharmacol.* 4, 177. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- Elaydi, K., Kamal, I., Bedoui, A., Elaloui, E., Allaf, K., 2014. Intensification of the Solvent Extraction of *Rhus tripartitum* Bioactive Molecules Using Instant Controlled Pressure Drop (DIC). *Br. J. Appl. Sci. Technol.* 4, 1576–1593.
- Emen Tanrikut, S., Çeken, B., Altaş, S., Pirinççioğlu, M., Kizil, G., Kizil, M., 2013. DNA cleavage protecting activity and in vitro antioxidant potential of aqueous extract from fresh stems of *Rheum ribes*. *Acta Aliment.* 42, 461–472. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.4.1>
- Emeraux, E., 2019. Propriétés biologiques des flavonoïdes: étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante.
- Engin, M.S., Kalkan, S., Cay, S., Güder, A., Otag, M.R., Gür, G., Kablan, A., 2018. DPPH Radical Scavenging, Phenolic and Antimicrobial Activity of *Momordica charantia* and *Rheum ribes*.
- Erecevit, P., Kırbağ, S., 2017. Determination of some biological properties over *Kluyveromyces lactis* 1 of *Rheum ribes* L. (Rhubarb) as a traditional medicinal and food plant. *Int. J. Nat. Life Sci.* 1, 10.
- Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* 24, 851–874. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>
- Esmailbeig, M., Kouhpayeh, S.A., Amirghofran, Z., 2015. An investigation of the growth inhibitory capacity of several medicinal plants from Iran on tumor cell lines. *Iran. J. Cancer Prev.* 8.
- Floridi, A., Gentile, P.F., Bruno, T., Fanciulli, M., Paggi, M.G., Zeuli, M., Benassi, M., 1991. Cytotoxic effect of the association of BCNU with rhein or lonidamine on a human glioma cell line. *Anticancer Res.* 11, 789–792.
- Fosso, M.Y., Chan, K.Y., Gregory, R., Chang, C.-W.T., 2012. Library Synthesis and Antibacterial Investigation of Cationic Anthraquinone Analogs. *ACS Comb. Sci.* 14, 231–235. <https://doi.org/10.1021/co2002075>

- Frydoonfar, H.R., McGrath, D.R., Spigelman, A.D., 2003. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin. *Colorectal Dis.* 5, 149–152. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1318.2003.00444.x>
- Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G.A., Gekas, V., 2013. A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *Int. J. Food Prop.* 16, 382–396. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>
- Gao, K., Henning, S., Niu, Y., Youssefian, A., Seeram, N., Xu, A., Heber, D., 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 17, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.009>
- Gendaram, O., Choi, Y.-H., Kim, Y.-S., Ryu, S.-Y., 2011. Anti-oxidative and antibacterial constituents from *Sedum hybridum*. *Nat. Prod. Sci.* 17, 279–284.
- Godwin, A., Akinpelu, B., Makinde, A., Aderogba, M., Oyedapo, O., 2015. Identification of n-Hexane Fraction Constituents of *Archidium ohioense* (Schimp. ex Mull) Extract Using GC-MS Technique. *Br. J. Pharm. Res.* 6, 366–375. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2015/13590>
- Gonçalves, A.C., Bento, C., Jesus, F., Alves, G., Silva, L.R., 2018. Sweet Cherry Phenolic Compounds: Identification, Characterization, and Health Benefits, in: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp. 31–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00002-5>
- Gordon, M., Taylor, J.S., 1952. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *J. Appl. Chem.* 2, 493–500. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010020901>
- Goupy, J., Creighton, L., 2006. *Introduction aux plans d'expériences*, 3e éd. ed, Technique et ingénierie. Dunod "L'Usine nouvelle," Paris.
- Grippi, F., Crosta, L., Aiello, G., Tolomeo, M., Oliveri, F., Gebbia, N., Curione, A., 2008. Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.07.079>

- Guilbert, S., 2002. Les protéines végétales. Société Chim. Fr. <https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/2002-nov-dec-258-259-NT7-Guilbert.pdf>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S.A., 2013. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* 76, 1365–1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Haddad, J., Juhel, F., Louka, N., Allaf, K., 2004. A Study of Dehydration of Fish Using Successive Pressure Drops (DDS) and Controlled Instantaneous Pressure Drop (DIC). *Dry. Technol.* 22, 457–478. <https://doi.org/10.1081/DRT-120029993>
- Hamzeh, S., Farokhi, F., Heydari, R., Manaffar, R., 2014. Renoprotective effect of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* root in diabetic female rats. *Avicenna J. Phytomedicine* 4, 10.
- Hanuka Katz, I., Eran Nagar, E., Okun, Z., Shpigelman, A., 2020. The Link between Polyphenol Structure, Antioxidant Capacity and Shelf-Life Stability in the Presence of Fructose and Ascorbic Acid. *Molecules* 25, 225. <https://doi.org/10.3390/molecules25010225>
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Harvey, D.J., 2018. Mass Spectrometry—Ionization Methods Overview, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, p. B9780124095472142000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14221-0>
- Hauy, Faujas-Saint-Fond, Brongniart, Desfontaines, Jussieu, Geoffroy, Lacépède, Lamarck, 1803. *Annales du Muséum national d'histoire naturelle*.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67–202.
- Hishe, M., Asfaw, Z., Giday, M., 2016. Review on value chain analysis of medicinal plants and the associated challenges.

- Hmid, I., 2013. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade Marocaine (*Punica Granatum L.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais (phdthesis). Université d'Angers.
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H.-M., Chung, M.C.M., Ong, C.N., 2007. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.* 27, 609–630. <https://doi.org/10.1002/med.20094>
- Iguedjal, T., Louka, N., Allaf, K., 2008. Sorption isotherms of potato slices dried and texturized by controlled sudden decompression. *J. Food Eng.* 85, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.028>
- Imran, M., Aslam Gondal, T., Atif, M., Shahbaz, M., Batool Qaisarani, T., Hanif Mughal, M., Salehi, B., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., 2020. Apigenin as an anticancer agent. *Phytother. Res.* 34, 1812–1828. <https://doi.org/10.1002/ptr.6647>
- Issaadi-Hamitouche, T., 2016. Etude de l'autovaporisation instantanée dans l'intensification de l'extraction de l'huile essentielle du bois de santal. La Rochelle Université.
- Jablaoui, C., 2018. La texturation par détente instantanée contrôlée DIC dans les développements de nouvelles opérations d'extraction d'huiles des graines oléagineuses (These de doctorat). La Rochelle.
- Jaganathan, S.K., 2012. Growth Inhibition by Caffeic Acid, One of the Phenolic Constituents of Honey, in HCT 15 Colon Cancer Cells. *Sci. World J.* 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1100/2012/372345>
- Jalill, D.R.D. Abdul, Hussein, M.F., Al-Shammari, D.A.M., 2015. GC/MS ANALYSIS OF RHEUM RIBES RHIZOMES. *Mintage J. Pharm. Med. Sci.* ISSN 2320-3315 29–34.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Önning, G., Åkesson, B., Cirenajwis, H.M., Oredsson, S.M., 2011. The Antiproliferative Effect of Dietary Fiber Phenolic Compounds Ferulic Acid and *p*-Coumaric Acid on the Cell Cycle of Caco-2 Cells. *Nutr. Cancer* 63, 611–622. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.538486>
- Janicke, B., Önning, G., Oredsson, S.M., 2005. Differential Effects of Ferulic Acid and *p*-Coumaric Acid on S Phase Distribution and Length of S Phase in the Human Colonic

- Cell Line Caco-2. J. Agric. Food Chem. 53, 6658–6665.
<https://doi.org/10.1021/jf0504891>
- Jayaprakasam, B., Vanisree, M., Zhang, Y., Dewitt, D.L., Nair, M.G., 2006. Impact of Alkyl Esters of Caffeic and Ferulic Acids on Tumor Cell Proliferation, Cyclooxygenase Enzyme, and Lipid Peroxidation. J. Agric. Food Chem. 54, 5375–5381.
<https://doi.org/10.1021/jf060899p>
- Jeon, J., Kim, J.H., Lee, C.K., Oh, C.H., Song, H.J., 2014. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. Ann. Dermatol. 26, 564.
<https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.5.564>
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., Čavar Zeljković, S., 2021. Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two Achillea Species. Molecules 26, 1601. <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>
- Kaithwas, G., Kumar, A., Pandey, H., Acharya, A.K., Singh, M., Bhatia, D., Mukerjee, A., 2008. Investigation of comparative antimicrobial activity of Aloe Vera gel and juice 5.
- Kamal, I., Allaf, K., 2013. Optimization of Instant Controlled Pressure Drop Dic-Assisted-Solvent Extraction of Total Phenols of Green Coffee Beans. J. Food Stud. 2, 42–61.
- Kamal, I., Elaydi, K., Bedoui, A., Allaf, K., 2015. Innovative Process of Texturing-Assisted Solvent Extraction: Impacts on Polyphenols, flavonoids, Tannins and Antioxidant of Henna. Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng. 5, 403–416.
- Kasabri, V., Abu-Dahab, R., Afifi, F.U., Naffa, R., Majdalawi, L., Shawash, H., 2012. In vitro Modulation of Pancreatic MIN6 Insulin Secretion and Proliferation and Extrapancreatic Glucose Absorption by Paronychia argentea, Rheum ribes and Teucrium polium Extracts. Jordan J. Pharm. Sci. 5, 18.
- Kaur, S., 2014. Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. J. Microbiol. Exp. 1.
<https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00005>
- Kedare, S.B., Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J. Food Sci. Technol. 48, 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

- Keça, M., Miklasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R.D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., Wąsik, T.J., 2018. Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against “Staphylococcus aureus” Clinical Strains. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>
- Keser, S., Keser, F., Karatepe, M., Kaygili, O., Tekin, S., Turkoglu, I., Demir, E., Yilmaz, O., Kırbağ, S., Sandal, S., 2019. Bioactive contents, In vitro antiradical, antimicrobial and cytotoxic properties of rhubarb (*Rheum ribes* L.) extracts. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1560294>
- Khiveh, A., Hashempur, M.H., Shakiba, M., Lotfi, M.H., Shakeri, A., Kazemeini, S., Mousavi, Z., Jabbari, M., Kamalinejad, M., Emtiazy, M., 2017. Effects of rhubarb (*Rheum ribes* L.) syrup on dysenteric diarrhea in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Integr. Med.* 15, 365–372. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(17\)60344-3](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(17)60344-3)
- Kirmit, A., Takim, K., Durmuş, E., Güler, E.M., Yenigün, V.B., Bulut, H., Koçyiğit, A., 2020. *Rheum Ribes* L.’nin etanol ekstraterinin malign melanoma hücreleri üzerine anti-kanser etkinliğinin araştırılması. *J. Health Sci. Med.* 3, 148–152. <https://doi.org/10.32322/jhsm.689150>
- Kitao, S., Teramoto, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., 2006. Stabilizing effect of grape seed extract on ascorbic acid. *Food Sci. Technol. Res.* 12, 15–21.
- Ko, C.-H., Shen, S.-C., Lee, T.J., Chen, Y.-C., 2005. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 4, 281–290.
- Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R., 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 10, 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., Kašparovský, T., 2019. Isoflavones. *Molecules* 24, 1076. <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>

- Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S.K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., 2019. Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnol. Res. Innov.* 3, 1–21.
- Kuo, P.-L., Hsu, Y.-L., Ng, L.T., Lin, C.-C., 2004. Rhein inhibits the growth and induces the apoptosis of Hep G2 cells. *Planta Med.* 70, 12–16.
- Kuo, P.-L., Lin, T.-C., Lin, C.-C., 2002. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci.* 71, 1879–1892. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01900-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01900-8)
- Kurzer, M.S., Xu, X., 1997. DIETARY PHYTOESTROGENS. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 353–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.353>
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16, 1193–1196.
- Lea, M.A., 2015. Flavonol Regulation in Tumor Cells: FLAVONOL REGULATION in TUMOR CELLS. *J. Cell. Biochem.* 116, 1190–1194. <https://doi.org/10.1002/jcb.25098>
- Lee, H.Z., Hsu, S.L., Liu, M.C., Wu, C.H., 2001. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur. J. Pharmacol.* 431, 287–295. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01467-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01467-4)
- Lentini, A., Forni, C., Provenzano, B., Beninati, S., 2007. Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. *Amino Acids* 32, 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0304-3>
- Li, X., Bi, J., Chen, Q., Jin, X., Wu, X., Zhou, M., 2019. Texture improvement and deformation inhibition of hot air-dried apple cubes via osmotic pretreatment coupled with instant control pressure drop (DIC). *LWT* 101, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.035>
- Li, Xiao, Bi, J., Jin, X., Li, Xuan, Zhao, Y., Song, Y., 2020. Effect of pectin osmosis or degradation on the water migration and texture properties of apple cube dried by instant controlled pressure drop drying (DIC). *LWT* 125, 109202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109202>

- Li, Xiao, Bi, J., Jin, X., Lyu, J., Wu, X., Li, B., Li, Xuan, 2021. Study on the mechanism of volume expansion and texture formation of apple cube dried by instant controlled pressure drop drying (DIC). *J. Food Eng.* 293, 110379. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110379>
- Liang, N., Kitts, D., 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* 19, 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Liao, A.C.H., Kuo, C.-C., Huang, Y.-C., Yeh, C.-W., Hseu, Y.-C., Liu, J.-Y., Hsu, L.-S., 2014. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP-2. *Mol. Med. Rep.* 10, 1531–1536. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2375>
- Liu, J., Sandahl, M., Sjöberg, P.J.R., Turner, C., 2014. Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 441–445. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7370-7>
- Liu, M., Peng, W., Qin, R., Yan, Z., Cen, Y., Zheng, X., Pan, X., Jiang, W., Li, B., Li, X., 2015. The direct anti-MRSA effect of emodin via damaging cell membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7699–7709.
- Liu, Z., 2008. Preparation of Botanical Samples for Biomedical Research. *Endocrine, Metab. Immune Disord.-Drug Targets* 8, 112–121. <https://doi.org/10.2174/187153008784534358>
- Lohvina, H., Sándor, M., Wink, M., 2022. Effect of Ethanol Solvents on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Seed Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Varieties and Determination of Phenolic Composition by HPLC-ESI-MS. *Diversity* 14, 7. <https://doi.org/10.3390/d14010007>
- Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., Rashed, K., Menichini, Federica, Frega, N.G., Menichini, Francesco, 2009. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 264–270.
- Louati, I., Bahloul, N., Besombes, C., Allaf, K., Kechaou, N., 2019. Instant controlled pressure-drop as texturing pretreatment for intensifying both final drying stage and

- extraction of phenolic compounds to valorize orange industry by-products (*Citrus sinensis* L.). *Food Bioprod. Process.* 114, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.11.012>
- Louka, N., Allaf, K., 2004. Expansion ratio and color improvement of dried vegetables texturized by a new process “Controlled Sudden Decompression to the vacuum”: Application to potatoes, carrots and onions. *J. Food Eng.* 65, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.020>
- Louka, N., Juhel, F., Allaf, K., 2004. Quality studies on various types of partially dried vegetables texturized by Controlled Sudden Decompression: General patterns for the variation of the expansion ratio. *J. Food Eng.* 65, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.021>
- Maache-Rezzoug, Z., Zarguili, I., Loisel, C., Doublier, J.-L., 2010. Study of DIC hydrothermal treatment effect on rheological properties of standard maize (SMS), waxy maize (WMS), wheat (WTS) and potato (PTS) starches. *J. Food Eng., CHISA 2008 – Symposium Food Processing and Technology* 99, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.052>
- Maache-Rezzoug, Z., Zarguili, I., Loisel, C., Queveau, D., Buléon, A., 2008. Structural modifications and thermal transitions of standard maize starch after DIC hydrothermal treatment. *Carbohydr. Polym.* 74, 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.047>
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>
- Majumdar, A.P.N., Banerjee, S., Nautiyal, J., Patel, B.B., Patel, V., Du, J., Yu, Y., Elliott, A.A., Levi, E., Sarkar, F.H., 2009. Curcumin Synergizes With Resveratrol to Inhibit Colon Cancer. *Nutr. Cancer* 61, 544–553. <https://doi.org/10.1080/01635580902752262>
- Malik, E.M., Müller, C.E., 2016. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs: ANTHRAQUINONES AS PHARMACOLOGICAL TOOLS AND DRUGS. *Med. Res. Rev.* 36, 705–748. <https://doi.org/10.1002/med.21391>

- Malmir, M., Ferreira, E., Serrano, R., Gomes, E.T., Caniça, M., Silva, O., 2015. In vitro anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of *Senna podocarpa* root extracts. *Ind. Crops Prod.* 76, 467–471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.022>
- Malmir, M., Serrano, R., Silva, O., 2017. Anthraquinones as potential antimicrobial agents- A review. pp. 55–61.
- Malta, L.G., Liu, R.H., 2014. Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements, in: Van Alfen, N.K. (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Academic Press, Oxford, pp. 305–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9>
- Maranata, G.J., Surya, N.O., Hasanah, A.N., 2021. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. *Heliyon* 7, e05934. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05934>
- Master, Z., Chaudhary, A., Sutter, T.R., Willett, K.L., 2012. Effects of flavonoids on CYP1 expression in RL95-2 endometrial carcinoma cells. *Food Chem.* 133, 912–922.
- Mata, R., 2007. *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications* By ØM Andersen (University of Bergen). ACS Publications.
- McMahon, G., 2021. *How a Mass Spectrometer Works, Types of Instrumentation and Interpreting Mass Spectral Data* 19.
- Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 326S-329S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.326S>
- Messina, M., Hilakivi-Clarke, L., 2009. Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutr. Cancer* 61, 792–798. <https://doi.org/10.1080/01635580903285015>
- Messina, M., Kucuk, O., Lampe, J.W., 2006. An overview of the health effects of isoflavones with an emphasis on prostate cancer risk and prostate-specific antigen levels. *J. AOAC Int.* 89, 1121–1134.
- Meydan, I., Burhan, H., Gür, T., Seçkin, H., Tanhaei, B., Sen, F., 2022. Characterization of *Rheum ribes* with ZnO nanoparticle and its antidiabetic, antibacterial, DNA damage

- prevention and lipid peroxidation prevention activity of in vitro. *Environ. Res.* 204, 112363.
- Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 3418–3423. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.014>
- Mkaouar, S., Bahloul, N., Gelicus, A., Allaf, K., Kechaou, N., 2015. Instant controlled pressure drop texturing for intensifying ethanol solvent extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols. *Sep. Purif. Technol.* 145, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.014>
- Mohammed, E.A., Abdalla, I.G., Alfawaz, M.A., Mohammed, M.A., Al Maiman, S.A., Osman, M.A., Yagoub, A.E.A., Hassan, A.B., 2022. Effects of Extraction Solvents on the Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity in the Aerial Part of Root Vegetables. *Agriculture* 12, 1820. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111820>
- Mohammed, I., Kakey, E., Farimani, M., 2019. In Vitro Evaluation of Antioxidant Activates for Parts of Rhubarb (*Rheum ribes*) and Syrian Mesquite (*Prosopis farcta*). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25928.78087>
- Morales, P., Haza, A.I., 2012. Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* 32, 986–993.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., 1988. Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells. *Phytochemistry* 27, 1017–1020.
- Mounir, S., 2015. Texturing of Chicken Breast Meat as an Innovative Way to Intensify Drying: Use of a Coupled Washing/Diffusion CWD Phenomenological Model to Enhance Kinetics and Functional Properties. *Dry. Technol.* 33, 1369–1381. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1030029>
- Mounir, S., 2007. Etude de nouveaux procédés de fabrication de poudres par insertion de la technologie de Détente Instantanée Controlée DIC, dans les processus d'atomisation, de séchage/texturation et de pulvérisation controlée sous vide de produits laitiers. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4186.7920>

- Mounir, S., Allaf, T., Berka, B., Hassani, A., Allaf, K., 2014. Instant Controlled Pressure Drop technology: From a new fundamental approach of instantaneous transitory thermodynamics to large industrial applications on high performance–high controlled quality unit operations. *Comptes Rendus Chim.* 17, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.10.019>
- Mounir, S., Amami, E., Allaf, T., Mujumdar, A., Allaf, K., 2020. Instant controlled pressure drop (DIC) coupled to intermittent microwave/airflow drying to produce shrimp snacks: Process performance and quality attributes. *Dry. Technol.* 38, 695–711. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1694537>
- Mounir, S., Besombes, C., Al-Bitar, N., Allaf, K., 2011. Study of Instant Controlled Pressure Drop DIC Treatment in Manufacturing Snack and Expanded Granule Powder of Apple and Onion. *Dry. Technol.* 29, 331–341. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.491585>
- Mounir, S., Schuck, P., Allaf, K., 2010. Structure and attribute modifications of spray-dried skim milk powder treated by DIC (instant controlled pressure drop) technology. *Dairy Sci. Technol.* 90, 301–320. <https://doi.org/10.1051/dst/2010008>
- Moutèrde, P., 1966. *Nouvelle flore du Liban et de la Syrie* / Paul Mouterde. Dar El-Machreq Editeurs Imprimerie catholique, Beyrouth.
- Naqishbandi, A.M., Josefsen, K., Pedersen, M.E., Jäger, A.K., 2009. Hypoglycemic activity of Iraqi Rheum ribes root extract. *Pharm. Biol.* 47, 380–383. <https://doi.org/10.1080/13880200902748478>
- Nasr Bouzaiene, N., Kilani Jaziri, S., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J., 2015. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 766, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044>
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A., Sayeed, S.A., 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *J. Food Sci.* 72, M341–M345.
- Ngo, T.V., Scarlett, C.J., Bowyer, M.C., Ngo, P.D., Vuong, Q.V., 2017. Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *J. Food Qual.* 2017.

- Nguyen, T.H., Lanoisellé, J., Allaf, K., 2014. Effect of Instant Controlled Pressure Drop DIC Treatment on the properties of dried carrot.
- Nickavar, B., Kamalinejad, M., Izadpanah, H., 2007. In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pak. J. Pharm. Sci.* 20, 291–294.
- Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., Terao, J., 2011. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 3, 1332–62.
- Noori, S., Kiasat, A.R., Kolahi, M., Mirzajani, R., Nejad, S.M.S., 2022. Determination of secondary metabolites including curcumin in *Rheum ribes* L. and surveying of its antioxidant and anticancer activity. *J. Saudi Chem. Soc.* 26, 101479.
- Obaid, H.H., Tawfeeq, H.K., Khalaf, Z.Z., Shafeeq, Z.S., 2016. Inhibitory effect of rhizomes methanolic extracts of *Rheum ribes* and TiO₂ NPs on *Escherichia coli*. *Int. J. Sci. Basic Appl. Res. IJSBAR* 30, 262–275.
- Oktay, M., Yildirim, A., Bilalo, V., Gülçin, I., 2007. Antioxidant Activity of Different Parts of Isgin (*Rheum ribes* L.). *Asian J. Res. Chem.* 10.
- Oloumi, H., 2011. Study the correlation between some climate parameters and the content of phenolic compounds in roots of *Glycyrrhiza glabra*. *J. Med. Plant Res.* 5, 6011. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.666>
- Önem, E., Sarisu, H.C., Ibrahim, B., 2020. The Effect of *Rheum ribes* L. Extracts on Bacterial Communication and Antibacterial Activity 7.
- Ozbek, H., Ceylan, E., Kara, M., Ozgokce, F., Koyuncu, M., 2004. Hypoglycemic effect of *Rheum ribes* roots in alloxan induced diabetic and normal mice. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 31, 113–115.
- Özçelik, B., Kartal, M., Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* 49, 396–402. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M.E., Topçu, G., 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.* 103, 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.005>

- Pandith, S.A., Khan, M.I., 2022. Genus Rheum (Polygonaceae): A Global Perspective. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780429340390>
- Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J.A., Domingues, F., 2010. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1533–1538. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0325-7>
- Pech-Almeida, J.L., Téllez-Pérez, C., Alonzo-Macías, M., Teresa-Martínez, G.D., Allaf, K., Allaf, T., Cardador-Martínez, A., 2021. An Overview on Food Applications of the Instant Controlled Pressure-Drop Technology, an Innovative High Pressure-Short Time Process. *Molecules* 26, 6519. <https://doi.org/10.3390/molecules26216519>
- Peng, J., Bi, J., Yi, J., Wu, X., Zhou, M., Lyu, J., Liu, J., 2018. Engineering Texture Properties of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Dried Carrot Chips via Modulating Osmotic Conditions. *Food Bioprocess Technol.* 11, 1674–1685. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2133-2>
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A., 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, S112–S120. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>
- Pervaiz, S., Holme, A.L., 2009. Resveratrol: Its Biologic Targets and Functional Activity. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2851–2897. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2412>
- Perveen, S., Al-Taweel, A., 2019. *Pharmacognosy: Medicinal Plants*.
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2017. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP, in: Sauer, K. (Ed.), *C-Di-GMP Signaling, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_4
- Pilatowski, I., Mounir, S., Haddad, J., Cong, D.T., Allaf, K., 2010. The Instant Controlled Pressure Drop Process as a New Post-harvesting Treatment of Paddy Rice: Impacts on Drying Kinetics and End Product Attributes. *Food Bioprocess Technol.* 3, 901–907. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0332-6>
- Qu, G.-Z., Si, C.-L., Wang, M.-H., 2006. Antioxidant constituents from *Leonurus japonicus*. *Nat. Prod. Sci.* 12, 197–200.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 586–621.
- Raafat, K., Aboul-Ela, M., El-Lakany, A., 2014. Alloxan-induced diabetic thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes* L. in mouse model. *Arch. Pharm. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0372-y>
- Ragasa, C.Y., Bacar, J.N.B., Querido, M.M.R., Tan, M.C.S., Oyong, G.G., Brkljača, R., Urban, S., 2017. Chemical Constituents of *Rheum ribes* L. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 9. <https://doi.org/10.25258/ijpapr.v9i1.8041>
- Rajkumar, V., Guha, G., Ashok Kumar, R., 2011. Antioxidant and anti-cancer potentials of *Rheum emodi* rhizome extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011.
- Rammal, H., Hussein, F., Hawraa, M., Hijazi, A., Ahmad, K., Ahmad, D., Bassam, B., 2013. Antioxidant, cytotoxic properties, and phytochemical screening of two Lebanese medicinal plants. *Int. Res. J. Pharm.* 4, 132–136. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04527>
- Ranjbar, N., Eikani, M.H., Javanmard, M., Golmohammad, F., 2016. Impact of instant controlled pressure drop on phenolic compounds extraction from pomegranate peel. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.017>
- Rodgers, E.H., Grant, M.H., 1998. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* 116, 213–228. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00092-1)
- Roe, K.D., Labuza, T.P., 2007. Glass Transition and Crystallization of Amorphous Trehalose-sucrose Mixtures 17.
- Rosa, L., Silva, N., Soares, N., Monteiro, M., Teodoro, A., 2016. Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. *J. Nutr. Food Sci.* 06. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000468>
- Roupe, K., Helms, G., Halls, S., Yáñez, J., Davies, N., 2005. Preparative enzymatic synthesis and HPLC analysis of rhapontigenin: Applications to metabolism, pharmacokinetics

- and anti-cancer studies. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.* 8, 374–86.
- Roustapour, O.R., Hosseinalipour, M., Ghobadian, B., 2006. An Experimental Investigation of Lime Juice Drying in a Pilot Plant Spray Dryer. *Dry. Technol.* 24, 181–188. <https://doi.org/10.1080/07373930600559035>
- Routray, W., Orsat, V., 2013. Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2013–2045. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_55
- Rüfer, C.E., Kulling, S.E., 2006. Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2926–2931. <https://doi.org/10.1021/jf053112o>
- Sahyoun, W., Zerrouq, F., Allaf, K., 2016. Comparative Study of Various Pre-Treatments Coupled to Vacuum Drying in Terms of Structural, Functional and Physical Properties of Carrot *DaucusCarota*. *Int. J. Eng. Res.* 2.
- Sakalli, S., Burkina, V., Pilipenko, N., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2018. In vitro effects of diosmin, naringenin, quercetin and indole-3-carbinol on fish hepatic CYP1A1 in the presence of clotrimazole and dexamethasone. *Chemosphere* 192, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.106>
- Salih, A.M., Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Tarroum, M., Khan, S., Shaikhaldein, H.O., Al-Hashimi, A., Alfagham, A., Alkahtani, J., 2021. Optimization Method for Phenolic Compounds Extraction from Medicinal Plant (*Juniperus procera*) and Phytochemicals Screening. *Molecules* 26, 7454. <https://doi.org/10.3390/molecules26247454>
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J.A., Manzano-Agugliaro, F., 2020. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 17, 3376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
- Sánchez-Aguirre, O.A., Juárez-Aguilar, E., Montoya-Hernández, E.L., Vázquez-Hernández, M., Colorado-Peralta, R., Sánchez-Medina, A., Márquez-López, M.E., Hernández-

- Romero, D., 2022. Antioxidant potential of *Cnidocolus multilobus* (Pax) I.M. Johnst and its antiproliferative and cytotoxic effect on cervical cancer cells. *Eur. J. Integr. Med.* 53, 102134. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2022.102134>
- Sánchez-Valdepeñas, V., Barrajon, E., Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Valero, M., Saura, D., 2015. Effect of instant controlled pressure drop (DIC) pre-treatment on conventional solvent extraction of phenolic compounds from grape stalk powder. *Ind. Crops Prod.* 76, 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.033>
- Sardari, S., Shokrgozar, M.A., Ghavami, G., 2009. Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts. *Toxicol. In Vitro* 23, 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.011>
- Sasadara, M.M.V., Wirawan, I.G.P., 2021. Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Bulung Sangu* (*Gracilaria* sp.) Seaweed. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 712, 012005. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/712/1/012005>
- Savitri, E.S., Holil, K., Resmisari, R.S., Syarifah, U., Munawaroh, S., 2019. Effect of extraction solvent on total phenol, total flavonoid content and antioxidant activities of extract plants *Punica granatum*, *Vitis vinifera* L, *Ficus carica* L. and *Olea europea*. Presented at the INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGY AND APPLIED SCIENCE (ICOBAS), Malang, Indonesia, p. 030034. <https://doi.org/10.1063/1.5115638>
- Sayyah, M., Boostani, H., Malayeri, A., Siahpoosh, A., 2011. Efficacy of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* L. in treatment of Obsessive compulsive disorder: A double blind clinical trial. *Journal Pharm. Biomed. Sci.* 5.
- Sayyah, M., Boostani, H., Pakseresht, S., Malayeri, A., 2009. Efficacy of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* L. in treatment of major depressive disorder. *J. Med. Plants Res.* 3, 573–575. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000550>
- sayyahi, javad, Mobaiyen, H., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran., Jafari, behboud, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran., Jafari-Sales, A., Young Researchers and Elite Club, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran., 2019. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Reum ribes* L. and *Hyssopus*

- officinalis on some standard pathogenic bacteria. *Jorjani Biomed. J.* 7, 34–44.
<https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.3.34>
- Sayyahi, J., Mobaiyen, H., Jafari, B., Jafari-Sales, A., 2019. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Reum ribes L.* and *Hyssopus officinalis* on some standard pathogenic bacteria. *Jorjani Biomed. J.* 7, 34–44.
<https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.3.34>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
<https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Schugmann, M., Foerst, P., 2022. Systematic Investigation on the Glass Transition Temperature of Binary and Ternary Sugar Mixtures and the Applicability of Gordon–Taylor and Couchman–Karasz Equation. *Foods* 11, 1679.
<https://doi.org/10.3390/foods11121679>
- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., Krishnan, U.M., 2014. Investigations on the membrane interactions of naringin and its complexes with copper and iron: implications for their cytotoxicity. *RSC Adv* 4, 46407–46417.
<https://doi.org/10.1039/C4RA08157A>
- Setyoprato, P., Fatmawati, A., Sutrisna, P.D., Savitri, E., Allaf, K., 2012. The dehydration kinetics, physical properties and nutritional content of banana textured by instantaneous controlled pressure drop: FOOD PROCESS TECHNOLOGY. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 7, 726–732. <https://doi.org/10.1002/apj.624>
- Shahi, N., Rad, E., Amin, B., 2016. Study of antioxidant activity and free radical scavenging power of *Rheum Ribes* flower extract. *J. Fundam. Appl. Sci.* 8, 1164.
<https://doi.org/10.4314/jfas.v8i3s.38>
- Shahidi, F., Yeo, J., 2018. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1573.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061573>
- Shen, Y., Zhang, R., Moore, R.J., Kim, J., Metz, T.O., Hixson, K.K., Zhao, R., Livesay, E.A., Udseth, H.R., Smith, R.D., 2005. Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with

- Chromatographic Peak Capacities of 1000–1500 and Capabilities in Proteomics and Metabolomics. *Anal. Chem.* 77, 3090–3100. <https://doi.org/10.1021/ac0483062>
- Shiomi, K., Kuriyama, I., Yoshida, H., Mizushima, Y., 2013. Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation. *Food Chem.* 139, 910–918.
- Shu, X.O., Zheng, Y., Cai, H., Gu, K., Chen, Z., Zheng, W., Lu, W., 2009. Soy food intake and breast cancer survival. *JAMA* 302, 2437–2443. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1783>
- Sim, G.-S., Lee, B.-C., Cho, H.S., Lee, J.W., Kim, Jin-Hwa, Lee, D.-H., Kim, Jin-Hui, Pyo, H.-B., Moon, D.C., Oh, K.-W., 2007. Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch. Pharm. Res.* 30, 290–298.
- Sindhu, R.K., Kumar, P., Kumar, J., Kumar, A., Arora, S., 2010. Investigation into the antiulcer of *Rheum ribes* Linn leaves extracts. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2, 4.
- Singla, R.K., Dubey, A.K., Garg, A., Sharma, R.K., Fiorino, M., Ameen, S.M., Haddad, M.A., Al-Hiary, M., 2019. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J. AOAC Int.* 102, 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Song, H.-S., Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, T.-R., Kim, H.J., Park, Y.-L., Han, Y.-H., Park, J.Y., Lee, S.M., Park, S.L., 2020. Naringenin as an antibacterial reagent controlling of biofilm formation and fatty acid metabolism in MRSA. *bioRxiv*.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 579, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>

- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 14, 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
- Swartz, D.M.E., Murphy, B.J., 2004. Ultra performance liquid chromatography: tomorrow's HPLC technology today 2.
- Swartz, M.E., Murphy, B., 2005. *New Frontiers in Chromatography* 4.
- Sykes, J.E., Rankin, S.C., 2014. Chapter 3 - Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria, in: Sykes, J.E. (Ed.), *Canine and Feline Infectious Diseases*. W.B. Saunders, Saint Louis, pp. 17–28. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X>
- Szczęśniak, L., Rachocki, A., Tritt-Goc, J., 2008. Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder. *Cellulose* 15, 445–451. <https://doi.org/10.1007/s10570-007-9192-2>
- Tan, S.P., Parks, S.E., Stathopoulos, C.E., Roach, P.D., 2014. Extraction of Flavonoids from Bitter Melon. *Food Nutr. Sci.* 2014. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.55054>
- Tartik, M., Darendelioglu, E., Aykutoglu, G., Baydas, G., 2015. The various biological activities of Rheum ribes extract on different types of cell. *Turk. J. Nat. Sci.* 8.
- Taskin, T., Bulut, G., Department of Pharmaceutical Botany, Marmara University, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turkey, 2019. Qualitative and quantitative phytochemical analysis and in-vitro biological activity of Rheum ribes L. different parts. *Istanb. J. Pharm.* 49, 7–13. <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2019.18012>
- Telange, D., T. Patil, A., Tatode, A., Bhojar, B., 2014. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Kaempferol in Kaempferol: Hydrogenated Soy PhosphatidylCholine (HSPC) Complex. *Pharm. Methods* 5, 34–38. <https://doi.org/10.5530/phm.2014.1.6>
- Téllez-Pérez, C., Sabah, M.M., Montejano-Gaitán, J.G., Sobolik, V., Martínez, C.-A., Allaf, K., 2012. Impact of Instant Controlled Pressure Drop Treatment on Dehydration and Rehydration Kinetics of Green Moroccan Pepper (*Capsicum Annuum*). *Procedia Eng., CHISA* 2012 42, 978–1003. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.491>

- Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N.P., Abramovič, H., 2012. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Ind. Crops Prod.* 39, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.023>
- Tessitore, L., Davit, A., Sarotto, I., Caderni, G., 2000. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21CIP expression. *Carcinogenesis* 21, 1619–1622. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.8.1619>
- Tohmé, G., Tohmé, H.S., 2007. *Illustrated flora of Lebanon*. National Council for Scientific Research, Beirut, Lebanon.
- Tosun, F., Kizilay, Ç.A., 2003. Anthraquinones and flavonoids from *Rheum ribes*. *Ank. Univ. Eczacilik Fak. Derg.* 031–035. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000385
- Tristantini, D., Amalia, R., 2019. Quercetin concentration and total flavonoid content of anti-atherosclerotic herbs using aluminum chloride colorimetric assay. Presented at the THE 4TH BIOMEDICAL ENGINEERING'S RECENT PROGRESS IN BIOMATERIALS, DRUGS DEVELOPMENT, HEALTH, AND MEDICAL DEVICES: Proceedings of the International Symposium of Biomedical Engineering (ISBE) 2019, Padang, Indonesia, p. 030012. <https://doi.org/10.1063/1.5139349>
- Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tu, B., Wang, Y., Mi, R., Ouyang, Y., Hu, Y.-J., 2015. Evaluation of the interaction between naringenin and human serum albumin: Insights from fluorescence spectroscopy, electrochemical measurement and molecular docking. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 149, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.087>
- Tuncturk, M., Celen, A.E., Tuncturk, R., 2017. Nutrient content of three edible wild plants from Polygonaceae family. *Oxid. Commun.* 40, 10.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., Yangsabai, A., 2018. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* 5, 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>

- Türkkan, B., Özyürek, M., Bener, M., Güçlü, K., Apak, R., 2012. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 85, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.09.066>
- Turnbull, D., Cohen, M.H., 1961. Free-Volume Model of the Amorphous Phase: Glass Transition. *J. Chem. Phys.* 34, 120–125. <https://doi.org/10.1063/1.1731549>
- Usha Rani, M., Anu Appaiah, K.A., 2012. Gluconacetobacter hansenii UAC09-mediated transformation of polyphenols and pectin of coffee cherry husk extract. *Food Chem.* 130, 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.021>
- Uyar, P., Coruh, N., İscan, M., 2014. Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of Rheum ribes ethyl acetate extracts. *J. Plant Sci.* 2, 339–346.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C. (Chrysa), Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E., 2022. Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. *Antibiotics* 11, 1014. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>
- Vaquero, M.R., Alberto, M.R., De Nadra, M.M., 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18, 93–101.
- Verma, A.K., Pratap, R., 2010. The biological potential of flavones. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1571. <https://doi.org/10.1039/c004698c>
- Vestergaard, M., Ingmer, H., 2019. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015>
- Wakeel, A., Jan, S.A., Ullah, I., Shinwari, Z.K., Xu, M., 2019. Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of Isatis tinctoria. *PeerJ* 7, e7857. <https://doi.org/10.7717/peerj.7857>
- Wang, D., 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* 11, 4008. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i26.4008>
- Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y., Lin, J.-K., 1999. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3

- in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1517–1525.
[https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00168-9)
- Wang, M., Firman, J., Liu, L., Yam, K., 2019. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. *BioMed Res. Int.* 2019, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/7010467>
- Weng, C.-J., Yen, G.-C., 2012. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat. Rev.* 38, 76–87.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.001>
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H., 2006a. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99, 775–783.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>
- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H., 2006b. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99, 775–783.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>
- Wu, M., Brown, A.C., 2021. Applications of catechins in the treatment of bacterial infections. *Pathogens* 10, 546.
- Wu, N., Lippert, J.A., Lee, M.L., 2001. Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 911, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01188-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01188-2)
- Xiang, D., Wang, D., He, Y., Xie, Jiayin, Zhong, Z., Li, Z., Xie, Jiang, 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the β -catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer. Drugs* 17, 753–762.
<https://doi.org/10.1097/01.cad.0000224441.01082.bb>

- Xiaowei, H., Zhihua, L., Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Yiwei, X., Xiaodong, Z., 2021. Conventional and rapid methods for measurement of total bioactive components and antioxidant activity in *Hibiscus sabdariffa*, in: Mariod, A.A., Tahir, H.E., Mahunu, G.K. (Eds.), *Roselle (Hibiscus Sabdariffa)*. Academic Press, pp. 199–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822100-6.00011-2>
- Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., Liu, L., 2017. Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 22, 1913. <https://doi.org/10.3390/molecules22111913>
- Xu, L., Chan, C., Lau, C., Yu, Z., Mok, D.K.W., Chen, S., 2012. Simultaneous Determination of Eight Anthraquinones in Semen Cassiae by HPLC-DAD: Simultaneous Determination Anthraquinones in Semen Cassiae. *Phytochem. Anal.* 23, 110–116. <https://doi.org/10.1002/pca.1331>
- Yadav, A., Richa Bhardwaj, R. A. Sharma, 2013. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Anthraquinones Isolated from Different Parts of *Cassia nodosa*. *Res. J. Med. Plants* 7, 150–157. <https://doi.org/10.17311/rjmp.2013.150.157>
- Yeh, F.-T., Wu, C.-H., Lee, H.-Z., 2003. Signaling pathway for aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell. *Int. J. Cancer* 106, 26–33. <https://doi.org/10.1002/ijc.11185>
- Yildirim, I., Kutlu, T., Takim, K., 2015. Comparison of antioxidant activity of *Rheum ribes* fruits and seed methanolic extracts against protein oxidation and lipid peroxidation. *Pak. J Biol Sci* 18, 232–239.
- Zahedi, M., Hojjati, M.R., Fathpour, H., Rabiei, Z., Alibabaei, Z., Basim, A., 2015. Effect of *Rheum Ribes* Hydro-Alcoholic Extract on Memory Impairments in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 14, 1197–1206.
- Zarguili, I., Maache-Rezzoug, Z., Loisel, C., Doublier, J.-L., 2006. Influence of DIC hydrothermal process conditions on the gelatinization properties of standard maize starch. *J. Food Eng., Special Section: CHISA 2004* (pp. 379-471) 77, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.014>

- Zhang, L., Chang, C.J., Bacus, S.S., Hung, M.C., 1995. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res.* 55, 3890–3896.
- Zheng, Q., Wu, H., Guo, J., Nan, H., Chen, S., Yang, J., Xu, X., 2013. Review of Rhubarbs: Chemistry and Pharmacology. *Chin. Herb. Med.* 5, 9–32. <https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-6384.2013.01.003>
- Zhu, Y., Mao, Y., Chen, H., Lin, Y., Hu, Z., Wu, J., Xu, X., Xianglai, Q., Xie, L., 2013. Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell Int.* 13, 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-54>
- Zotou, A., 2012. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Open Chem.* 10, 554–569. <https://doi.org/10.2478/s11532-011-0161-0>

Annexe

Annexe 1

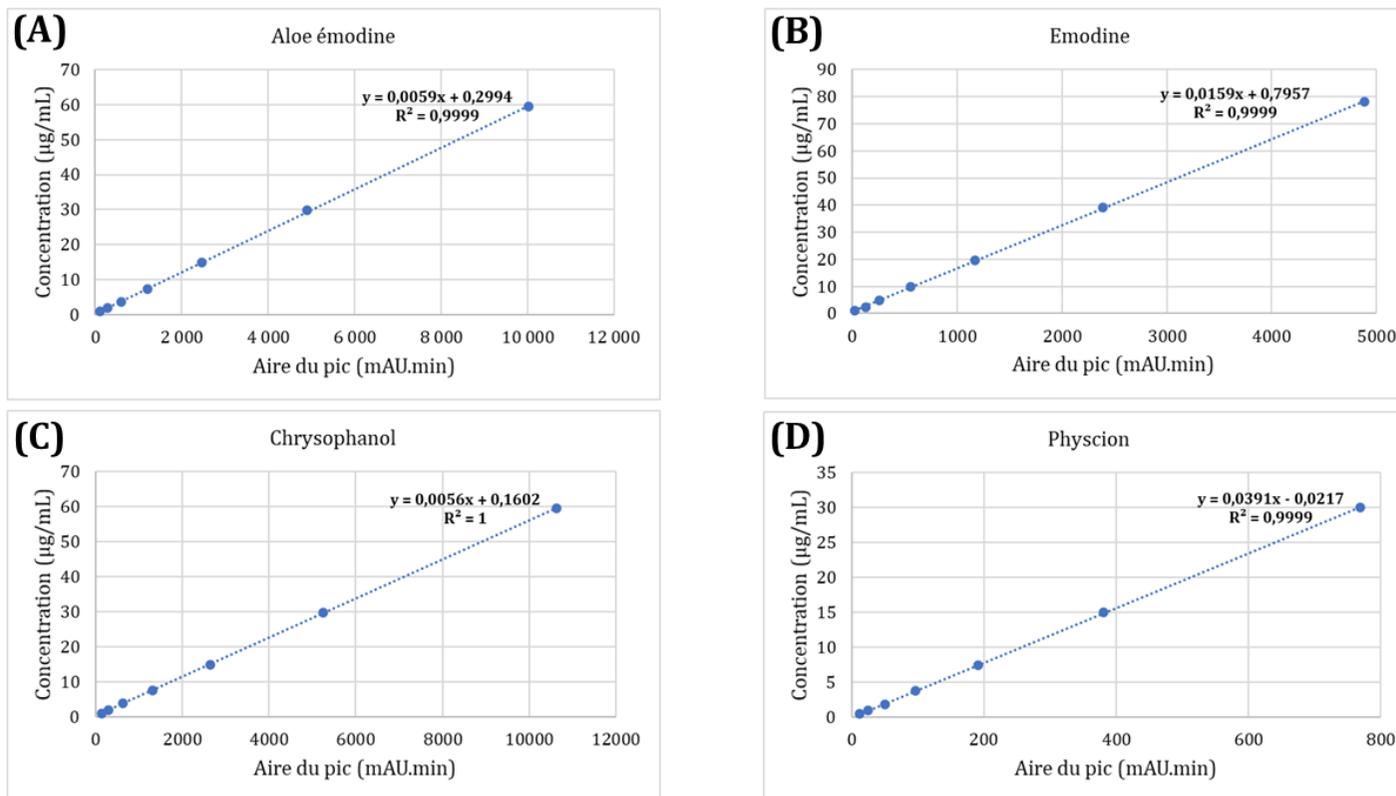


Figure 81- Courbes d'étalonnage des molécules standards d'émodyne (A), d'aloé-émodyne (B), de chrysophanol (C) et de physcion (D)

Annexe 2

Tableau 29- Tableau présentant les molécules suspectées détectées dans l'échantillon MP aqueux par UHPLC-MS

Formule brute	Molécules suspectées
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	Type flavonoïdes
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Aurantio-obtusin β-D-glucoside</u> • <u>Tricin 7-O-glucoside</u> • <u>Tricin 5-O-β-D-glucoside</u> • <u>Tricin 7-O-β-D-glucoside</u> • <u>Malvidin 3-O-β-D-glucoside betaine</u> • <u>Limocitrin 3-rhamnoside</u> • <u>Quercetin 3,3'-dimethyl ether 7-glucoside</u> • <u>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-glucoside</u> • <u>5,2',6'-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone 2'-glucoside</u> • <u>Iristectorigenin A 7-O-glucoside</u> • <u>Licoagroside A</u> • <u>3',4',5-Trihydroxy-3,7-dimethoxyflavone 5-glucoside</u> • <u>3',8-Dimethoxyapigenin 7-glucoside</u> • <u>3',7-Dimethoxy-4',5,8-trihydroxyflavone 8-glucoside</u> • <u>Eupatolin</u> • <u>Quercetin 3,3'-dimethyl ether 4'-glucoside</u>
	Type flavonoïdes
C ₂₁ H ₂₂ O ₈	<ul style="list-style-type: none"> • <u>7-hydroxyflavanone 7-O-β-D-glucoside</u> • <u>3,3',4',5,6,8-Hexamethoxyflavone</u> • <u>nobiletin</u> • <u>2-(2,5-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxy-4H-1-benzopyran-4-one</u> • <u>2-(3,5-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxy-4H-1-benzopyran-4-one</u> • <u>2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5,6,7-tetramethoxy-1-benzopyran-4-one</u>

	<ul style="list-style-type: none"> • <u>5,6,7-trimethoxy-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1-benzopyran-4-one</u> • <u>3,3',4',5,6,8-Hexamethoxyflavone</u> • <u>Pinocembrin 7-O-rhamnoside</u>
	Dérivé d'anthracène
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Chrysaloin</u>
C₂₁H₂₂O₉	Type flavonoïdes
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>5-Hydroxy-3,6,7,2',4',5'-hexamethoxyflavone</u> • <u>8-Hydroxy-3,5,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone</u> • <u>Equol 4'-O-glucuronide</u> • <u>Naringerin</u> • <u>3,4,5-trihydroxy-6-[4-hydroxy-2-(3-phenylpropanoyl)phenoxy]oxane-2-carboxylic acid</u> • <u>7-Hydroxy-3,3',4',5,6,8-hexamethoxyflavone</u> • <u>5-Hydroxy-3,3',4',6,7,8-hexamethoxyflavone</u> • <u>Equol 7-O-glucuronide</u> • <u>Dihydrodaïdin</u> • <u>Natsudaïdin</u> • <u>Neoisoliquiritin</u> • <u>Neoliquiritin</u> • <u>Isosakuranetin 7-xyloside</u> • <u>Pinocembrin 5-O-glucoside</u> • <u>Naringenin 4'-O-alpha-L-rhamnopyranoside</u> • <u>Naringenin 5-rhamnoside</u>
	Anthraquinones
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Aloin</u> • <u>Aloin A</u> • <u>Aloin B</u>
	Phénol Glycosylé
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>hydrangeic acid 4'-O-β-D-glucopyranoside</u>

	<ul style="list-style-type: none"> • <u>hydrangenol 8-O-β-D-glucopyranoside</u> • <u>hydrangenol 4'-O-β-D-glucopyranoside</u> • <u>isoliquiritin</u> • <u>liquiritin</u>
	Xanthone
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>polygonimitin B</u>
	Dérivé de stilbène
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Gaylussacin</u>
C₂₃H₂₂O₁₂(Na)⁺	Type flavonoïdes
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>kaempferol 3-O-β-D-glucoside</u> • <u>5,7-Dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavone 7-glucuronide</u> • <u>Scutellarein 6,7-dimethyl ether 4'-glucuronide</u> • <u>Hispidulin 7-methylglucuronide</u> • <u>Orobol 8-C-(6''-acetylglucoside)</u> • <u>2''-O-Acetylisoorientin</u> • <u>Irisolidone 7-O-glucuronide</u>
	Anthraquinone glycosylé
	<ul style="list-style-type: none"> • <u>1,3,6-trihydroxy-2-hydroxymethyl-9,10-anthraquinone-3-O-(6'-O-acetyl)-β-D-glucopyranoside</u>

