جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵍⵍⴰⵀ ⴱ ⴼⴰⵙ
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
ⵜⴰⵖⵡⵍⵉⵜ ⵏ ⵜⵙⴰⵡⵍⵉⵏ ⴷ ⵜⵙⵙⵏⵜⵉⵏ ⴼⴰⵙ
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales**

*N° d'ordre 19 /2021*

# THESE DE DOCTORAT

Présentée par

**Mr : MARSOUL Abdelilah**

Spécialité : Chimie des Molécules Bioactives

**Sujet de la thèse : Valorisation des extraits de six plantes aromatiques et médicinales : caractérisation phytochimique, activité biologiques et inhibiteur de la corrosion.**

**Thèse présentée et soutenue le Samedi 20 Février 2021 devant le jury composé de :**

| Nom Prénom | Titre | Etablissement | |
|---|---|---|---|
| Touria ZAIR | PES | Faculté des Sciences Meknés | Président |
| Abderrahmane ROMANE | PES | Faculté des Sciences Semlalia Marrakech | Rapporteur |
| Jamal BRIGUI | PES | Faculté des Sciences et Techniques Tanger | Rapporteur |
| Said CHAKROUNE | PES | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Rapporteur |
| Amina BOUCETA | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès | Examinateur |
| Mustapha TALEB | PES | Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès | Examinateur |
| Mustapha IJJAALI<br>Abdellatif BOUKIR | PES | Faculté des Sciences et Techniques de Fès | Directeurs de thèse |

Laboratoire d'accueil : Procédé, Matériaux et Environnement.

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales**

**Titre de la thèse :** Valorisation des extraits de six plantes aromatiques et médicinales : caractérisation phytochimique, activité biologiques et inhibiteur de la corrosion.

**Nom et prénom du candidat :** Abdelilah MARSOUL

**Spécialité :** Chimie des Molécules Bioactives

## Résumé de la thèse

L'objectif principal de la présente étude est de valoriser les extraits (soxhlet, macération) de six plantes aromatiques et médicinales (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibsicus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*) moyennant quatre types de solvants. L'évaluation a concerné leurs criblages, leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux, leurs pouvoirs antioxydants, leurs activités antibactériennes et leurs effets sur l'acier doux en milieu acide en tant qu'inhibiteurs de corrosion respectueux de l'environnement. Les rendements d'extraction ont été plus élevés dans le cas du méthanol, suivis du mélange ternaire de solvants, puis l'acétate d'éthyle, et enfin l'acétone. Les extraits au soxhlet sont meilleurs que ceux macérés. Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminées par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu, celles des flavonoïdes totaux ont été dosées en utilisant $AlCl_3$ mesurée à λ=510 nm. Les taux les plus élevés ont été corrélés aux extraits méthanoliques. L'analyse par UV-vis des extraits méthanoliques (soxhlet, macération) ont révélé la présence d'une variété de chromophores polyphénoliques variant selon la nature de la plante ciblée (ellagyle, gallagyle, anthraquinone, naphtoquinone, flavonoïde, anthocyanes, berbérine, chlorophylle). L'analyse par spectroscopie IR a confirmé les résultats de l'UV par la présence des O-H phénoliques et oses, C=O (cétone, acide…), $C_{ar}$-O, C-O des carbohydrates, squelettes hydrocarbonés (aromatiques et alkyles). Les activités antioxydantes ont été évaluées à la fois par la recherche des activités antiradicalaires (CI50) via le test $DPPH^{\cdot}$ et la détermination des concentrations efficaces (CE50) par test FRAP. Les résultats obtenus sont plus importants que ceux des références (BHT, Vitamine E) et peuvent être classés selon l'ordre croissant de CI50 : *Hibiscus* (0.35 mg/mL) < *Lawsonia* < *Punica* < *Rubia* < *Quercus* < *Papaver*. Les CE50 sont moins importantes que celles des standards (a. ascorbique, BHT) mais plus significatives que celle de la vitamine E. Les résultats des activités antibactériennes se sont montrés variables contre les souches bactériennes utilisées (3 à $Gram^+$ et 3 à $Gram^-$). Les CMI et les CMB sont sensibles à la fois à la nature des bactéries testées et au type d'extrait utilisé (macéré ou soxhlet). Les CMI les plus remarquables sont de 0.23 mg/mL et sont corrélées aux extraits de *Rubia, Papaver* et *Hibiscus* contre l'*Enterococcus f.* ($Gram^+$), celle de 0.93 mg/mL est reliable au *Punica* contre le *Klebsiella p.* ($Gram^-$). Les meilleures CMB ont été attribuées au *Quercus* (0.187mg/mL), suivi d'*Hibiscus, Papaver* et *Rubia* (0,299 mg/mL). Les résultats des tests de corrosion sur l'acier doux en milieu HCl 1M (perte de masse, polarisation potentiodynamique et impédance électrochimique) avec les extraits méthanoliques (soxhlet) comme inhibiteurs ont montré que ces derniers sont de type mixte, et leur résistance au transfert de charge augmente en fonction du taux de l'inhibiteur, cependant la capacité de double couche diminue (diagramme Nyquist). Le phénomène d'adsorption est de type physisorption'', confirmé par l'isotherme d'adsorption de Langmuir ($R^2 > 0.99$). Tous les extraits testés ont montré des efficacités d'inhibition de corrosion très importantes (> 90%) à la concentration optimale de $1g.L^{-1}$, et sont considérés comme écologique (respectueux de l'environnement).

Enfin, le choix de la procédure d'extraction s'est porté sur celle du soxhlet en présence du méthanol comme solvant, montrant une fiabilité et efficacité pour ces types d'extraits. Ainsi, les polyphénols identifiés (issus des plantes étudiées) pourraient être explorés en tant qu'antibactériens naturels ou comme source d'antioxydants naturels en agroalimentaire et/ou comme inhibiteurs écologiques de corrosion mais très efficaces.

**Mots clés** : Substances naturelles (6 plantes), soxhlet et macération, polyphénols et flavonoïdes, spectroscopie IRTF et UV-vis, activité antioxydante DPPH et FRAP, activité antibactérienne, inhibiteur corrosion écologique

# Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales continuent de jouer un rôle très important en tant que source de métabolites secondaires ayant un intérêt sur la santé humaine par leur apport de point de vue thérapeutique [1] et alicament, alimentaire, teinturerie et pigments, cosmétique, et bien d'autres…

Il a été rapporté qu'entre 1981 et 2006, 69% de nouveaux agents antibactériens provenaient de substances naturelles [2]. De même, entre la période de 1940 et 2014, 49% des agents anticancéreux présents sur le marché, étaient des métabolites secondaires isolés de la nature ou de leurs dérivés [3]. On peut citer à titre d'exemple le taxol (taxotère®) qui a été découvert par Pierre Potier (Gif sur Yvette) et obtenu par voie d'hémisynthèse en 1990 (essais cliniques, et 1995 a reçu son AMM) à partir de terpénoide extrait de l'if du Pacifique (*Taxus Baccata*).

Un besoin croissant a été affiché afin de trouver de nouveaux traitements à base de produits naturels pour divers problèmes liés à la santé humaine (maladies), comme l'émergence de bactéries multi-résistantes aux médicaments de synthèse, la résistance aussi à la chimiothérapie anticancéreuse, les effets indésirables provenant des médicaments commerciaux (synthèse), ainsi que le coût économique élevé des médicaments de synthèse, d'où un intérêt croissant de la recherche de substances bioactives et valorisation biologique des produits naturels [4,5].

Ainsi, plusieurs plantes endémiques originaires du Maroc ou à travers le monde ont été sollicitées, ciblées et investiguées pour subir des extractions et par la suite des tests *in-vitro* (plusieurs activités biologiques et pharmacologiques) afin de contribuer à la résolution de cette problématique. D'après la littérature, bon nombre de plantes ont présenté un pouvoir antimicrobien très intéressant [6,7,8], activité antioxydante prometteuse [6, 9], antifongique, antivirale [10], anti-inflammatoire [11], analgésique [12, 13], anticancéreuse [14], anticholinestérase, anticorrosif [15], et bien d'autres.

Concernant notre étude, nous nous sommes focalisés sur 6 types de plantes aromatiques et médicinales (*Punica granatum*, *Rubia tinctorum*, *Papaver rhoeas*, *Hibiscus sabdareiffa*, *Quercus ilex* et *Lawsonia inermis*). La littérature a montré qu'il y a un grand manque à gagner au niveau de données 'des fois absentes' sur l'application des composés phénoliques de ces plantes évoquées au niveau antioxydant naturel, antimicrobien naturel, anti-corrosif naturel et

respectueux de l'environnement. C'est pourquoi la présente étude contribue à étudier d'abord la composition chimique issue des extraits au soxhlet et macération (profiler les composés phénoliques de ces extraits par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu), puis rechercher le pouvoir antioxydant, évaluer les activités antibactériennes *in vitro* contre 6 types de micro-organismes en utilisant 8 types d'antibiotiques, et enfin déterminer l'effet anticorrosif de l'acier doux en milieu acide.

Le présent manuscrit de thèse est organisé en six chapitres.

Le **premier chapitre** est dédié à la synthèse bibliographique donnant un aperçu général sur les 6 types de plantes aromatiques et médicinales étudiées, présentant des données générales sur la taxonomie, la biosynthèse des polyphénols (flavonoïdes, tanins et anthocyanes) et la relation structure-activité, puis une description détaillée sur les composés phénoliques contenus dans chacune des plantes à travers le monde. Une autre partie a été réservée aux généralités sur les méthodes d'extraction et de caractérisation des phénols naturels en mélanges complexes, suivies de rappels sur l'évaluation antioxydante des polyphénols ainsi que leur rôle important en tant qu'antibactériens naturels efficaces. Enfin, ce chapitre se termine par aperçu sur la corrosion et le pouvoir anticorrosif des substances contenues dans les extraits naturels.

Le **second chapitre** a été consacré à la partie 'Matériel et méthodes', décrivant les protocoles expérimentaux ayant servi pour la réalisation des différentes études conduites dans ce document.

Le **troisième chapitre** concerne d'abord le screening phytochimique (polyphénols, flavonoïdes, saponosides, stérols et polyterpènes, alcaloïdes, tanins) des différents extraits issus des 6 plantes évoquées. Ces derniers ont été établis selon deux procédures expérimentales (soxhlet et macération) moyennant quatre types de solvants de différentes polarités (acétone, acétate d'éthyle, méthanol, mélange ternaire de solvants: hexane-AcOEt-MeOH). Les analyses quantitatives des composés phénoliques totaux (profiling), flavonoïdes totaux et tanins totaux contenus dans les extraits (soxhlet, macération) aux différents solvants ont été établies par dosage colorimétrique par le réactif Folin-Ciocalteu.

Le **quatrième chapitre** a été réservé à l'élucidation structurale des composés phénoliques contenus dans les extraits au soxhlet et macération (6 plantes) en utilisant deux techniques analytiques : spectrophotométrie UV-visible et spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF). Plusieurs composés phénoliques et polyphénoliques appartenant à différentes familles ont été caractérisés et varient selon la nature de la plante étudiée.

Quant au **cinquième chapitre**, il est relatif à l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits méthanoliques (soxhlet, macération) issus des six plantes ciblées. Le pouvoir antioxydant a été déterminé d'abord par la recherche de la capacité antioxydante totale, puis en utilisant le piégeage du radical libre par test $DPPH^{\cdot}$ (activité antiradicalaire : CI50) ainsi que le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) permettant la détermination des concentrations efficaces (CE50). Le deuxième volet de ce chapitre concerne la recherche et l'évaluation des activités antibactériennes via les procédures suivantes : méthode de diffusion des disques et méthode de microdilution des puits. Les diamètres des zones d'inhibition des huit antibiotiques testés (erythromycine, ofloxacine, ticarcilline, oxacilline, ampicilline, norfloxacine, ceftazidime, cefotaxime) ont été évalués contre 8 types de bactéries (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* et *Enterobacter feacalis*). L'antibiogramme résultant permet d'estimer la sensibilité des souches bactériennes pathogènes et/ou d'altération. Nos extraits ont été aussi testés sur les mêmes souches et comparés aux standards, permettant de déterminer leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB), en utilisant la méthode de microdilution des puits.

Le **dernier chapitre (6)** est focalisé sur la partie électrochimique a permis la détermination du pouvoir inhibiteur (pouvoir anti-corrosif) des six extraits de plantes (respectueux de l'environnement) vis-à-vis de l'acier doux en milieu acide (HCl 1M). L'effet de chaque extrait a été discuté en exploitant plusieurs facteurs influençant : variation des concentrations sur l'efficacité d'inhibition (perte de masse), courbes de polarisation potentiodynamique (méthode de Tafel : paramètres électrochimiques issus de ces courbes), spectroscopie d'impédance électrochimique sans et avec addition des inhibiteurs naturels **(**diagrammes de Nyquist et Bode**),** et paramètres électrochimiques issus des diagrammes d'impédance. La comparaison de l'efficacité inhibitrice *(η %)* par les 3 méthodes suivantes : gravimétrique, polarisation et impédance a été aussi effectuée. D'autres paramètres thermodynamiques comme le coefficient d'adsorption ($K_{ads}$) et $\Delta \mathbf{G^0_{ads}}$ ont été déterminés en explorant quatre types d'isothermes : Langmuir, Freundlich, Frumkin et Temkin. Pour clore ce chapitre, l'effet de la température sur l'efficacité inhibitrice des extraits ***(***pouvoir inhibiteur***)*** et l'évolution de la vitesse de corrosion (par méthode gravimétrique) a été aussi étudié entre 303 à 333 °K.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale résumant les points essentiels du travail accompli et mettant en évidence les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

# Chapitre I : Revue bibliographique

La flore mondiale est estimée à environ 400 000 espèces dont 25 à 35% sont exploitées à des fins médicinales [16,17]. Les plantes en tant que source de composés bioactifs (médicinaux) ont continué à jouer un rôle prédominant dans le maintien de la santé humaine depuis les temps anciens. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les extraits de plantes et leurs substances bioactives sont utilisés en médecine populaire dans les thérapies traditionnelles (80 % de la population mondiale). Les médicaments originaires du règne naturel contribuent à plus de 50 % dans les thérapies cliniques modernes [18]. Ceci est dû principalement à leurs richesses en molécules bioactives responsables de plusieurs activités comme : les activités antimicrobienne, antioxydante et bien d'autres [19], on peut citer à titre d'exemple : les vitamines (A, C, E et K), les caroténoïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les alcaloïdes, les tanins, les saponines, les pigments, les enzymes et les minéraux. Au cours de ces dernières années, un bon nombre d'études ont été menées dans divers pays afin de prouver leurs efficacités.

Au Maroc, de nombreuses plantes médicinales ont été décrites pour le traitement de nombreuses maladies. La phytothérapie est considérée comme une partie intégrante de la culture marocaine et joue un rôle central et indispensable dans le système de santé publique actuel. Les collines, les montagnes et les forêts du Maroc sont couvertes de plus de 4200 taxons de plantes médicinales et aromatiques (101 familles et 371 genres) dont 22% (soit 879) sont endémiques, 2,3% (soit 96) sont rares ou menacées et 2,5% (soit 104) sont cultivés [20,21]. Ces plantes médicinales et aromatiques (PAM) sont utilisées dans divers domaines allant du thérapeutique, cosmétique, pigments naturels, agroalimentaire jusqu'au culinaire. Parmi ces plantes médicinales et aromatiques on trouve : *Punica granatum* et *Papaver rhoeas* qui ont été évaluées aussi bien pour leurs pouvoirs antioxydant et inhibiteur de corrosion des aciers doux, que pour leurs activités antibactériennes [6,15].

## A- Taxonomie (description botanique)

La première réforme notable de la classification des plantes a été proposée par Carl Von Linée qui se basait sur une nomenclature binominale pour attribuer un nom de Genre et un nom unique d'espèce en latin. Cette nomenclature fut adoptée de manière officielle dans tous les pays, puis complétée et appliquée à l'ensemble du vivant, mettant fin aux innombrables homonymes des noms vernaculaires. La classification a été perfectionnée ensuite par divers

auteurs successifs, la plus aboutie étant la classification de Cronquist, établie par Arthur John Cronquist et officialisée en 1981. La description botanique de différentes plantes auxquelles nous nous sommes intéressées au cours de notre travail est résumée dans le tableau I.2.

**Tableau I.2** Taxonomie des certaines plantes.

| **Classification scientifique** | ***Punica granatum*** | ***Rubia tinctorum*** | ***Papaver rhoeas*** | ***Hibiscus sabdariffa*** | ***Quercus ilex*** | ***Lawsonia inermis*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Règne** | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae |
| **Sous règne** | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaepl-antae | Viridaeplantae |
| **Embranchem-ent** | Spermaphytes | Spermatophytes | Spermatophytes | Angiospermes | Magnoli--ophyta | Angiospermes |
| **Classe** | Equisetopsida | Equisetopsida | Equisetopsida | Equisetopsida | Equiset--psida | Equisetopsida |
| **Ordre** | Myrtales | Gentianales | Ranunculales | Malvales | Fagales | Myrtales |
| **Sous-classe** | Magholiidae | Magholiidae | Magholiidae | Magholiidae | Magholii-dae | Magholiidae |
| **Famille** | **Lythracées** | **Rubiacées** | **Papaveracées** | **Malvacées** | **Fagacées** | **Lythracées** |
| **Sous-famille** | Punicoideae | Rubioideae | | Malvoideae | Fagoidées | Lagerstroemioideae |
| **Tribu** | Pyrées | Rubieae | Fumaroidae | Hibisceae | | Lythreae |
| **Genre** | Punica | Rubia | Papaver | Hibiscus | Quercus | Lawsonia L. |
| **Espèce** | *P. granatum* | *R. tinctorum* | *P. rhoeas* | *H. sabdariffa* | *Q. ilex* | *L. inermis* |
| **Synonyme** | *Granatum puniceum*<br>*Granatum punicum*<br>*Punica florida*<br>*Punica granatum*<br>*Punica granatum var.*<br>*Punica nana*<br>*Punica spinosa*<br>*Rhoea punica* | *Galium rubia*<br>*Rubia iberica*<br>*Rubia peregrina*<br>*Rubia sylvestris* | *Papaver commutatum*.<br>*Papaver insignitum*<br>*Papaver intermedium*<br>*Papaver roubiaei*<br>*Papaver strigosum*<br>*Papaver tenuissimum*<br>*Papaver trilobum*<br>*Papaver tumidulum* | *Hibiscus fraternus* | *Quercus cookii*<br>*Quercus expansa*<br>*Quercus gracilis*<br>*Quercus gramuntia*<br>*Quercus ilex* subsp. | *Lawsonia alba*<br>*Lawsonia purpurea*<br>*Lawsonia speciosa*<br>*Lawsonia spinosa* |

Les descriptions des différentes plantes évoquées ci-dessus sont détaillées dans les paragraphes suivants.

### I.1. Punica granatum (grenade)

*Le Punica granatum* L. (grenade) appartient à la famille des lythracées et comprend environ 500 cultivars distribués à travers le monde entier [22]. Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Il se distingue par ses fleurs roses et ses fruits plus petits et moins sucrés. Ses fleurs rouges vifs mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses [23]. La grenade est utilisée dans la boulangerie, les boissons et la cuisine. En outre, *P. granatum* (Figure I.1) est largement utilisé pour le traitement de plusieurs maladies dans différentes cultures et civilisations.



Figure I.1 : Arbre (a) et fruits (b) de *Punica granatum* (grenade).

### *I.2. Rubia tinctorum (la garance) et ses fruits*

*Le Rubia tinctorum* L. (la garance) appartient à la famille des rubiacées et comprend environ 6000 espèces, regroupées en 500 genres. Au Maroc, les rubiacées sont représentées par 6 genres: *Rubia, Galium, Asperula, Viallantia, Crucinella et sherardia*, dont 61 principales espèces. *Le Rubia tinctorum* est une plante herbacée, vivace et grimpante, avec des tiges droites à section carrée qui sont munies d'aiguillons crochus. La partie aérienne de la plante meurt durant la période de l'automne, cependant les racines persistent et restent en survie. Ces dernières sont caractérisées par des sections rondes très ramifiées et constituent la partie la plus riche en substances bioactives (principalement les pigments organiques).

La garance (*Rubia tinctorum*) (Figure I.2) était utilisée depuis longtemps comme source de teinture rouge par les Égyptiens [24]. En outre, plusieurs études ethnobotaniques ont montré son utilisation dans le traitement de diverses affections comme les maladies cardiovasculaires [25,26], les douleurs hépatiques, la diarrhée [27,28], le rhumatisme [29] et les calculs rénaux

[30]. D'autres études biologiques ont prouvé son potentiel thérapeutique en tant qu'antiagrégant plaquettaire [31], antitumoral [32], hépatoprotecteur [33], vasoconstricteur et présentant un effet protecteur sur l'aorte [34]. Les travaux actuels ont été conçus pour évaluer l'efficacité de différents extraits en recherchant leurs effets anti-obésité, antidiabétiques et hépatoprotectrices ainsi que leur ''profiling'' comme puissants composés bioactifs responsables de l'activité antidiabétique.



Figure I.2 : Feuilles et Racines de *Rubia tinctorum* (la garance).

### I.3. Papaver rhoeas (coquelicot)

L'origine exacte de *P. rhoeas* (coquelicot) reste encore inconnue, certains auteurs l'attribuent à l'Afrique du Nord, Europe, et Asie occidentale, et probablement originaire du bassin méditerranéen oriental [36].

*Le Papaver rhoeas* appartient à la famille des papaveracées, considéré comme un théophyte synanthrope facilement reconnaissable par ses fleurs écarlates et ses cheveux blancs répartis sur tout le territoire national. C'est une herbe en érection généralement pas plus de 80 cm de haut, généralement autour de 20-80 cm, dégageant une forte odeur typique et une latex une fois endommagée [35].

L'origine exacte de *P. rhoeas* reste encore inconnue, certains auteurs l'attribuent à l'Afrique du Nord, Europe, et Asie occidentale, et probablement il est originaire du bassin méditerranéen oriental [36].

Les fleurs sont solitaires et de couleur rouge, les étamines sont très nombreuses et presque de couleur noire émettant un pollen jaune clair qui assure la pollinisation par les insectes. Quant aux graines, elles sont minuscules et sombres ressemblant au rein (de point de vue forme) et très abondant [37]. Les données caractéristiques de la plante sont illustrées dans la figure I.3.




Figure I.3 : Fleurs de *Papaver rhoeas*

## I.4. Hibiscus sabdariffa

*L'Hibiscus sabdariffa* L. appartient à la famille des malvacées, originaire de l''Amérique centrale, il a été introduit dans diverses régions tropicales comme l'Inde, Java, et l'Afrique (Niger, Gabon, Congo…). Les principaux pays producteurs sont le Soudan, la Thaïlande et le Sénégal. On le trouve dans les chaînes volcaniques et les plaines.

*L'Hibiscus sabdariffa* L. (Figure I.4) est une plante arbustive annuelle cultivée dans les pays tropicaux et dans de nombreux pays africains pouvant atteindre 4 à 5 m de hauteur. Les tiges sont robustes, à feuilles alternées, ovales, trilobées, dentelées et élastiques de 7 à 10 cm, la couleur varie du vert au jaune verdâtre ou au vert-rouge. Les fleurs sont montrées dans la figure I.4.




Figure I.4: Fleurs *Hibiscus sabdariffa*

## I.5. *Quercus ilex* (chêne vert)

*Quercus ilex* appartient à la famille des fagacées, est un arbre à feuilles persistantes ou caduques. Ces genres contiennent environ 450 espèces et représentent un important groupe d'arbres répandus en Europe, Asie, Nord Afrique et Amériques (Nord, centrale et Sud). On peut distinguer plusieurs types : chênes blancs (section Quercus), chênes vivants (série Virentes), chênes dorés ou intermédiaires (section Protobalanus) et enfin, chênes rouges (section Lobatae) qui sont présents en Amérique. Les chênes à gobelet (sous-genre

Cyclobalanopsis) se trouvent en Asie et les chênes blancs le long de l'Atlantique, des chênes noirs (section Cerris) sont étendus à l'Eurasie [38]. Les espèces de feuillus les plus courantes sont *Q. ilex, Q. dentata, Q. acutisssima, Q. variabilis, Q. acuta, Q. glauca, Q. serrata et Q. salicina*. Les chênes les plus étudiés sont les chênes européens, principalement *Q. robur* (chêne anglais) et *Q. petraea* (chêne sessile ou chêne dur) [39].

Les espèces de *Quercus* produisent un fruit universellement connu (le gland) avec l'écorce qui a été utilisé en médecine traditionnelle, appliqué comme antiseptique ou utilisé dans les troubles gastro-intestinaux. En raison de leur rôle nutritionnel, les glands sont utilisés comme aliments pour l'être humain et les animaux. Le bois de chêne joue un rôle important dans la maturation du vin en fûts de chêne, dans la protection contre la pourriture fongique et dans l'industrie du bois grâce à la diversité de changements de ses couleurs en fonction du temps [40].

Les grandes quantités de déchets forestiers engendrées et résultantes de la transformation du bois (écorce et feuilles de chêne) (Figure I.5), la grande disponibilité de ce biomatériau et sa résistance à la sécheresse font de ce type d'espèces une réserve importante en composés bioactifs. Parallèlement à cela, la diversité des usages populaires et la richesse en composés phytochimiques font de ce genre une espèce très intéressante pour pouvoir évaluer les activités biologiques et les effets toxicologiques.

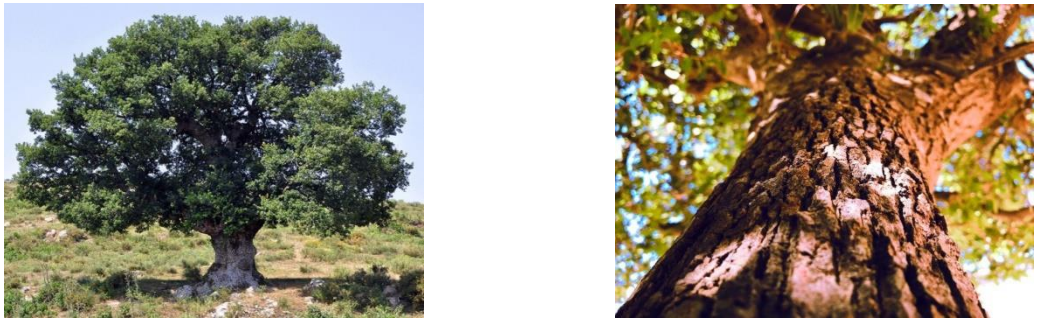


Figure I.5: Arbre de *Quercus ilex*

### I.6. *Lawsonia inermis* (Henné)

*Le Lawsonia inermis* L. (Figure I.6) ou Henné appartient à la famille des Lythracées, originaire d'Afrique et d'Asie, localisé principalement dans les zones subtropicales et tropicales [41]. Les feuilles de *Lawsonia inermis* ont été utilisées pour la teinture de textile, ou comme colorant cosmétique (ongles, mains et cheveux) pendant des siècles en Afrique du Nord, Moyen-Orient et extrême-Orient (plus de 9000 ans). Le henné était utilisé également

pour traiter les problèmes de peau, des maux de tête, l'amibiase et l'hypertrophie de la rate [27].



**Figure I.6** Arbre et feuilles de *Lawsonia inermis* L. (Henné)

## B- Polyphénols : Biosynthèse de flavonoïdes, structure-activité

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, notamment de nature polyphénolique ne cesse de croître. Dans le domaine de la nutrition, il s'agit d'étudier de nouvelles molécules pour la prévention ou le traitement de certaines maladies liées au vieillissement. Ces vingt dernières années, de nombreuses classes de substances naturelles ont été étudiées et le nombre de composés reconnus pour leurs propriétés antioxydantes intéressantes ne cesse d'augmenter. On entend par composé phénolique, tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles et incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides.…). Ils sont très répandus dans les fruits, légumes et plantes aromatiques médicinales, et sont donc régulièrement consommés par les personnes bénéficiant d'une alimentation "normale". Parmi ces composés, les flavonoïdes représentent la classe de substances la plus étudiée.

### 1.4.4 Biosynthèse des polyphénols (flavonoïdes)

Les composés phénoliques présentent une grande variété d'activités biologiques. En général, les composés phénoliques peuvent fournir un électron ou donner l'atome d'hydrogène en entier de la liaison O-H, qui doit être transféré aux molécules de radicaux libres, transformant ainsi les radicaux libres en molécules inoffensives. Ce processus transforme également le composé phénolique en un radical, avec un électron impair, mais compte tenue de la structure aromatique et de l'électron impair, un phénomène de résonance peut avoir lieu entre ces deux conférant une possibilité de répartition de l'électron libre sur tout le noyau aromatique de la molécule (phénol), entraînant ainsi une stabilisation du radicale [42].

Les composés phénoliques qui existent naturellement en nombre approximatif de 8000, partagent la même structure prédominante qui est composée d'un noyau aromatique hydroxylé [43]. Jusqu'à nos jours, les composés phénoliques d'origine végétale forment l'un des principaux groupes de composés agissant comme antioxydants primaires ou capteurs de radicaux libres. Les polyphénols végétaux sont efficaces en tant que piégeurs d'oxygène singulet, agents réducteurs et donneurs d'atomes d'hydrogène [43]. L'intervention possible d'autres composés facilement oxydés dans les matières végétales et l'hétérogénéité des composés phénoliques naturels ont conduit à l'introduction de plusieurs méthodes pour la détermination des composés phénoliques totaux. Dans la plupart des cas, le dosage colorimétrique par la méthode de Folin-Ciocalteu a été sollicité par rapport aux autres [44].

Plus de 800 structures de composés phénoliques considérées comme métabolites secondaires ont été caractérisées et largement distribuées jusqu'aujourd'hui dans le monde végétal. Elles sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs noyau benzénique lié par des fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction tels que : éther, hétéroside, ester… [45]. Ces composés végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse (Figure I.7) [46] :

- ✓ La voie la plus courante des phénylpropanoïdes ($C_6$-$C_3$) via l'acide shikimique qui conduit à la synthèse des oses aux certains acides aminés aromatiques (L-phénylalanine et/ou L-tyrosine), puis par désamination de ces derniers conduit à la formation des acides cinnamiques et leurs dérivés comme les coumarines.
- ✓ La voie des flavonoïdes, combinant la voie des phénylpropanoïdes et celle de l'acide acétique conduisant à la formation des polyacétates. Les acides benzoïques, composés en $C_6$-$C_1$, sont issus de la dégradation oxydante des acides cinnamiques ou *p*-hydroxy-cinnamiques ce qui conduit à la formation d'acides hydroxybenzoïques. L'élaboration du squelette flavonoïde ($C_6$-$C_3$-$C_6$) est effectuée par la chalcone synthase. Pour que cette enzyme soit fonctionnelle, il faut que l'acide *p*-coumarique soit activé sous la forme d'acide *p*-coumarique-Coenzyme A par une CoA-ligase non spécifique. Le précurseur ainsi activé pourra réagir avec trois molécules de malonyl-CoA. Par la suite, la cyclisation du triacétate s'effectue selon la réaction de Claisen et conduit à la formation d'une chalcone, la 4,2′,4′,6′-tétrahydroxychalcone [46]. Une cyclisation conduira à l'obtention du noyau flavone, intermédiaire de la synthèse des flavonoïdes, des tanins condensés et des anthocyanes.

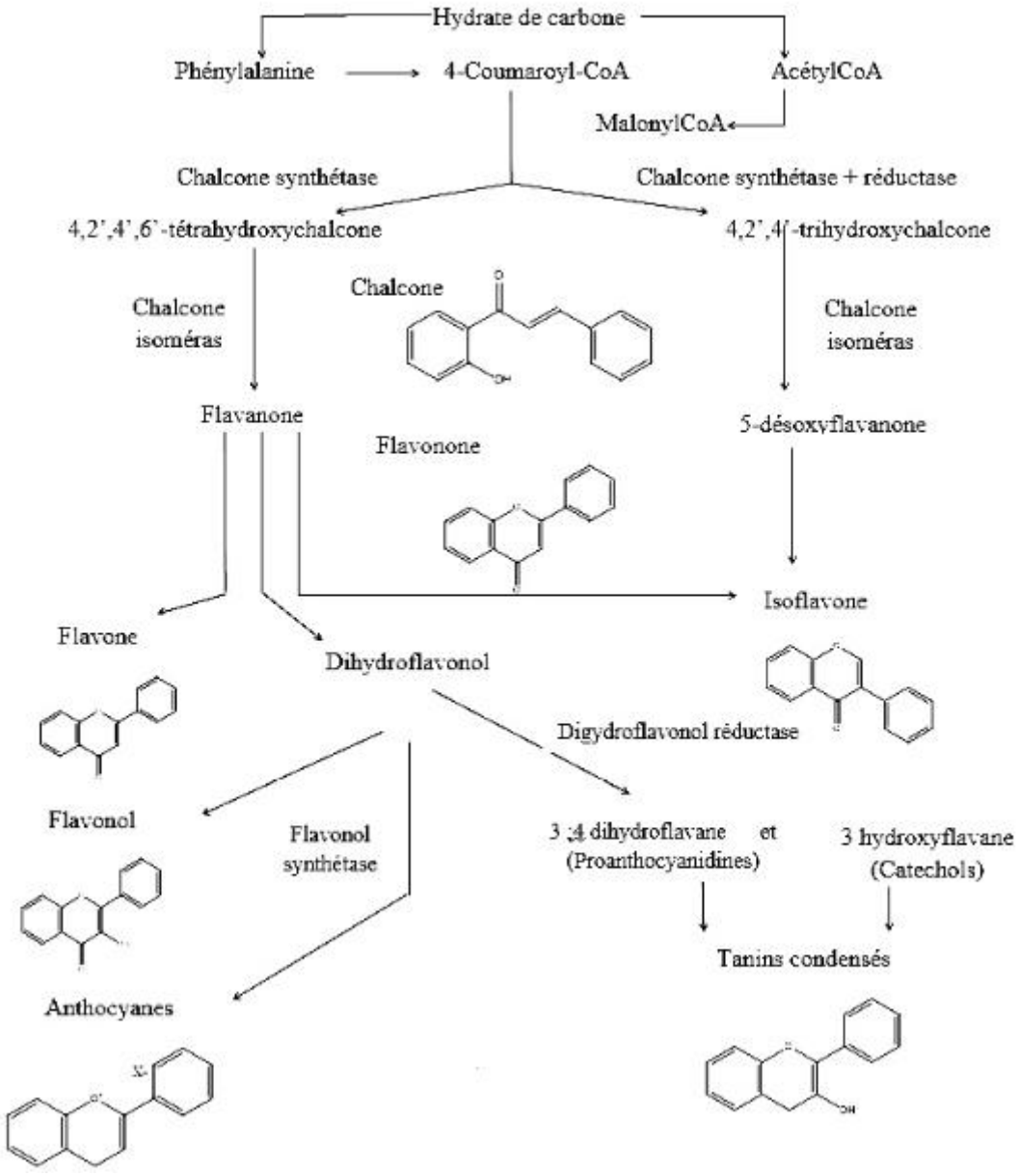


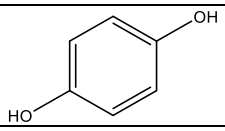
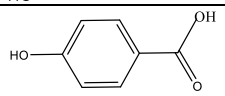
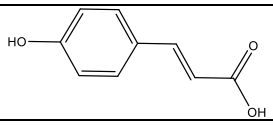
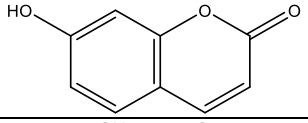
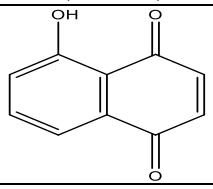
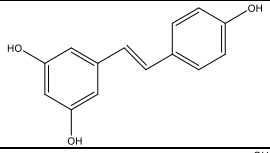
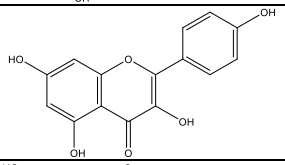
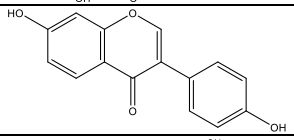
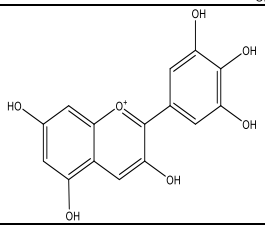

**Figure I.7** : Voie biosynthétique des flavonoïdes (Remsey 1996).

I.4.4.1 ***Flavonoïdes et principales classes de composés phénoliques***

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux: flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylium, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes…

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [46]. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes [47], et leur nombre ne cesse d'accroitre. Ainsi, on peut définir les flavonoïdes comme étant des composés présentant en commun la structure en $C_{15}$ ($C_6$-$C_3$-$C_6$ du diphénylpropane), les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [48]. Les structures des flavonoïdes sont illustrées dans le tableau I.3.

**Tableau I.3** Principales classes de composés phénoliques

| Squelette carboné | Classe | Exemple | Formule | Origine |
|---|---|---|---|---|
| $C_6$ | Phénol simple | Hydroquinone |  | Busserole |
| $C_6$-$C_1$ | Acides hydroxy-benzoïques | Acide p-hydroxy benzoïque |  | Epices, fraises |
| $C_6$-$C_3$ | Acide hydroxy-cinnamiques | Acide p-coumarique |  | Tomates, ail |
| | Coumarines | Ombellifèrone |  | Carottes, coriandre |
| $C_6$-$C_4$ | Naphtoquinones | Juglone |  | Noix |
| $C_6$-$C_2$-$C_6$ | Stilbénoïdes | Trans-resvératrol |  | Raisin |
| $C_6$-$C_3$-$C_6$ | Flavonoïdes | kaempférol |  | Fraises |
| | Isoflavonoïdes | Daidzéine |  | Graines de Soja |
| | Anthocyanes | Delphinidol |  | Raisin Cabernet-Sauvignon |
| $(C_6$-$C_3)_2$ | Lignanes | Entérodiol | | Bactéries intestinales |
| $(C_6$-$C_3)_n$ | Lignines | | | Bois, fruits à noyaux |
| $C_6$-$C_3$-$C_6)n$ | Tanins condensés | Procyanidol | | Raisin, Kaki |

### 1.4.4. Relation structure- activité des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activité antimicrobienne importante, probablement due à leur diversité structurale (aromaticité, groupements hydroxyles polaires, électrons ‘n’ conjugués

avec les doubles liaisons π). Les sites et le nombre des groupements hydroxyles sur les constituants phénoliques sont supposés être reliés à leur toxicité relative envers les microorganismes avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires et engendrer des complexes avec les parois cellulaires bactériennes. Les quinones et les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également rompre les membranes microbiennes [49]. Ainsi des études ont montré que les flavonoïdes et leurs métabolites dépendent essentiellement de leur nombre et de la position de leur groupement fonctionnel [50,51]. Les flavan-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention due à la fois à leur large spectre antimicrobien et à leur forte activité par rapport aux autres polyphénols, et aussi bien à leur capacité de d'éliminer un bon nombre de facteurs de virulence microbienne (inhibition de la formation de biofilms, réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte, neutralisation des toxines bactériennes) ainsi qu'à leur capacité d'agir en synergie avec certains antibiotiques [52].

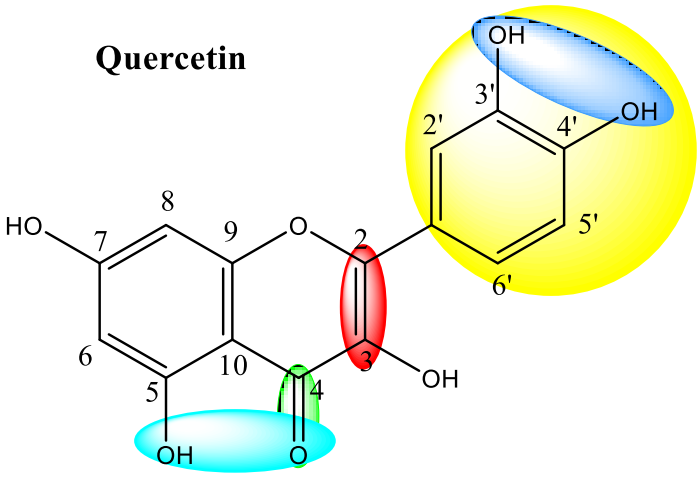
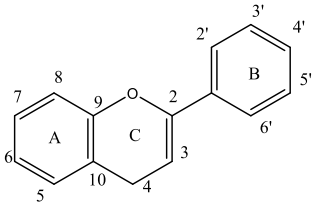



Figure I.8 : Groupements responsables de l'activité antioxydante chez les flavon-3-ols

1. 3-O-Glycosylation
2. Obstacles stériques à $C_3$
3. Substituents hydrophobes

**Diminution de 'activité** ⟸




**Augmentation de L'activité** ⟹

1. les groupes OH aromatiques (spéciallement 3- et 5-OH
2. substituant ortho-dihydroxy sur le cycle B
3. Subsituant 4-Oxo
4. Insaturation $\Delta^{2.3}$

**Figure I.9** Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libre [53]

## C- Composés phénoliques des six plantes

Les plantes synthétisent une gamme très vaste de composés organiques qui sont traditionnellement considérés comme métabolites primaires et secondaires, bien que les limites précises entre les deux groupes peuvent, dans certains cas, être un peu ambigües [54]. Les métabolites primaires sont les composés qui ont des rôles essentiels liés à la photosynthèse. Il s'agit notamment des phytostérols, des lipides acylés, des nucléotides, des acides aminés et acides organiques.

Les autres composés phytochimiques, s'accumulent en concentrations élevées dans certaines espèces, et sont considérés comme des métabolites secondaires. Ceux-ci ont des structures diverses et nombreuses et sont répartis entre un nombre très limité d'espèces dans le règne végétal. Le nombre de structures décrites dépasse 100 000 et le nombre réel dans la nature est certainement beaucoup plus élevé parce que jusqu'à présent, seulement 20-30% des plantes ont été étudiées en phytochimie [55]. Bien ignoré pendant longtemps, leur fonction dans les plantes attire de plus en plus l'attention car certains métabolites semblent avoir un rôle clé dans la protection des plantes contre les herbivores et les infections microbiennes, comme attractifs pour les pollinisateurs. Les métabolites secondaires sont d'un grand intérêt en raison de leur utilisation comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, dans le domaine de parfumerie, et comme source potentielle de nouveaux médicaments naturels (alcaloîdes, taxol…), antibiotiques, insecticides et herbicides [56].

Ces dernières années, le rôle de certains métabolites secondaires comme conservateur alimentaires est devenu de plus en plus attractif vis-à-vis des industries agroalimentaires. Ils permettent la prévention de cancers et de nombreuses maladies chroniques, comme les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II. Plusieurs méthodes sont disponibles dans la littérature permettant la quantification des métabolites secondaires des plantes, basée sur leurs origines biosynthétiques. Ces métabolites peuvent être divisés en trois grandes classes: composés phénoliques et polyphénoliques (flavonoïdes…), les terpénoïdes, les alcaloïdes et composés soufrés.

### 2.1. Composés phénoliques de *Punica granatum* et techniques analytiques appropriées

**.** *Composés phénoliques de Punica granatum*

La grenade (*Punica granatum* L.) est une source intéressante de composés phénoliques en raison de leur présence dans différentes parties du fruit. Récemment, la grenade a connu de

plus en plus de popularité et regagné un intérêt majeur dans l'industrie alimentaire en raison de ses propriétés antioxydantes et de ses avantages potentiels pour la santé humaine [56].

Les constituants de la grenade présentent une large gamme de bioactivité, présentant des propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes [57-60]. La vitamine C et les composés phénoliques (anthocyanes, acides phénoliques, flavonoïdes et ellagitanins) sont considérés comme responsables des propriétés antioxydantes de la grenade [56,61].

Plusieurs études ont rapporté la présence des molécules bioactives dans les différentes parties de la plante [62–64]. Compte tenu de sa teneur en molécules bioactives, ce matériau est considéré comme une source potentielle pour les compléments alimentaires et nutraceutiques industriels [65].

De nombreuses études se sont intéressées à la composition chimique des parties de la grenade (polyphénols). Elle est constituée principalement d'anthocyanes et de tannins hydrolysables, qui varient selon la nature des cultivars et dépendent des régions de production et des conditions de culture [66]. L'analyse des composés phénoliques du jus de grenade dans différents cultivars d'Espagne a été récemment rapportée. Sur les 53 composés phénoliques identifiés, 20 sont sous forme de tannins hydrolysables, 15 sous forme de dérivés d'acide phénolique, 12 de type flavonoïdes non colorés, 4 dérivés de lignanes et enfin 2 sous forme d'acides phénoliques [67].

Quant à la partie écorce considérée comme déchet de la biomasse agricole, elle présente une capacité antioxydante plus élevée que la portion comestible [65]. Les écorces de grenade sont très riches en phénols, particulièrement les ellagitanins (Figure I.10) (punicalagine : anomère α et β) [68]. Les semences sont également une source des molécules bioactives, bien qu'elles soient moins étudiées en raison de leur petite taille et la procédure difficile de récupération et d'isolement [69].

**.** *Techniques analytiques appropriées pour l'analyse* de *Punica granatum*

Les quantifications des composés phénoliques issus des extraits de grenade ont été réalisées soit par chromatographie liquide à haute performance HPLC-DAD, et/ou par couplage chromatographie-spectrométrie de masse (CLHP/SM, CLHP/SM/SM). LC/SM avec mode ESI (par le biais d'une interface d'ionisation par électrospray) (HPLC/SM-ESI) [70] ou MALDI-TOF (désorption/ionisation par laser matricielle assistée par la méthode des temps morts) pour déterminer en particulier les structures des oligomères de tanins [71]. Au cours des dernières années, la chromatographie liquide à ultra-performance (UPLC) a été également essayée [72].

D'autres études visaient à développer et à valider la procédure analytique des composés phénoliques contenus dans les extraits de grenade en utilisant des méthodes basées sur la chromatographie liquide [73].

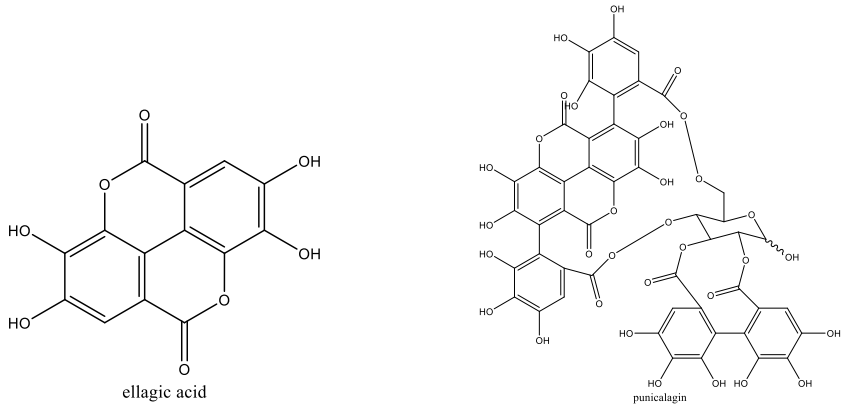



**Figure I.10:** Structures chimiques des principaux composés phénoliques de *Punica granatum* (acide ellagique et Punicalagine)

### *2.2.* Composés phénoliques de *Rubia tinctorum*

Les constituants phénoliques les plus importants des racines de la plante *Rubia tinctorum* appartiennent à la famille des anthraquinones. L'alizarine (la plus connue d'entre eux) a été isolée pour la première fois par Colin et Robiquet en 1826 [74], ce n'est qu'en 1868 que Graebe et Liebermann ont déduit sa structure chimique par destination de la poussière de zinc. Leur hypothèse a été vérifiée en effectuant sa synthèse organique. Ces mêmes auteurs ont breveté sa synthèse chimique améliorée en 1869. Après ce premier isolement et détermination structurale de *R. tinctorum*, nombreuses anthraquinones ont été isolées de *R. tinctorum,* on peut citer à titre d'exemple : purpurine, munjistine, rubiadine, pseudopurpurine, nordamnacanthal, lucidine, xanthopurpurine et anthragallol.

Les anthraquinones extraites des racines de *R. tinctorum* sont souvent liées à des molécules de sucre (glycosides). L'acide ruberythrique (alizarine aglycone + disaccharide) a été isolé pour la première fois sous forme cristalline par Rochleder en 1851 [75], et sa fraction de sucre disaccharide a été identifiée comme étant du primeverose, un disaccharide comportant du xylose et glucose [76]. On peut citer aussi la lucidine glycosidique. Schweppe énumère dans sa revue les glycosides : galiosine (pseudopurpurine 1-B-primeveroside), rubiadine 3-Bprimeveroside, rubiadine glucoside et rubianine (C-glucoside) [77]. Après l'alizarine, la purpurine a été identifiée [78]; en suggérant qu'elle est le résultat de décarboxylation de la pseudopurpurine lors du séchage des racines [79]. Il serait intéressant de noter que malgré les

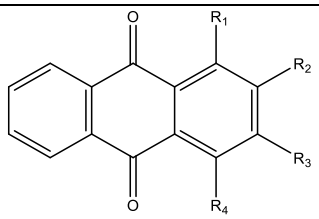
concentrations élevées de lucidine primeveroside dans les racines [80-82], la forme aglycone de lucidine est rarement détectée (état de traces) [81,83]). Il est à noter aussi que la munjistine (aglycone) a été observée dans les racines, tandis que sa forme hétéroside (glucosidique) n'a été détectée que dans la cas de la garance japonaise (*Rubia akane Nakai*) [81,83].

Récemment plusieurs études ont confirmé la présence de constituants anthraquinoniques primaires dans *R. tinctorum* comme les glycosides d'acide rubérythrique, lucidine et primeveroside [82-84]. La majorité de la littérature a évoqué que l'alizarine est le principal constituant anthraquinonique présent, avec une concentration beaucoup plus faible que son homologue glycosidique [80-82]. L'acide rubrique a été isolé pour la première fois à partir de la garance (espèce asiatique non spécifiée) par Rochleder en 1851 [85] ; Schunck a ensuite démontré que le glycoside pouvait être hydrolysé en alizarine après catalyse par des enzymes appelées "erythrozyme" [86]. Le Rubiadin et le primeveroside sont aussi présents mais en très faibles concentrations dans les racines (< 2%) [80], ainsi que la galiosine et le pseudopurpurine glucosidique [81,83].

Certaines anthraquinones isolées de *R. tinctorum* sont considérées comme des artefacts, cas des anthraquinones montrant la présence d'un groupement 2-méthoxyméthyl ou 2-éthoxyméthyl. Ces anthraquinones ont été formées lors de l'extraction de la lucidine avec du méthanol ou éthanol bouillant [87]. Selon Schweppe, l'anthraquinone purpurine (1,2,4-trihydroxyanthraquinone) et la purpuroxanthine (1,3-dihydroxyanthaquinone) sont formées respectivement lors du séchage des racines à partir de pseudopurpurine (3-carboxy1,2,4-trihydroxyanthraquinone) et de munjistine (2-carboxy-l,3-dihydroxyanthraquinone) [88].

D'autres composés n'appartenant pas à la famille des anthraquinones ont été aussi identifiés dans la garance, cas de l'acide citrique [75,89], des coumarines (scopoletin), des dérivés de l'acide cinnamique (hexadecyl ferylate, octadecyl ferulate, eicosyl ferulate) et des composés naphtoquinones methylether de lapachol (Kawasaki et al 1992) [90]. Les flavonoïdes (hyperoside) et rutine sont aussi présents dans les racines [91], ainsi que l'acide asperulosidique et monotropein [92]. Les différentes structures chimiques issues des racines de *Rubia tinctorum* sont illustrées dans le tableau I.4.

**Tableau I.4 :** Structures chimiques des constituants ‘‘anthraquinones’’ présents dans les racines de *Rubia tinctorum*




| Composés | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| acide ruberythrique | OH | OGlc +Xyl | H | H | [80-84,93] |
| Alizarin | OH | OH | H | H | [80-84,93] |
| lucidin primeveroside | OH | $CH_2OH$ | OGlc + Xyl | H | [80-84,93] |
| Lucidin | OH | $CH_2OH$ | OH | H | [80-84] |
| Nordamnacanthal | OH | CHO | OH | H | [81,83] |
| Munjistin | OH | COOH | OH | H | [81,83] |
| Xanthopurpurin | OH | H | OH | H | [81,83] |
| Galiosin | OH | COOH | OH | OGlc + Xyl | [81,83] |
| pseudopurpurin glucoside | OH | COOH | OH | OGlc | [81,83] |
| Pseudopurpurin | OH | COOH | OH | OH | [81,83,84] |
| Purpurin | OH | H | OH | OH | [81,83] |
| rubiadin primeveroside | OH | $CH_3$ | OGlc + Xyl | H | [80, 81] |
| Rubiadin | OH | $CH_3$ | OH | H | [80, 11] |
| 1-hydroxy-2-méthyl-AQ | OH | $CH_3$ | H | H | [94] |
| 2-hydroxy-AQ | H | OH | H | H | [80] |
| 2-(hydroxy méthyl)-AQ | H | $CH_2OH$ | H | H | [81] |
| Anthragallol | OH | OH | OH | H | [95] |

AQ : anthraquinone, Glc: glucose , Xyl: xylose.

### *2.3.* Composés phénoliques de *Papaver rhoeas*

*Papaver rhoeas* est utilisé depuis l'Antiquité comme ingrédient alimentaire et remède traditionnel. La couleur rouge des pétales de pavot est due à la présence d'anthocyanines dont le cyanidol est le constituant majeur [96]. D'autres études en rapport avec les extraits hydro-alcooliques ont permis de déterminer la présence de rutine, vitexine, malvidine, coumarine et lutéolinidine [97].

Deux nouveaux dépsides ont été isolés à partir de pétales comme l’acide 2-O-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphénylacétique et l’acide 2-O-(4-hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphénylacétique ainsi que l'acide *p*-hydroxybenzoïque. D’autres dérivés méthylés

ont aussi été isolés comme le 2-(4-hydroxyphényl)-éthanol [98], ester de l'acide protocatéchuique et le 2-(3,4-dihydroxyphényl)-éthanol). En outre, l'extrait méthanolique a montré la présence des flavonoïdes de type kaempferol, quercétine, hypolaétine et lutéoline ainsi que les flavonoïdes glycosidioques: isoquercitrine, astragaline et hyperoside [98].

Les alcaloïdes sont les métabolites les plus représentatifs de cette famille des Papaveracées. Le principal alcaloïde isolé des parties aériennes est le (+)-rhoeadine. D'autres alcaloïdes en faible quantité ont aussi été isolés comme l'allocryptopine, la protopine, la coulteropine, la berbérine, la coptisine, la (-)-sinactine, la (+)-isocorydine, la (+)-roémérine, la (+)-rhoeagenine et la sanguinarine [99-103]. En 2017, Çoban et al. [104] ont rapporté la présence d'autres alcaloîdes comme la mécambrine, la salutaridine, la glaucamine, la glaudine, l'épiglaucamine, l'isorhoéadine et l'isorhoéagénine. Une autre étude a montré la présence d'autres alcaloïdes de la famille des protopines : stylopine, canadine, sinactine, berbérine et épibérine [105]. Les alcaloïdes protopine coulteropine ont été considérés comme caractéristiques du genre de Romneya, isolés pour la première fois [106]. Il apparaît que le *Papaver rhoeas* L. est variable dans sa composition chimique en alcaloïde, donnant lieu à différents types de chémotypes [107]. Les principaaux alcaloïdes isolés se sont avérés être la rhoeadine [99,106], la N-méthylasimilobine [108] ou la rhoeagenine [109], l'épiberberine et canadine [105] qui dépendent selon la nature et la source végétale. Les alcaloïdes minoritaires sont principalement la protopine, l'isorhoeadine, l'isorhoeagine et papaverrubines [110].

Trichopoulou et al. [111] ont analysé le pavot à maïs après hydrolyse acide pour évaluer sa teneur en flavonols et flavones. L'analyse qualitative et quantitative a été effectuée par chromatographie HPLC-DAD. Les composés identifiés étaient des flavonoïdes dont la quercétine est le constituant prédominant, les autres composés sont le Kaempférol, myrercétine, l'isorhamnetin, la lutéoline, et l'apigénine.

Dans le cas des feuilles de pavot, la composition chimique a montré la présence de la vitamine E, du bêta-carotène et de la vitamine C [112]. Les macro-éléments de type potassium et calcium ont été aussi présents. Les teneurs en protéines, en fibres alimentaires, en cendres, en glucides et en lipides ont aussi été déterminées. Les lipides étaient représentés principalement par les acides gras polyinsaturés de type linoléique et α-linolénique. La demande croissante de la consommation des plantes comestibles a suscité des études au niveau de leur composition chimique. Ainsi, Morales et al. 2014 [113] ont montré que le *P. rhoeas* récolté en Espagne est riche aussi bien en vitamine C (acide ascorbique et acide déshydroascorbique) qu'en vitamine E (tocophérols et tocotriénols) et en acides organiques. Le pavot à maïs a été considéré

comme une très bonne source en vitamines C et E, et a montré des propriétés antioxydantes intéressantes.

Récemment, Grauso et al. [114] ont permis l'identification et la quantification par couplage CG-SM et RMN des principales classes chimiques illustrées dans la figure I.10. Les extraits organiques non polaires étaient composés principalement des acides gras suivants : acide palmitique, acide stéarique et acide oléique, tandis que les polaires, ils sont constitués d'un mélange d'acides organiques et de sucres comme principaux métabolites, accompagnés d'acides aminés, de dérivés d'acides caféoyle, de flavonoïdes et de nucléotides. En outre, une quantité importante en acide glycérique (55,7 %) était détectée dans l'extrait total de la plante.

Les principaux composés contenus dans les extraits de *P. rhoeas* sont illustrés dans la figure I.10.

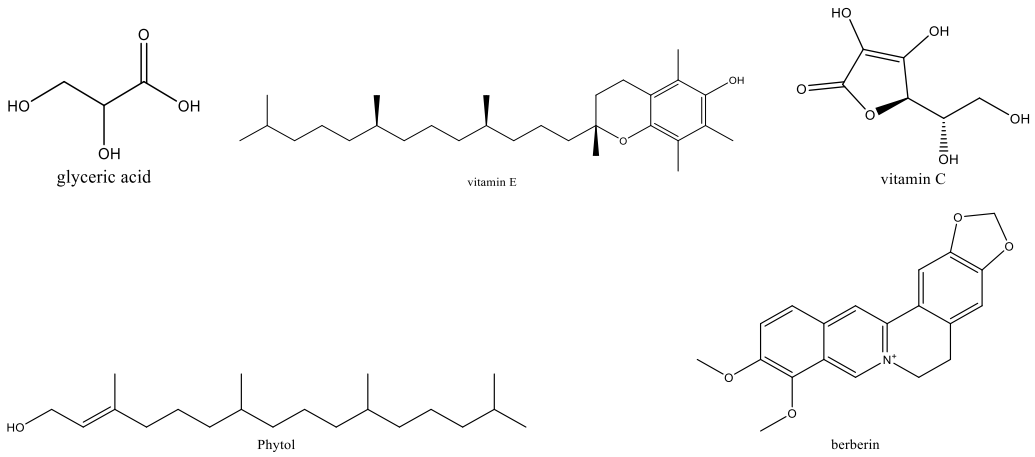



**Figure I.10** Structures chimiques des principaux composés trouvés dans la composition de *Papaver rhoeas.*

### 2.4. Composés phénoliques d'*Hibiscus sabdariffa*

Nombreuses études pharmacologiques et cliniques supportent les allégations sanitaires et thérapeutiques d'*Hibiscus s.* en raison de la présence de composés bioactifs à base de phénoles [115-117]. Les anthocyanes font partie des composés trouvés chez l'*Hibiscus s.* et sont responsables de la coloration dans cette plante. Le delphinidin-3-sambubioside (hibiscine) et le cyanidin-3-sambubioside (gossypicyanine) constituent les anthocyanes les plus prépondérants dans les feuilles [116].

Des acides phénoliques ont été également détectés dans les extraits, comme l'acide chlorogénique (principal acide phénolique) et ses deux isomères, le cryptochlorogène et l'acide néochlorogénique [118]. La présence de ces composés a été rapportée par plusieurs

études [119-122]. D'autres types d'acides phénoliques comme l'acide coumarylquinique et l'acide 5-O-caféoylshikimique étaient confirmé aussi par Alañón et al. [118].

Les acides succiniques et oxaliques constituent les deux acides organiques majoritaires de *H. sabdariffa* représentant 76 % des acides organiques totaux [123]. La présence de β-carotène et de lycopène à des concentrations respectives de 1,9 mg par 100 g et 164,3 µg par 100 g de matière fraîche a été signalée dans le cas des calices de *H. sabdariffa* [124], aussi bien dans les mucilages et les pectines [125]. Lin et *al.* Ont montré aussi la présence d'acide protocatechique et de composés polyphénoliques dans les calices secs [126].

Quant aux flavonoïdes, la quercétine et ses conjugués glucosidiques ainsi que la rutinoside et sambubioside ont été détectées dans tous les extraits. D'autres flavonoïdes ont été identifiés tel le cas de la myricétine et du kaempférol ainsi que leur arabinogalactoside et sambubioside respectifs.

Certains composés chimiques contenus dans les extraits d' *H. sabdariffa* sont regroupés dans la figure I.11.

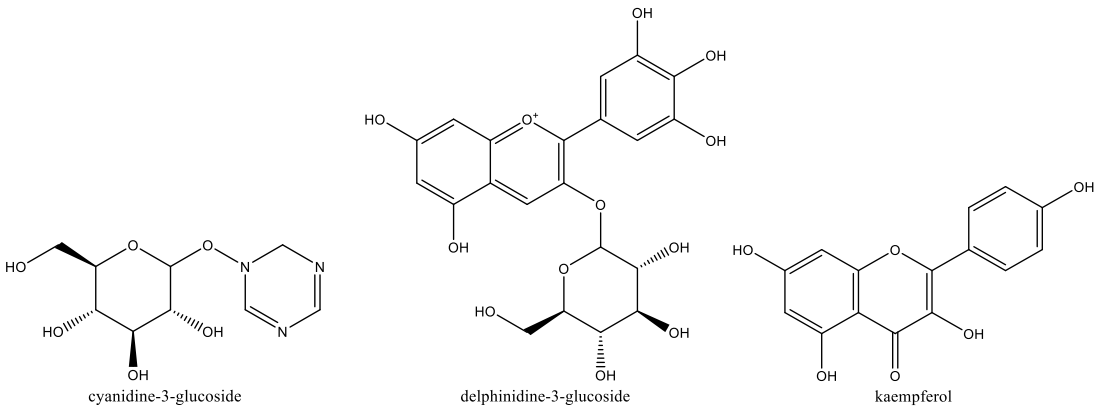



**Figure I.11** Structures chimiques des principaux composés phénoliques constituants d'*Hibiscus sabdariffa*.

### *2.5.* Composés phénoliques de *Quercus ilex*

Les espèces de *Quercus* contiennent plusieurs types de phyto-produits qui varient selon la nature de l'espèce étudiée. On peut citer à titre d'exemple les composés phénoliques rencontrés sous forme de glycosides [127], les composés organiques volatils, les vitamines (vitamine E), les stérols, les alcools aliphatiques et les acides gras [128]. Les dérivés phénoliques (Figure I.12) constituent l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires chez les plantes et sont d'une grande importance en raison de leurs propriétés pharmacologiques et antioxydantes [129].

Ces composés présentent une grande diversité structurale allant des molécules simples de type acides phénoliques jusqu'aux polyphénols (stilbènes, flavonoïdes et dérivés de bio-polymères phénoliques comme lignine) [130]. L'étude des composés phénoliques contenus dans les espèces de *Quercus* a montré leur présence dans toutes les parties de la plante (feuilles, écorce). Dans les feuilles de *Quercus* blanc la présence d'ellagitanin est manifestée par la castalagine et la vescalagine [131], tandis que dans l'espèce de *Quercus* noire, ces composés se trouvent en quantités relativement plus faibles accompagnés par l'absence de leurs dérivés.

La plupart des composés phénoliques identifiés dans les espèces de *Quercus* sont des flavonoïdes et non- flavonoïdes, des composés phénoliques qui servent d'intermédiaires au métabolisme des phénylpropanoïdes par voie shikimate [132]. Les flavan-3-ols, les flavonols et les glucosides de kaempférol acylé ont été identifiés et quantifiés dans les extraits de *Q. ilex.* [133].

Les principaux composés phénoliques identifiés dans les feuilles des espèces de *Quercus* sont les acides (acide gallique, acide ellagique, acide protocatéchique, acide gentisque, acide chlorogénique, acide vanillique, acide syringique, acide caféique, acide p-coumarique et acide férulique), les flavonoïdes (rutine, quercétine, kaempférol, épicatéchine, naringénine, hespérétine, formononétine, naringine et tanins.

Les principaux composés phénoliques identifiés dans les extraits d'écorce de *Quercus* sont les acides phénoliques (acide caféique, acide ellagique, acide gallique et acide protocatéchique), les tanins (ellagitannins, roburins) et les flavonoïdes. D'autres composés ont été identifiés par Hosam et al. 2019 [134], sous forme de catéchines, épicatéchine, épigallocatéchine, gallate d'épigallocatéchine, ou sous forme d'acides organiques : acide caféique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, acide protocatéchuique et acide vanillique. Les espèces de *Quercus* produisent un fruit très connu qui est le gland [127], utilisé traditionnellement dans l'alimentation animale.

La composition chimique de certains constituants de *Q. ilex* est montrée dans la figure I.12.

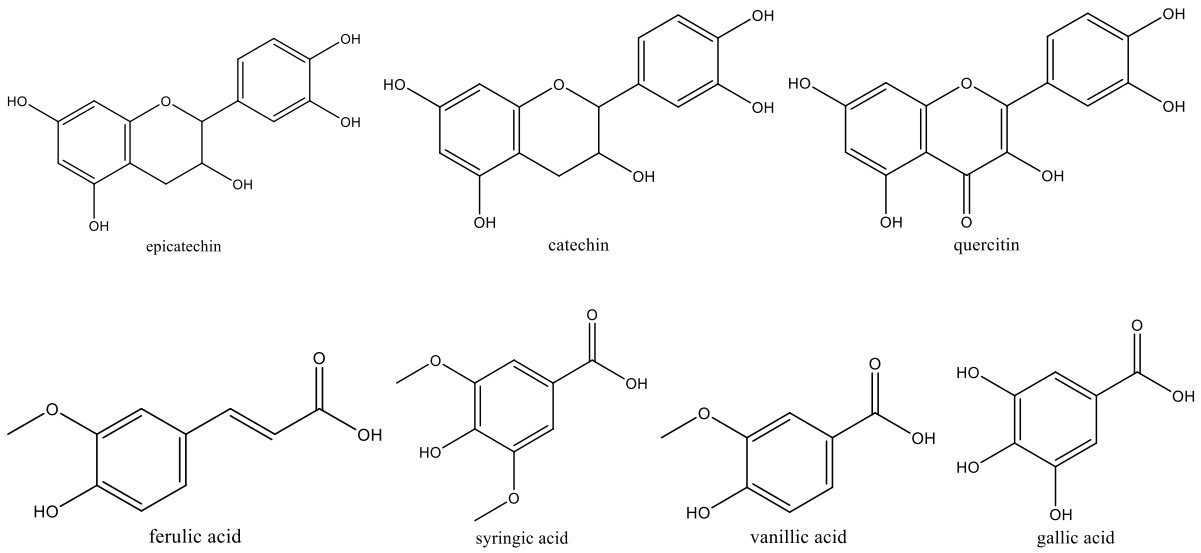



**Figure I.12** Structures chimiques des principaux composés phénoliques constituants de *Quercus ilex.*

### 2.6. Composés phénoliques de *Lawsonia inermis*

Des études phytochimiques de l'extrait des feuilles de *L. inermis* ont montré la présence d'une centaine de métabolites secondaires, de nature chimique diverse, dont les coumarines, les flavonoïdes, les naphtoquinones, les quinoides, les dérivés du naphtalène, les triterpénoïdes, les acides organiques, les xanthones et les glycosides phénoliques [135-138].

Les composés phénoliques isolés des extraits de *L. inermis* peuvent être énumérés comme suite : lawsoniaside (1,3,4- trihydroxynaphtalène-1,4-di-β-D-gluco-pyronoside), lalioside (2,3,4,6-tétrahydroxyacétoxy-2-β-D-glucopyranoside), lawsoniaside B (3-(4-O-a-D glucopyranosyl-3,5-diméthoxyphényl-2E-propénol)), syringinoside, daphneside, daphnorine, agrimonolide 6-O-β-D-glucopyranoside, (+)-syringaresinol-O-β-D-glucopyranoside, (+)-pinoresinol-di-O-β-D-glucopyranoside, syringaresinol-di-O-β-D-glucopyranoside et isoscutellarine [139,140].

Quant aux flavonoïdes isolés, leur présence a été manifestée par les constituants suivants sous forme d'aglycone ou hétéroside: apigénine, apigénine-7-glucoside, apigénine-4-glycoside, apigénine-4'-O-β-D-glucopyranoside, lutéoline, lutéoline-7-glucoside, lutéoline-3-glucoside, kampférol, quercétine, isoscutellarine, tricine, kaempférine, isoquercitrine, (-)-catéchine, 7-hydroxy-3,5-diméthoxy-6,8-diméthyl flavone, 3,7,4',5'-tétrahydroxy-6-méthoxyflavone et 4'-hydroxyflavanone [141-143]. D'autres composés comme la coumarine (5-allyoxy-7-hydroxycoumarine), et carbonates A et B ont été aussi isolés [144].

Différents solvants ont été utilisés lors de l'extraction des feuilles, entre autres le méthanol. Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés anti-oxydantes et l'effet antimicrobien des dérivés de la naphtoquinone (Lawsone), aux effets leishmanicide et antiviral (lapachol : 4-hydroxy-3-(3-m'ethylbut-2-'enyl) naphtalène-1,2-dione), ainsi qu'aux effets anti-mélanome métastatique *in vitro* (plumbagin : la 5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphtoquinone) [139,145].

La Lawsone est un pigment organique considéré comme le principal constituant des feuilles de *L. inermis*, responsable de la couleur utilisée aussi bien dans la teinture des cheveux, de la peau et des ongles [146] que dans la coloration des tissus de coton et de soie [147]. La concentration du constituant Lawsone contenue dans *L. inermis* (Lawsone) varie d'une région à l'autre et dépend des conditions de la culture et de la période de récolte.

Certains constituants chimiques de *L. inermis.* sont illustrés dans la figure I.13.

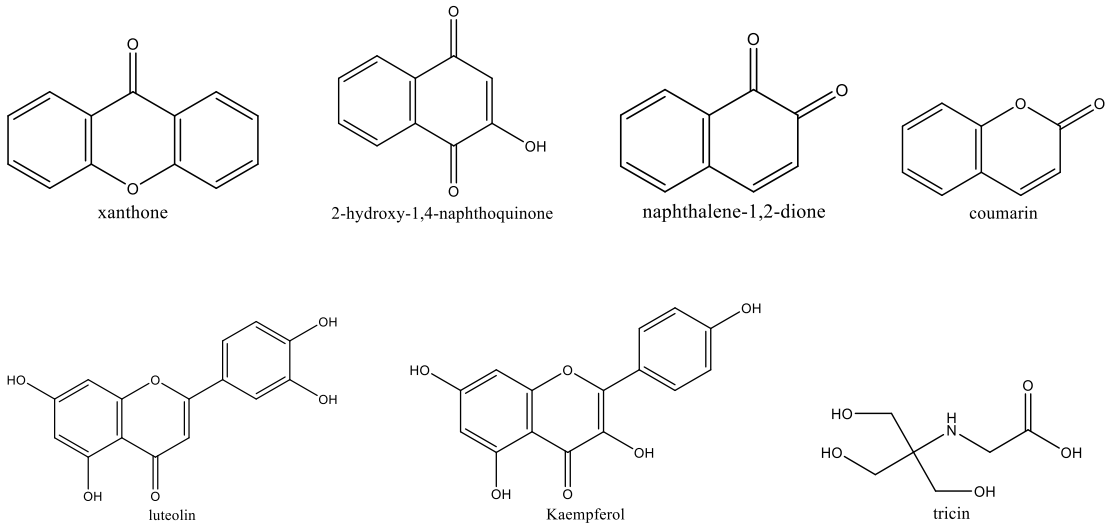



**Figure I.13** Structures chimiques des principaux constituants de *Lawsonia i.*.

## D- Généralités sur les méthodes d'extraction et de caractérisation des mélanges naturels

Pour extraire les produits naturels d'origine végétale (colorants, parfums, arômes…), plusieurs procédures d'extraction conventionnelles de laboratoire ont été développées : soxhlet [148-151], en mode batch [152,153] et par sonication [154,155]. Ces méthodes évoquées peuvent être transposées aussi dans les industries alimentaires au cours des procédés de production. Nombreuses sont les procédures d'extraction des polyphénols, on peut citer à titre d'exemple : la macération, les extractions assistés par ultrason, ou par micro-ondes, l'extraction par fluide

supercritique qui reste onéreuse, l'extraction de la phase solide (SPE) ou la microextraction en phase solide (SPME), et l'extraction au solvant par la méthode de soxhlet.

Cette dernière est considérée parmi les méthodes les plus classiques et la plus utilisée. Elle repose sur l'utilisation de différents types de solvants principalement polaires (le méthanol, l'éthanol, l'eau acidifiée, l'acétone, l'éther diéthylique, ou la combinaison de solvants binaires ou ternaires) permettant l'extraction des composés phénoliques [156-158]. Des procédures d'extraction de chimie verte ont été aussi essayées par plusieurs auteurs et optimisées en présence de l'eau comme solvant (non toxique et non polluant), tout en utilisant les techniques de micro-ondes et d'ultrasons pulsés afin d'extraire des composés phénoliques sans risque pour la santé humaine [159-161].

Récemment et pour un meilleur développement durable, l'extraction des composés phénoliques par des solvants inertes non polluants (non toxiques), repose sur des techniques d'extractions respectueuses de l'environnement utilisant des solvants écologiques (eau déionisée, ou solutions aqueuses de cyclodextrines) [162].

Actuellement bien que le méthanol soit considéré comme solvant toxique selon la littérature, il est le solvant le plus utilisé et le plus approprié dans l'extraction des polyphénols, utilisé afin d'obtenir des extraits riches en flavonones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères [163]. La combinaison de mélange binaire de solvant méthanol-eau (70-80%) a donné d'excellents rendements permettant l'extraction des flavones, flavonoles et catéchines à partir des fruits [164] et des légumes [165]. En augmentant davantage la polarité du milieu avec un mélange du solvant méthanol-eau (50 :50), ceci a permis d'extraire même des composés beaucoup plus polaires liés à des glycosides (formes hétérosides) [163].

### 1.3.1 Identification par UV des constituants de mélange naturel

Il existe plusieurs techniques qui permettent de faire l'identification de polyphénols telles que la spectrophotométrie d'absorption UV-Visible qui repose sur l'absorption des radiations lumineuses par la matière. Cette technique permet entre autre de quantifier les concentrations d'espèces chimiques en solution aqueuse ou en présence de solvants et de déterminer aussi leurs longueurs d'ondes d'absorption.

Les longueurs d'ondes d'absorption en UV des acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque), acides hydroxy-cinnamiques (dérivés de l'acide cinnamique) et flavonoïdes (structure $C_6$-$C_3$-$C_6$) sont illustrés dans le tableau I.5 [166] et le tableau I.6 [167].

**Tableau I.5** : Bandes d'absorption en UV de quelques flavonoïdes (d'après Mrakham 1982) [166].

| Types de flavonoïdes | Bande II (nm) | Bande I (nm) |
|---|---|---|
| **Flavones** | 250-280 | 310-350 |
| **Flavonols (3-OH substitué)** | 250-280 | 330-360 |
| **Flavonols (3-OH)** | 250-280 | 350-385 |
| **Isoflavones** | 245-275 | 310-330 |
| **Flavonones** | 230-270 | 300-330 |
| **Anthocyanidines** | 270-280 | 465-560 |

**Tableau I.6** : Information spectrale en UV de 39 composés phénoliques (acides hydroxy-phénoliques, acides hydroxy-cinnamiques et flavonoïdes) (d'après Jianping Sun et al. 2007) [167].

| Noms des composés | MW (g/mol) | Bandes UV (nm) |
|---|---|---|
| Acide hydroxybenzoïque | | |
| Acide gallique | 170 | 272 |
| Acide protocatéchuique | 154 | 260(max), 294 |
| Acide vanillique | 168 | 260(max), 294 |
| Acide syringique | 198 | 276 |
| Acide p-hydroxybenzoïque | 138 | 256 |
| Acide salicylique | 138 | 276 |
| Acide gentisique | 154 | 326(max), 300 |
| Acide hydroxycinnamique | | |
| Acide caféique | 180 | 324(max), 296 |
| Acide p-coumarique | 164 | 310 |
| Acide sinapique | 224 | 324 |
| Acide férulique | 194 | 324(max), 296 |
| Acide trans-cinnamique | 148 | 278 |
| Acide chlorogénique | 354 | 326(max), 300 |
| Flavan-3-ols | | |
| (+)-catéchine | 290 | 280 |
| (-)-Epicatéchine | 290 | 280 |
| (-)-Gallocatéchine gallate | 458 | 276 |
| (-)-Epigallocatéchine gallate | 458 | 276 |
| (-)-Epicatéchine gallate | 442 | 278 |
| (-)-Gallocatéchine | 306 | 274 |
| (-)-Epigallocatéchine | 306 | 274 |
| Procyanidine B1 | 578 | 280 |
| Procyanidine B2 | 578 | 280 |
| Flavonol et glycosides de flavonol | | |
| Quercétine | 302 | 256(max), 372 |
| Myricétine | 318 | 256(max), 374 |
| Kampferol | 286 | 266(max), 366 |
| Morin | 302 | 256(max), 354 |
| Rutine | 610 | 256(max), 356 |
| Quercitrine | 448 | 256(max), 352 |
| Hyperoside | 464 | 256(max), 356 |
| (±)-Taxifoline | 304 | 288 |
| Flavanone et glycoside de flavanone | | |
| Hesperetine | 302,3 | 288 |
| Neohesperidine | 610,6 | 288 |
| (±)-Naringenine | 272,3 | 290 |
| Naringine | 580 | 284 |
| Leutoline | 286 | 348 |

## E- Activités antioxydantes

### I.4 Stress oxydant et antioxydants

Le stress oxydant est définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants [168], que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes antioxydantes [169] ou une surproduction des radicaux libres [170].

#### *1.4.1 Radicaux libres*

Les radicaux libres sont connus dans la chimie depuis le début du 20$^{ème}$ siècle. Ils ont été initialement utilisés pour décrire des composés intermédiaires en chimie organique et inorganique [171]. Ce sont des molécules ou fragments de molécules très réactifs du fait qu'ils contiennent des électrons non appariés dans leur orbitale externe [172], cherchant à atteindre un état de stabilité via des formes limites de résonance, en s'appropriant des électrons des molécules proches qui à leur tour deviennent instables [173].

##### *1.4.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)*

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants [174]. Ce sont des molécules très réactives qui sont constamment produites par des réactions enzymatiques dans les cellules [175]. Il existe plusieurs ERO comme le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) [176].

##### *1.4.1.2 Radicaux dérivés d'azote (ERN)*

Contrairement aux ERO, il y a peu de données sur l'altération induite par les espèces réactives de l'azote) [177], elles sont considérées comme une sous-classe des radicaux libres qui sont générés par la réaction de l'oxygène avec l'azote [172]. Les ERN incluent des espèces non radicalaires (acide nitreux, le péroxynitrite et alkylpéroxynitritate) et des espèces radicalaires (l'oxyde nitrique et le dioxyde d'azote).

Les ERO et les ERN sont produits dans toutes les cellules et jouent des rôles importants dans la physiologie des cellules, comme le déclenchement des réponses antioxydantes, la migration, la prolifération cellulaire normale, le métabolisme, l'expression de gènes, la mort cellulaire programmée, la sénescence [178], la différentiation cellulaire, l'immunité et la défense contre les microorganismes [179]. De même, l'oxyde nitrique est un signal important dans divers événements physiologiques dans les plantes comme la germination, le

développement des racines, la fermeture des stomates, la floraison, la formation des nodules, la sénescence des feuilles, la mort cellulaire et la défense des plantes contre le stress abiotique et biotique [177]. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent être impliqués dans la production de l'espèce réactive telle que le tabac, l'alcool, la pollution, les toxines exogènes, ozone et les métaux toxiques [180,181].

Des effets et des conséquences biochimiques très graves du stress oxydant sur la santé**,** il s'agit des modifications des macromolécules cellulaires modifiant les fonctions des cellules et conduisant à la mort cellulaire [182] :

- ✓ Actions sur l'ADN, effectuant des modifications peuvent conduire à des mutations génétiques affectant les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs [183].
- ✓ Modifications sur les protéines peuvent conduire à diverses conséquences fonctionnelles telles que l'inhibition des activités enzymatiques, une susceptibilité accrue à l'agglomération et la protéolyse, l'augmentation ou la diminution de l'absorption cellulaire [184,185].
- ✓ Peroxydation des lipides implique la destruction des lipides membranaires, des troubles métaboliques et inflammatoires, la formation et la propagation des radicaux lipidiques avec de nombreux effets délétères [186] comme le malondialdéhyde (MDA) qui est un produit caractéristique de ce processus) [187].
- ✓ Action sur les carbohydrates conduit à des ruptures dans la chaîne des molécules importantes comme l'acide hyaluronique dans le liquide synovial entourant les articulations [188].

Pour contrôler la production permanente des espèces réactives, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages de ces radicaux [189]. Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes ou proviennent de l'alimentation ou la médication et sont donc exogènes (antioxydants synthétiques, vitamine C et E, caroténoïdes et polyphénols).

Les antioxydants sont un groupe de composés qui sont définis par leur capacité générale à diminuer ou retarder les réactions d'oxydation. Il est reconnu que les antioxydants alimentaires ont la capacité d'inhiber la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN), qui peuvent nuire aux processus cellulaires et aux fonctions physiologiques normales [190]. Dans des conditions normales, l'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres est maintenu par des enzymes endogènes (par exemple, glutathion peroxydases, catalase et superoxyde dismutases, thioredoxine réductase

et hémi oxygénase) et une foule de composants non enzymatiques (certains métaux, le glutathion, les thiols, certaines vitamines et des substances phytochimiques, notamment les flavonoïdes et autres substances phénoliques). Bon nombre de ces composants peut être influencée par les habitudes alimentaires et les comportements [190].

L'éventail des classes chimiques de l'antioxydant est énorme et explique en partie pourquoi le regroupement des composés par leur capacité à interagir avec les composés réactifs de la ((ERO) et ERN) peuvent conduire à une simplification excessive et généralisation. D'où les descripteurs tels que "énigme". et "l'épée à double tranchant" sont souvent utilisés pour caractériser la relation entre les antioxydants et la santé. Une partie de la controverse découle des propriétés innées des (ERO) en tant une classe de composés biologiquement actifs qui peuvent influencer à la fois la prévention et la promotion des maladies. Bien que la génération de (ERO) avait été considérée comme principalement, ou uniquement, au détriment de la santé, les progrès de la recherche ont démontré que les (ERO) peuvent jouer un rôle crucial dans les processus physiologiques, y compris le fonctionnement en tant que croissance facteurs, influençant l'immunocompétence et initiant l'apoptose dans les cellules endommagées. Malgré ces fonctions bénéfiques de (ERO), de production anormale ou de régulation non homéostatique de (ERO) est liée au développement de nombreuses maladies et les affections associées, y compris le cancer et les maladies cardiovasculaires (MCV), ainsi qu'un certain nombre des maladies neurologiques et métaboliques.
Les composés phénoliques présentent une grande variété d'activités biologiques, dont la plupart sont des effets secondaires de l'activité antioxydante, qui a plusieurs mécanismes d'action proposés. L'idée générale est que les composés phénoliques peuvent fournir un électron ou à donner l'atome d'hydrogène entier, de la une liaison O-H, qui doit être transférée aux molécules de radicaux libres, transformant ainsi les radicaux libres en molécules inoffensives espèces. Ce processus transforme également le composé phénolique en un radical, avec un électron impair, mais parce que de la structure aromatique, l'électron impair a la possibilité d'être réparti sur toute la molécule, ce qui entraîne une stabilisation radicale [190].

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit comme "médicaments à base de plantes" les matières ou produits d'origine végétale présentant des avantages thérapeutiques ou autres pour l'homme, qui contiennent soit des matières premières, soit les ingrédients transformés provenant d'une ou de plusieurs usines (OMS, 2001). Autres termes spécifiques utilisés pour les plantes médicinales et aromatiques sont:

- ✓ "Herbe ou herbe culinaire" désigne toute matière végétale aromatique provenant de régions tempérées, utilisé en petites quantités pour aromatiser les aliments et les boissons, mais dont on ne connaît pas ou peu la valeur nutritionnelle,
- ✓ "Epice" désigne une matière végétale aromatique des régions tropicales utilisée en petites quantités pour aromatiser les aliments et les boissons, mais dont la valeur nutritionnelle est peu ou pas connue,
- ✓ "Plante médicinale" désigne diverses plantes utilisées pour le traitement d'une maladie ou d'un autre corps des afflictions,
- ✓ "Huile essentielle" indique qu'une huile volatile peut être extraite des plantes par distillation, des solvants ou de l'expression,
- ✓ "Plante toxique" désigne les plantes contenant des alcaloïdes ou d'autres substances qui peuvent produisent des effets toxiques lorsqu'ils sont introduits dans l'organisme [191].

Les effets positifs des plantes aromatiques, des herbes et de leurs huiles essentielles dans diverses maladies ont été mis en évidence tout au long de l'histoire [193,194]. Les plantes et herbes aromatiques sont les premieres sources des composés pharmacologiques qui ont été utilisés dans l'Antiquité pour traiter des maladies ou d'autres conditions anormales et sont encore utilisés aujourd'hui dans le folklore ou comme un type de médecine ethnique [195-197]. Presque toutes les civilisations anciennes ont démontré qu'elles étaient conscientes de l'usage médicinal des plantes. Actuellement, dans les sociétés vivant dans des zones isolées, rurales et montagneuses, l'accès aux installations sanitaires officielles est limité, comme dans les pays en développement, de nombreuses thérapies physiques et spirituelles sont encore utilisées et apprécient l'utilisation de plantes aromatiques [198,199].

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde; ce sont des affections provoquées par des microorganismes pathogènes telles que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons et touchent des millions de personnes dans le monde (Alwash et al. 2013) [200]. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques usuels, l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement et les immunodépressions causées par l'infection du virus du sida (VIH : virus de l'immunodéficience humaine) sont les principaux facteurs de la forte recrudescence de ces maladies (Bagre et al. 2007) [201].

# E- Polyohénols en tant que substitut des antibiotiques

*1.4.1. Polyphénols en tant que substitut aux antibiotiques*

Depuis l'Antiquité, l'utilisation des extraits de plantes aromatiques en médecine traditionnelle était bien connue et appliquée soit par voie transdermique pour prévenir les infections dues aux brûlures et blessures, ou par voie orale dans le cas des maladies gastro-intestinales et contre les bactéries (antibactériennes). L'extrait de ces plantes contient d'importants composés polyphénoliques jouant le rôle d'antimicrobiens, on peut citer l'acide gallique, l'acide ellagique, la véscalagine ou la castalagine…

L'utilisation des extraits de plantes aromatiques et des huiles essentielles comme alternative naturelle aux médicaments synthétiques et aux additifs alimentaires synthétiques dans l'alimentation humaine et animale est en forte augmentation [202].

*1.4.2. Antibiotiques*

Il existe plus de 22 500 composés biologiquement actifs obtenus à partir des microorganismes, 45% proviennent des actinomycètes, 38% des champignons et 17% d'autres bactéries. Environ 5 000 antibiotiques ont été identifiés à partir des cultures de bactéries à Gram négatif, Gram positif et des champignons filamenteux [203]. Les antibiotiques peuvent traiter les infections bactériennes par 4 modes d'action principaux:

a. L'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire: cas des antibiotiques carbapénèmes, de la vancomycine et des β lactamines.

b. L'inhibition de la synthèse des protéines microbiennes en se liant avec la sous-unité 50S du ribosome (cas des antibiotiques macrolides, du chloramphénicol, de la clindamycine), avec la sous-unité 30S du ribosome (cas des antibiotiques aminoglycosides, tétracyclines), et avec l'enzyme bactérienne isoleucyl-ARNt synthétase (cas du chloramphenicol et tetracyclines).

c. L'interférence avec la synthèse des acides nucléiques: inhibition de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN): cas des antibiotiques fluoroquinolones, et inhibition de la synthèse d'acide ribonucléique (ARN): cas de la rifampicine.

d. Inhibition des voies métaboliques: cas des sulfamides et analogues de l'acide folique [204].

*1.4.3 Résistance aux antibiotiques*

Elle est définie comme étant une résistance d'un micro-organisme à un médicament antimicrobien auquel il était précédemment sensible [200]. Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur

libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants [205, 206]. Les maladies d'immunosuppression peuvent causer aussi le développement de cette résistance [207].

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques à travers plusieurs mécanismes, notamment, la modification ou l'élimination des sites de liaison des agents antibactériens, la régulation de la production des enzymes qui peuvent désactiver l'agent antimicrobien, le réglage ou la modification des canaux membranaires par lesquells l'antibiotique traverse les cellules [204], le changement de la perméabilité cellulaire et le transfert horizontal de gènes de résistance [208].

Depuis les années 1990, l'utilisation de médicaments, en particulier les antibiotiques, dans l'alimentation animale conduisait progressivement à une résistance des microbes pathogènes aux antibiotiques, depuis cette résistance est devenue une réalité et bien connue chez la communauté scientifique.

Ce phénomène de résistance, ainsi que les préoccupations concernant la toxicité d'un bon nombre d'antibiotiques synthétiques véhiculés chez l'Homme ou dans la chaîne alimentaire, a soulevé énormément de préoccupations au niveau mondial sur leur impact au niveau de la santé humaine et la sécurité alimentaire [209]. Selon l'OMS, il s'agit d'un problème majeur, car l'utilisation de certains antibiotiques a conduit à de graves maladies infectieuses, comme la pneumonie ou la salmonellose, difficilement traitables en raison de la résistance des microbes (OMS, 2018). L'Union Européenne a commencé à retirer progressivement depuis 1998 l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance et a complètement interdit leur utilisation en 2006. Aux États-Unis, le promoteur de croissance antibiotique est toujours autorisé, mais des restrictions importantes ont été également appliquées suite aux réclamations mondiales [210]. Ces restrictions ont été également mises en œuvre dans les pays asiatiques, comme la Corée, le Vietnam, la Chine, l'Australie et même dans les pays d'Amérique latine [211].

# F- Pouvoir anticorrosif des mélanges naturels

### *1.4.5 Activité anticorrosive*

Étymologiquement, le mot «corrosion» provient du latin *corrodere* qui signifie ronger ou attaquer. De manière générale, la corrosion est souvent définie comme l'altération d'un matériau ou d'une structure par réaction chimique ou physicochimique avec le milieu

environnant.

Plus scientifiquement, le recueil des définitions des termes chimiques de l'Union International de la Chimie Fondamentale et Appliquée (UICFA) précise que la corrosion est une réaction interfaciale irréversible entre un matériau (métal, céramique, polymère...) et son environnement conduisant à la dégradation du matériau [44].

Lorsqu'il s'agit de matériaux métalliques, la norme internationale ISO 8044 [45] définit la corrosion comme **«**interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et pouvant conduire à une dégradation significative de la fonction du métal, du milieu environnant ou du système technique dont ils font parties**»**.

Cette norme place clairement la corrosion à l'interface entre le matériau et le milieu: elle n'est pas plus une propriété du matériau seul qu'une propriété du milieu seul, mais elle résulte d'une interaction entre ces deux phases. La science de la «corrosion» nécessite donc préalablement une connaissance de base précise à la fois du matériau et du milieu dans lequel il se trouve et également des conditions d'utilisation [46].

*1.4.5.1 Nature électrochimique de la corrosion en milieu aqueux*

Le processus de corrosion est le résultat des réactions intervenant entre un métal et son environnement. En milieux aqueux, les phénomènes de corrosion des métaux et alliages sont principalement de nature électrochimique [47,48]: un échange de charges électriques libres (électrons) a lieu à l'interface métal/électrolyte. Cet échange implique forcément l'action simultanée de deux réactions élémentaires: réaction anodique (oxydation) et réaction cathodique (réduction). Les deux réactions élémentaires se passent en même temps et avec la même vitesse. Ainsi les principes d'électroneutralité et de conservation de la matière sont respectés.

*1.4.5.2 Lutte contre la corrosion*

La corrosion affecte le comportement mécanique et physique des matériaux, ce qui met en péril l'intégrité des structures en diminuant les épaisseurs du matériau, en favorisant les fissures et/ou en provoquant des attaques localisées, et par voie de conséquence la durée de vie des matériaux est alors impactée. La corrosion engendre des coûts importants et demande donc la mise en place d'une politique de prévention et de lutte contre cette dégradation [49]. Nombreuses méthodes pour la prévention de la corrosion du métal, on peut citer comme exemple: galvanisation, protection cathodique, utilisation de solution antirouille et

d'inhibiteurs de corrosion…. L'utilisation de ces derniers (inhibiteurs de corrosion) est souvent favorisée dans les milieux acides [50].

*1.4.5.3 Protection par inhibiteurs de corrosion*

Les inhibiteurs de corrosion constituent un moyen de lutte contre la corrosion des métaux et des alliages. L'originalité provient du fait que le traitement anticorrosif ne se fait pas sur le métal lui-même mais par l'intermédiaire du milieu corrosif [51]. Il ne s'agit cependant pas de modifier la nature du milieu, mais d'ajouter la formulation inhibitrice (molécule isolée ou mélange de molécules) en faible quantité au milieu corrosif, comme l'indique la définition d'un inhibiteur selon la norme ISO 8044 [52]. D'après la norme, toute «substance chimique ajoutée au système de corrosion à une concentration choisie pour son efficacité, et qui entraine une diminution de la vitesse de corrosion sans modifier de manière significative la concentration d'aucun agent corrosif contenu dans le milieu agressif».

La diminution de la vitesse de corrosion est réalisée de plusieurs manières [53], en:

- ✓ modifiant l'agressivité de l'électrolyte,
- ✓ limitant les réactions électrochimiques.

Outre son mécanisme d'action, certaines propriétés fondamentales sont nécessaires:

- ✓ Diminution de la vitesse de corrosion du métal tout en conservant ses caractéristiques physicochimiques,
- ✓ Stabilité en présence des autres composés du milieu corrosif et à la température d'utilisation,
- ✓ Respect des normes de non toxicité de l'inhibiteur de corrosion,
- ✓ Économie du coût : prix raisonnable est très important.

Les inhibiteurs de corrosion peuvent être utilisés en vue d'une protection permanente (surveillance primordiale du dispositif), ou plus couramment en vue d'une protection temporaire, notamment lorsque la pièce est particulièrement sensible à la corrosion ou lorsqu'elle est exposée à un milieu très agressif. Ou encore lorsque la pièce est soumise à des usinages très sévères comme le perçage, taraudage, forage, filetage,…. Dans ce cas, le contrôle du système est à priori plus simple, la prévision du comportement de l'inhibiteur dans le temps étant plus facile à faire.

La protection du métal contre la corrosion reste un défi majeur de nombreuses industries, d'où plusieurs méthodes physiques et chimiques ont été appliquées permettant de prévenir la corrosion des différents systèmes fonctionnels. Bien que ces méthodes préventives soient largement utilisées, certaines industries restaient sceptiques envers leur utilisation, du fait que

la plupart de ces méthodes sont coûteuses, et les stratégies adoptées dans la prévention de la corrosion sont modérément efficaces et peuvent être inefficaces.

La plupart des inhibiteurs de corrosion synthétiques (organiques) sont considérés comme non respectueux de l'environnement en raison de leur toxicité élevée et de leur capacité de bioaccumulation dans les tissus adipeux. C'est pourquoi plusieurs nouvelles approches respectueuses de l'environnement (chimie verte : faible toxicité du solvant…) ont été mises au point lors de la synthèse de nouveaux composés organiques dont les applications sont diverses. En raison de la réglementation environnementale rigoureuse et de la sensibilisation accrue à l'environnement, les procédés de synthèse et d'utilisation des inhibiteurs de corrosion de faible toxicité ont fait l'objet d'une amélioration approfondie à travers le monde [212] .

Récemment, le développement d'inhibiteurs de corrosion inertes (sans danger) pour l'environnement a gagné une grande attention en raison des règles et réglementations strictes concernant l'utilisation et le rejet de substances toxiques (produits chimiques) [213]. De nos jours, plusieurs nouvelles générations d'inhibiteurs moins toxiques et moins polluants pour l'environnement ont été développées par des chercheurs spécialistes dans le domaine d'inhibition de la corrosion. La chimie verte vise à concevoir et à synthétiser des produits chimiques plus sûrs pour l'environnement et dépourvus de toxicité. Tout en utilisant des inhibiteurs de corrosion écologiques et durables à base de : acides aminés, médicaments synthétiques peuvent etre toxiques (drogues), produits ioniques liquides et extraits de plantes [214]. D'autres inhibiteurs de corrosion verts sont à base de : sucres biopolymériques (glucose), chitosane, cellulose, etc [215]. De nouvelles générations d'inhibiteurs sont également discutées, et sont basées sur les nanocomposites.

Un aperçu sur les principes et les mesures de la chimie verte respectueuse de l'environnement est à respecter et qui est en relation avec la synthèse des inhibiteurs de la corrosion

Selon la communauté économique européenne (CEE) commission de Paris, les paramètres suivants pour les inhibiteurs de corrosion verts doivent être pris en compte et se présentent comme suite [216]:

- ✓ Toxicité
- ✓ Biodégradation,
- ✓ Bioaccumulation

Les extraits de différentes parties d'une plante telles que la feuille, la tige, la racine, la fleur, le fruit, la pulpe, etc. ont été signalés comme des inhibiteurs de corrosion efficaces pour les métaux et les alliages [217]. Les extraits de plantes agissent comme des inhibiteurs de corrosion sans danger pour l'environnement, et qui sont rentables et facilement disponibles. Leur capacité à agir comme inhibiteurs de corrosion est attribuée à l'existence de nombreux produits phytochimiques contenant des hétéroatomes (souvent oxygénés) par lesquels ils s'adsorbent sur la surface du métal et inhibent la corrosion. Les extraits de plantes contiennent plusieurs constituants chimiques composés de flavonoïdes, alcaloïdes, catéchines, terpénoïdes, coenzymes, y compris les acides aminés, protéines d'origine végétale, polysaccharides et vitamines. Ces substances n'ont pas d'effet antagoniste sur le vivant et contiennent également des hétéroatomes, des noyaux hétérocycliques jouant le rôle de centres d'ancrage [218-221].

*1.4.5.4 Comportement des inhibiteurs en milieux acides*

En milieu acide, les inhibiteurs les plus fréquemment utilisés sont à base de molécules organiques. Ces inhibiteurs agissent essentiellement par simple adsorption à la surface du métal, bloquant ainsi les sites actifs, et par conséquent diminuent la vitesse de corrosion. Cette adsorption se traduit par une liaison entre l'espèce adsorbée et la surface du métal.

*1.4.5.5 Mécanisme d'adsorption des molécules inhibitrices à la surface du métal*

Plusieurs études ont été réalisées afin de bien appréhender, le phénomène d'adsorption des inhibiteurs à la surface du métal. D'après, El Rehim et al. 2010 [222] l'adsorption des molécules inhibitrices, à partir des solutions aqueuses, peut être considérée comme un processus d'une quasi-substitution entre le composé organique en solution Org (sol) et les molécules d'eau adsorbées à la surface de l'électrode, $H_2O_{ads}$.

Par ailleurs, des études ont montré que le mécanisme d'oxydation du métal fer (Fe) en milieu acide dépend de l'intermédiaire adsorbée $FeOH_{ads}$. Ce mécanisme d'oxydation de fer en présence de l'inhibiteur, pourrait être semblable à celui discuté par McCafferty et al. 1972 [223], qui est repris postérieurement par Sternberg et al. 1984 [224].

Les équations suivantes illustrent ce phénomène.

$$Fe + H_2O \leftrightarrow (FeH_2O)_{ads}$$

$$(FeH_2O)_{ads} + Inh \leftrightarrow (FeOH^-)_{ads} + H^+ + Inh$$

$$(FeH_2O)_{ads} + Inh \leftrightarrow (FeInh)_{ads} + H_2O$$

$$(FeOH^-)_{ads} \rightarrow (FeOH)_{ads} + e^-$$

$$(FeInh)_{ads} \rightarrow (FeInh^{+})_{ads} + e^{-}$$

$$(FeOH)_{ads} + (FeInh^{+})_{ads} \leftrightarrow FeOH^{+} + (FeInh)_{ads}$$

$$FeOH^{+} + H^{+} \leftrightarrow Fe^{2+} + H_2O$$

## Références

[1] Newman, D.J., Cragg G.M., Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. ***J. Nat. Prod.*** 83, 770-803, **2020**.
[2] Savoia, D., Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics, *Future Microbiol*. 7, 979-990, **2012**.
[3] Newman, D.J., Cragg G.M., Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod*. 79, 629-661, **2016**.
[4] Al-Dabbas, M.M., Suganuma T., Kitahara K., Hou D.-X., Fujii M., Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of Varthemia iphionoides Boiss. Extracts. *Journal Ethnopharmacology* 108, 287-293, **2006**.
[5] Rahman, M.A., Islam M.S., Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of the phytochemicals of whole Leucas aspera extract. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 3, 273, **2013**.
[6] Marsoul A., Ijjaali M., Bennani B., Boukir A. ; Determination of polyphenol contents in Papaver rhoeas L. flowers extracts (soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation. *Material Todays: Proceeding* 31, S183-189, **2020**.
[7] Zrira, S., Ghanmi M., Chemical composition and antibacterial activity of the essential of Cedrus atlantica (Cedarwood oil). *Journal Essential Oil-Bearing Plants* 19, 1267-1272, **2016**.
**[**8]. Derwich E., Benziane Z., Boukir A.; *Int. J. Agric. Biol.* 12, 381-385, **2010**.
[9]. Inaam, E.-m., Sara H., Saadia L., Mohamed E., Abdeslam L., Study of antioxidant activity of essential oils extracted from Moroccan medicinal and aromatic plants, *Eur J Med Plants* 1-12, **2015**.
[10] Chao, S.C., Young D.G., Oberg C.J., Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses, *Journal Essential Oil Research* 12, 639-649, **2000**.
[11] Baylac, S., Racine P., Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts, *Int. J. Aromather*. 13, 138-142, **2003**.
[12] Martins, D.F., Emer A.A., Batisti A.P., Donatello N., Carlesso M.G., Mazzardo-Martins L.,Venzke D., Micke G.A., Pizzolatti M.G., Piovezan A., Inhalation of Cedrus atlantica essential oil alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation pathways in a mouse model of postoperative pain, *Journal Ethnopharmacology* 175, 30-38, **2015**.
[13] Emer, A.A., Donatello N.N., Batisti A.P., Belmonte L.A.O., Santos A.R., Martins D.F., The role of the endocannabinoid system in the antihyperalgesic effect of Cedrus atlantica essential oil inhalation in a mouse model of postoperative pain, *Journal Ethnopharmacology* 210 477-484, **2018**.
[14] Saab A.M., Lampronti I., Borgatti M., Finotti A., Harb F., Safi S., Gambari R., In vitro evaluation of the anti-proliferative activities of the wood essential oils of three Cedrus species against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells, Natural Product Research 26, 2227-2231, **2012**.
[15] Marsoul A., Ijjaali M., El Hajjaji F., Taleb M., Salim R., Boukir A. ; Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (Punica granatum L): Evaluation of the

inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl. *Material Todays: Proceeding 27*, 3193-3198, **2020**.
[16] E. Conti, A. Litt, K.J. Sytsma, Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: Evidence from rbcL sequence data. Am. J. Bot., 83, 221–233, **1996**.
[17] R. Dahlgren, R.F. Thorne, The order Myrtales: Circumscription, variation, and relationships. Ann. Mo. Bot. Gard., 633–699, **1984**.
[18] S. Kirbag. F. Zengin. M. Kursat, Antimicrobial Activities of Extracts of some Plants. Pakistan Journal of Botany, 41(4), 2067-2070, **2009**.
[19] S. Madhuri, G. Pandey, Some anticancer medicinal plants of foreign origin. Current Science, 96(6), 25, **2009**.
[20] H. Rankou, A. Culham, S.L., Jury, M.J.M. Christenhusz, The endemic flora of Morocco, *Phytotaxa*, 78, 1-69, **2013**.
[21] S.A. Graham, A. Ovary, fruit, and seed morphology of the Lythraceae. Int. J. Plant Sci., 175, 202–240, **2014**.
[22] E.D. Stover, E.W. Mecure, the pomegranate: a new look at the fruit of paadise, HortScience, 42(5), 1088-1092, **2007**.
[23] B. Benoît, T. Botanica, Base de donnés Nomenclature de la flore en France. BDNFF, p 4, **2013.**
[24] H. E. Ahmed, I. F. Tahoun, I. Elkholy, A. B. Shehata and Y. Ziddan, identification of natural dyes in rare Coptic textile using HPLC-DAD and mass spectroscopy in museum o Faculty of arts, Alexanddria university, Egypt, Dyes Pigm., 145, 486–492, **2017**.
[25] J. Bellakhdar, R. Claisse, J. Fleurentin and C. Younos, J. Ethnopharmacol., 35, 123–143, **1991**.
[26] H. Jouad, M. Haloui, H. Rhiouani, J. El Hilaly and M. Eddouks, J. Ethnopharmacol., 77, 175–182, **2001**.
[27] M. Eddouks, M. Maghrani, A. Lemhadri, L. M. Ouahidi and H. Jouad, J. Ethnopharmacol., 82, 97–103, **2002**.
[28] M. El Haouari, J. A. Rosado, Phytother. Res., 30, 1059–1071, **2016**.
[29] M. Adams, C. Berset, M. Kessler and M. Hamburger, J. Ethnopharmacol., 121, 343–359, **2009**.
[30] R. T. Gunther, J. Goodyer, The Greek herbal of Dioscorides. New York: Hafner Publishing, 1959. 18 K. Agarwal and R. Varma, J. Ethnopharmacol., 174, 17–24, **2015**.
[31] F. Z. Marhoume, M. A. Laaradia, Z. Younes, J. Laadraoui, S. Ouir, R. Aboufatima, A. Chait and A. Bagri, J. Ethnopharmacol., 241, 111971, **2019**.
[32] L. Rashan, H. Lukmanul, F. Heinz, K. Gerhardt, M. Irmgard, A. Mohammed and H. Sidgi, Jordan J. Biol. Sci., 11, 489–494, **2018**.
[33] F. Z. Marhoume, Z. Younes, H. Boufous, N. Errajy, M. Ait Laaradia, J. Laadraoui, A. Hakmaoui, B. Abdellah and C. Abderrahman, Eur. J. Med. Plants, 20, 1–10, **2017.**
[34] H. nejat, K. Sedaghat, A. Vakili, M. Jarrahi, M.Z. Khorasani, Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod., 12(3), e64319, **2017.**
[35] L. Grausso, B. de Falco, R. Motti, V. Lanzotti, Corn poppy, Papaver rhoeas L. : a critical review of its botany, phytochemsitry and pharmacology, Phytochem Rev., (**2020**), https://doi.org/10.1007/s11101-020-09676-7

[36] J.W.Kadereit, Some suggestions on the geographical origin of the central, west and north European synanthropic species of Papaver L. Bot J Linn Soc 103:221–231, **1990**.
[37] L.W. Mitich, Corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). Weed Technol 14:826–829, **2000**.
[38] B. Popovic, D. Stajner, R. Ždero Pavlovic, S. Orlovic, Z. Gali´c, Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *Sci. World J.* 8, *2013*, **2013**.
[39] H. Tanouchi, T. Sato, K. Takeshita, Comparative studies on acorn and seedling dynamics of four Quercus species in an evergreen broad-leaved forest. J. Plant Res., 107, 153–159, **1994**.
[40] J. Martins, L.S. de Oliveira, S. Nisgoski, R. Sabourin, A database for automatic classification of forest species. Mach. Vis. Appl., 24, **2012**.
[41] A. Boubaya, N. Marzougui, L. Ben Yahia, A. Ferchichi, Chemical diversity analysis of Tunisian Lawsonia inermis L. populations. Afr J Biotechnol;10(49), 80-87, **2011**.
[42] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem 125*, 288–306, **2011.**
[43] KK. Vanderwood, TO. Hall, TS. Harwell, MK. Butcher, SD. Helgerson, Diabetes Care. 33 (2010) 2543
[44] American Diabetes Association (ADA), Diabetes Care. 31, S55, **2008**.
[45] V T. Šaponjac, J. Canadanovic-Brunet, G. Cetkovic, S. Djilas. Chapter 6: Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland, **2016**.

[46] J. Bruneton. Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, Tec and Doc, Lavoisier, Paris. 1504pp, **2015**.

[47] J. Stöckigt, Y. Sheludko, M. Unger, I. Gerasimenko, H. Warzecha, D. Stöckigt. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups, Journal of chromatography A, 967, 85-113, **2002**.

[48] E. De Rijke, P. Out, W .M. A .Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. T. Brinkman. Analytical separation and detection methods for flavonoids, Journal of Chromatography A, 1112, 31 – 63, **2006**.

[49] M.M. Cowan, plant products as antimicobial agents, Clinical microbiology reviews, 12(4), 564-582, **1999**.
[50] A. G. Mercader, P. R. Duchowicz, F. M. Fernández, E. A. Castro, D. O. Bennardi, J. C. Autino, G. P. Romanelli. QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. Bioorgan. Med. Chem., 16, 7470–7476, **2008**.

[51] K.L. Wolfe, R.H. Liu. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. J. Agricult. Food Chem., 56, 8404-8411, **2008**.

[52] M. Daglia, polyphenols as antimicrobial agents, Curr. Opin. Biotechnol., 23, 174-181, **2012**

[53] X. -M. Ma, Y. Liu, Y.-P. Shi. Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from Ixeridium gracile (DC.) SHIH. Chem. Biodiv., 4, 2172-2181, **2007**.

[54] E. Zumrutdal, M.A. Ozaslan, miracle plant for the herbal pharmacy; henna (Lawsonia inermis). Pharmacology, 9, 883-896, **2012**.

[55] M. Wink. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Second edition Blackwell Publishing Ltd by Michael Wink A John Wiley & Sons, Ltd, Publication United Kingdom (**2010**)

[56] R. Croteau, TM. Kutchan, NG. Lewis. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000, 1250, C**.** Garcia-Viguera, M. Mars, Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. Ind Crop Prod.;40, 81–96, **2012**.

[57] A.B. Howell, D.H. D'Souza, The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. Evid Based Complement Altern Med.; 2013, 606212, **2013**.

[58] S.A. Mirjalili, A review on biochemical constituents and medicinal properties of pomegranate (Punica granatum L.). J Med Plants, 14, 1–22, **2015**.

[59] E.C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, L. Noguera-Artiaga, M. Kačániová, F. Hernández-García, J.L. Cárdenas-López, Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. J Sci Food Agric. 97(3), 802–10, **2017**.

[60] I. Khan, H. Rahman, N.M. Abd El-Salam, A. Tawab, A. Hussain, T.A. Khan, Punica granatum peel extracts: HPLC fractionation and LC-MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. BMC Complement Altern Med. 17:247, **2017**.

[61] P. Garcia-Herrera, M.L. Perez-Rodrıguez, T. Aguilera-Delgado, M.J. Labari-Reyes, B. Olmedilla-Alonso, M. Camara, Anthocyanin profile of red fruits and black carrot juices, purees and concentrates by HPLC-DAD-ESI/MS-QTOF. Int J Food Sci Technol. 51(2), 290–300, **2016**.

[62] M.I. Gil, F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem. 48(10), 81–92, **2000**.

[63] A. Masci, A. Coccia, E. Lendaro, L. Mosca, P. Paolicelli, S. Cesa, Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. Food Chem. 202, 59–69, **2016**.

[64] W.J. Qu, Z.L. Pan, R.H. Zhang, H.L. Ma, X.G. Chen, B.N. Zhu, Integrated extraction and anaerobic digestion process for recovery of nutraceuticals and biogas from pomegranate marc. Trans ASABE. 52:1997–2006, **2009**.

[65] S. Akhtar, T. Ismail, D. Fraternale, P. Sestili, Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. Food Chem. 174: 417–425, **2015**.

[66] Z. Kalaycıoğlu, F.B. Erim, Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. Food Chem. 221:496–507, **2017**.

[67] L. Fernandes, J.A. Pereira, I. Lopéz-Cortés, D.M. Salazar, J. González-Álvarez, Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Spain. Eur Food Res Technol. 243(10), 799–814, **2017**.

[68] P. Ambigaipalan, A. Costa de Camargo, F. Shahidi, Phenolic compounds of pomegranate

byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. J Agric Food Chem. 64(6), 584-604, **2016**.
[69] S.I. Ali, F.K. El-Baz, G.A.E. El-Emary, E.A. Khan, A.A. Mohamed, HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (Punica granatum L.). Int J Pharm Clin Res 6(4), 48–55, **2014**.
[70] L. Feng, Y. Yin, Y. Fang, X. Yang, Quantitative determination of punicalagin and related substances in different parts of pomegranate. Food Anal Methods. 10, 3600, **2017**.
[71] H. Saad, F. Charrier-El Bouhtoury, A. Pizzi, K. Rode, B. Charrier, N. Ayed, Characterization of pomegranate peels tannin extractives. Ind Crop Prod. 40(2), 39–46, **2012**.
[72] P. Mena, L. Calani, C. Dall'Asta, G. Galaverna, C. García-Viguera, R. Bruni, A. Crozier, D. Del Rio, Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (Punica granatum L.) juice by UHPLC-MSn. Molecules 17(14), 21–40, **2012**.
[73] V. Brighenti, S.F. Groothuis, F.P. Prencipe, R. Amir, S. Benvenuti, F. Pellati, Metabolite fingerprinting of Punica granatum L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. J Chromatogr A. 1480, 20–31, **2017.**
[74] Colin; Robiquet; Ann. Chim. Phys., 1827, **34,** 225-253.
[75] Rochleder; Liebigs. Ann. Chem**.,** 1851, **78,** 246-248.
[76] Richter, D.; J. Chem. Soc, 1936, 1701-1703.
[77] C. Wehmer,. Die Pflanzenstoffe botanisch-systematisch bearbeitet; Jena Verlag, 239, **1911.**
[78] J. Liu, D. Guo, Y. Zhou, Z. Wu, W. Li, F. Zhao, X. Zheng, Identification of ancient textiles from Yingpan Xinjiang, by multiple analytical techniques, J. Arch. Sci. 38, 1763–1770, **2011**.
[79] H. Schweppe, Handbuch Der Naturfarbstoffe, Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft, 1993
[80] G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, F. Chemat, C. Vieillescazes, A multivariate study of ultrasound-assisted extraction of madder dyes and charactisation by liquid chromatography-photodiode array detection, Ultrason. Sonochem. 16, 75–82, **2009**.
[81] C. Mouri, R. Laursen, Identification of anthraquinone markers for distinguishing Rubia species in madder-dyed textiles by HPLC, Microchim. Acta 179, 105–113, 2012.
[82] L. Ford, C.M. Rayner, R.S. Blackburn, Isolation and extraction of ruberythric acid from Rubia tinctorum L. and crystal structure elucidation, Phytochemistry 117, 168–173, 2015.
[83] I. Boldizsár, Z. Sz" ucs, Zs. Füzfai, I. Molnár-Perl, Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1133, 259–274, 2006.
[84] G.C.H. Derksen, H.A.G. Niederlander, T. van Beek, Analysis of anthraquinones in Rubia tinctorum L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A 978, 119–127, **2002**.
[85] G. Rochleder, Untersuchung der Krappwurzel (Investigation of the madder root), Justus Liebigs Ann. Chem. 80, 321–330, **1851**.
[86] E. Schunck, Ueber die Einwirkung des Krapp-Ferments auf Zucker (Concerning the effect of madder-ferment sugar), J. Prakt. Chem. 63, 222–240, **1854**.

[87] B. Poginsky, O.J. Westendorf, L. Kraus, H. Marquardt, *Pharm. Weekblad Sci. Ed*, 1987, p242.
[88] schweppe
[89] Willigk, E.; *Liebigs. Ann. Chem.*, **1852,** *82*, 339-348.
[90] Y. Kawasaki, Y. Goda, K. Yoshihira, *Chem. Pharm. Bull., 40*, 1504-1509, **1992.**
[91] Borisov, M. I.; Lisovaya, L. I.; Pristupa, N. N.; *Chem. Nat. Prod*, *6*, 370, **1970**.
[92] A. Bianco, M. Guiso, C. lavarone, O. Passacantilli, C. Trogolo, Rubia tinctorum L, *Gaz. Chim. Itai*, *191HJ08*, 13-16, 2002.
[93] R.L. Henderson, C.M. Rayner, R.S. Blackburn, Isolation and extraction of lucidin primeveroside from Rubia tinctorum L. and crystal structure elucidation, Phytochemistry 95, 105–108, **2013**.
[94] E.Y. Backheet, S.F. Farag, N.A. El-Emary, Anthraquinones and iridoid glucosides from the roots of Rubia tinctorum L, Bull. Faculty Pharm. 39, 135–140, **2001**.
[95] Y. Kawasaki, Y. Goda, K. Yoshihira, The mutagenic constituents of Rubia tinctorum, Chem. Pharm. Bull. 40, 1504–1509, **1992**.
[96] Schauenberg P, Paris F Guide des plantes me´dicinales. Delachau et Niestle´, Paris 1977
[97] R. Soulimani, C. Younos, S. Jarmouni-Idrissi, D. Bousta, F. Khalouki, A. Laila, Behavioral and pharmacotoxicological study of Papaver rhoeas L. in mice. J Ethnopharmacol 74:265–274, **2001.**
[98] M. Hillenbrand, J. Zapp, H. Becker, Depsides from the petals of Papaver rhoeas. Planta Med 70:380–382, **2004**.
[99] J. Slavik, Characterization of alkaloids from the roots of Papaver rhoeas L. Collect Med Leg Toxicol Med 43:316–319, **1978.**
[100] S. Pfeifer, S.K. Banerjee, Red-colored alkaloids of the genus Papaver. Pharmazie 19:286–289, **1964**.
[101] S. Pfeifer, Occurrence of glaudine in opium and Papaver rhoeas L. Pharmazie 20:240, **1965.**
[102] S. Pfeifer, V. Hanus, On the Alkaloids from Papaver rhoeas L. Pharmazie 20:394–396, **1965.**
[103] S.A.E. Hakim, V. Mijovic, J. Walker, Distribution of certain poppy-fumaria alkaloids and a possible link with the incidence of glaucoma. Nature 1 198–201, **1961**.
[104] I. Çoban, G.G. Toplan, B. Obek, C.U. Gurer, G. Sarıyar, Variation of alkaloid contents and antimicrobial activitiesof Papaver rhoeas l. Growing in Turkey and northern Cyprus. Pharm Biol 55, 1894–1898, **2017.**
[105] M.A. Hijazi, M. Aboul-Ela, K. Bouhadir, M. Fatfat, H. Khalife, A. Ellakany, H. Gali-Muhtasib, Cytotoxic activity of alkaloids from Papaver rhoeas growing in Lebanon. Rec Nat Prod 11, 211–216, **2017**.
[106] Y. Kalav, G. Sariyar, Alkaloids from Turkish Papaver rhoeas. Planta Med 55:488, **1989.**
[107] A. Nemeckova, F. Santavy, D. Walterova, Alkaloids of the Papaveraceae. lll.* Alkaloids from some plant species of the section Orthorhoeades. Collection Czechoslov Chemm Commun 35, 1733–1744, **1970.**
[108] S. El-Masry, M.G. El-Ghazooly, A.A. Omar, Alkaloids from Egyptian Papaver rhoeas. Planta Med 41, 61–64, **1981.**

[109] V. Preininger, V. Sˇima´nek, O. Gasˇic´, Adlumidiceine and adlumiceine: new alkaloids of narceine type. Phytochemistry 12, 2513–2515, **1973.**
[110] V. Preininger, The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. In: Phillipson JD, Roberts MF, Zenk MH (eds) Proceedings in Life Sciences. Springer, Berlin **1985.**
[111] A. Trichopoulou, E. Vasilopoulou, P. Hollman, C. Chamalides, E. Foufa, T. Kaloudis, D. Kromhout, P. Miskaki, I. Petrochilou, E. Poulima, K. Stafilakis, Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. Food Chem 70, 319–323, **2000**.
[112] L. Grauso . B. de Falco . R. Motti . V. Lanzotti, Corn poppy, *Papaver rhoeas* L.: a critical review of its botany, phytochemistry and pharmacology, Phytochem Rev, 2020, https://doi.org/10.1007/s11101-020-09676-7
[113] P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, A.M. Carvalho, M.C. Sa´nchez-Mata, M. Camara, V. Ferna´ndez-Ruiz, M. Pardo-de-Santayana, J. Tardıo, Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. LWT Food Sci Technol 55:389–396, **2014**.
[114] L. Grauso, S. Emrick, G. Bonanomi, V. Lanzotti, Metabolomics of the alimurgic plants Taraxacum officinale, Papaver rhoeas and Urtica dioica by combined NMR and GC–MS analysis. Phytochem Anal 30:535–546, **2019**.
[115] B.H. Ali, N. Al Wabel, G. Blunden, Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A review. Phytotherapy Research, 19(5), 369–375, **2005**.
[116] I. Da-Costa-Rocha, B. Bonnlaender, H. Sievers, I. Pischel, M. Heinrich, Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. Food Chemistry, 165, 424–443, **2014**.
[117] E.G. Maganha, R. da Costa Halmenschlager, R.M. Rosa, J.A.P Henriques, L. de Paula, A.L. Ramos, J. Saffi, Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites form plants of the genus Hibiscus. Food Chemistry, 118, 1–10, **2010**.
[118] M.E. Alañón , M. Ivanović, S. Pimentel-Morab, , I. Borrás-Linares, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero , A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyces by natural deep eutectic solvents, Food research international, 137, 109646, **2020.**
[119] I. Borrás-Linares, S. Fernández-Arroyo, D. Arráez-Román, P.A. Palmeros-Suárez, R. Del Val-Díaz, I. Andrade-Gonzáles, A. Segura-Carretero, Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (Hibiscus sabdariffa). Industrial Crops and Products, 69, 385–394, **2015**.
[120] I. Borrás-Linares, M. Herranz-López, E. Barrajón-Catalán, D. Arráez-Román, I. GonzálezÁlvarez, M. Bermejo, A. Segura-Carretero, Permeability study of polyphenols derived from a phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract by UHPLCESI-UHR-Qq-TOF-MS. International Journal of Molecular Sciences, 16, 18396–18411, **2015**.
[121] S. Pimentel-Mora, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, D. Arraéz-Román, A. MartínezFérez, A. Segura-Carretero, Microwave-assisted extraction for Hibiscus sabdariffa bioactive compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 156, 313–332, **2018.**

[122] S. Pimentel-Moral, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, D. Arráez-Román, A. MartínezFérez, A. Segura-Carretero, Supercritical CO2 extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa, J. supflu,* 147, 213-221, 2019**.**

[123] S.O. Babalola, A. Babalola, O.C Aworh, Compositional attributes of the calyces of roselle (Hibiscus sabdariffa L.), The Journal of Food Technology in Africa, 6(4), 133-134, **2001.**

[124] P. Wong, S. Yusof, H.M. Ghazali, Y.B. Che Man, Physico-Chemical features of roselle (Hibiscus sabdariffaL.), *Nutrition & Food Science*, 32 (2), 68-73, **2002.**

[125] P.J. Tsai, H.P. Huang, Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle, Food Research International, 37(4), 313-318, **2004**.

[126] WL. Lin, YJ. Hsieh, FP. Chou, L'acide protocatéchuique d'hibiscus inhibe les lésions hépatiques du rat induites par les lipopolysaccharides. Arch Toxicol 77, 42–47, **2003**.

[127] A. Vinha, J. Barreira, A. Costa, M.A. Oliveira, new age for *Quercus* spp. Fruits: Review on nutritional and phytochemical composition and related biological activities of acorns. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 15,* **2016**.

[128] J. Laemke, S. Unsicker, Phytochemical variation in treetops: Causes and consequences for tree-insect herbivore interactions. *Oecologia, 187,* **2018**.

[129] C. Tanase, S. Cosarca, D.L. Muntean, A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules, 24,* 1182, **2019.**

[130] V. Cheynier, Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochem. Rev. 11*. **2012**.

[131] C. Yarnes, W. Boecklen, K. Tuominen, J.P. Salminen, Defining phytochemical phenotypes: Size and shape analysis of phenolic compounds in white oaks (Fagaceae, *Quercus Sect. Quercus*) of the Chihuahuan Desert. *Can. J. Bot., 84,* **2006**.

[132] T. Vogt, Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant., 3,* 2–20, **2010**.

[133] L. Hadidi, L. Babou, F. Zaidi, P. Valentão, P.B. Andrade, C. Grosso, *Quercus ilex* L.: How season, plant organ and extraction procedure can influence chemistry and bioactivities. *Chem. Biodivers. 14*, e1600187, **2017**.

[134] H.O. Elansary, A. Szopa, P. Kubica, H. Ekiert, M.A. Mattar, M.A. Al-Yafrasi, D.O. El-Ansary, T.K. Zin Elabadin, K. Yessoufou, Polyphenol profile and pharmaceutical potential of *Quercus* spp. bark extracts. Plants, 8(11), 486, **2019**.

[135] S. Ahmed, A. Rahman, A. Alam, M. Saleem, M. Athar, S. Sultana, Evaluation of the efficacy of Lawsonia alba in the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J. Ethnopharmacol. 69, 157–164, **2000**.

[136] R.B. Semwal, D.K. Semwal, S. Combrinck, C. Cartwright-Jones, A. Viljoen, Lawsonia inermis L. (henna): ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. J. Ethnopharmacol. 155, 80–103, **2014.**

[137] T. Mengoni, D.V. Peregrina, R. Censi, M. Cortese, M. Ricciutelli, F. Maggi, P. Di Martino, SPME-GC-MS analysis of commercial henna samples (Lawsonia inermis L.). Nat. Prod. Res. 30, 268–275, **2016**.

[138] S. Singh, N. Verma, R. Karwasra, P. Kalra, R. Kumar, Y.K. Gupta, Safety and efficacy of hydroalcoholic extract from Lawsonia inermis leaves on lipid profile in alloxan-induced diabetic rats. Ayu 36, 107–112, **2015**.

[139] F.Alem, S. A. Gita, L. Cougnaud, C. Affnar, I. Nounah, B. Youssef , A.L. de Oliveira, Z. Charrouf, B. Rhourri-Frih , Lawsone quantification in *Lawsonia inermis L.* by HPLC-MS: How does the temperature and pluviometry affect lawsone concentration, ndustrial Crops & Products, 158 ,112960, **2020**.

[140] N.X. Cuong, N.X. Nhiem, N.P. Thao, N.H. Nam, N.T. Dat, T. Anh Hle, Inhibitors of osteoclastogenesis from *Lawsonia inermis* leaves. Bioorg Med Chem Lett, ;20(478), 2-4, **2010.**

[141] J. Rajeswari, S. Rani, Isolation, structural elucidation of flavonoid constituents from *Lawsonia inermis* linn. Der Pharm Lett., 8, 79-84, **2016**.

[142] C.S. Yang, J.J. Chen, H.C. Huang, G.J. Huang, S.Y. Wang, L.K. Chao, New flavone and eudesmane derivatives from *Lawsonia inermis* and their inhibitory activity against NO production. Phytochem Lett., 21(12), 3-7, **2017.**

[143] K. Iqbal, J. Iqbal, D. Staerk, K.T. Kongstad, Characterization of antileishmanial compounds from *Lawsonia inermis* L. leaves using semi-high resolution antileishmanial profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR. Front Pharmacol., 8, 337, **2017**.

[144] C.S. Yang, H.C. Huang, S.Y. Wang, P.J. Sung, G.J. Huang, J.J. Chen, New diphenol and isocoumarins from the aerial part of *Lawsonia inermis* and their inhibitory activities against NO production. Molecules, 21, E1299, **2016**.

[145] I. Nounah, A. Hajib, H. Harhar, N.E. Madani, S. Gharby, D. Guillaume, Z. Charrouf, Chemical composition and antioxidant activity of Lawsonia inermis seed extracts from Morocco. Nat. Prod. Commun., 12(4) 487 – 488, **2017**.

[146] G. Chaudhary, S. Goyal, P. Poonia, Lawsonia inermis Linnaeus: A Phytopharmacological Review, **Int**. J. Pharm. Sci. Invent, 2(2): 91-98, **2010**.

[147] M.M. Hasan, K. Abu Nayem, A.M.A. Azim, N.C. Ghosh , " Application of Purified Lawsone as Natural Dye on Cotton and Silk Fabric ", Journal of Textiles , 2015, 7, **2015**.

[148] J. Toth, M. Mrlinova, D. Tekelova, M. Korenova, Rosmarinic acid an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa Offcinalis* L.), *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 50, 139-146, **2003**.

[149] D. Sterbova, D. Matejıcek, J. Vlcek, V. Kubán, Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plan material. *Analytica Chimica Acta*, 513, 435 – 444, **2004**.

[150] D. Grigonis, P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl, C.S. Eskilsson, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (Hierochloë odorata). *Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3) 223-233, **2005**.

[151] T.S. Reighard, S.V. Olesik, Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26, 1-39, **2006**.

[152] A.H. Liu, L. Li, M. Xu, Y.H Lin, H. Guo, D. Guo, Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of Salvia miltiorrhiza and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 48 – 56, **2006**.

[153] R.N. Carvalho, L.S. Moura, P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *J. of Supercritical Fluids*, 35,197–204, **2005**.

[154] A. Caniova, E. Brandsteterova, HPLC Analysis of Phenolic Acids in Melissa Officinalis. *J. Liq. Chrom. & Rel Technol*, 24 (17), 2647 – 2659, **2001**.
[155] H. Wang, G.J. Provan, K. Helliwell, Determination of rosmarinic acid and cafeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry*, 87, 307 – 311, **2004.**
[156] V. Cristofori, D. Caruso, G. Latini, M. Dell'Agli, C. Cammilli, E. Rugini, Fruit quality of Italian pomegranate (*Punica granatum* L.) autochthonous varieties. Eur Food Res Technol. 232, 397–403, **2011**.
[157] D.Z. Lantzouraki, V.J. Sinanoglou, P. Zoumpoulakis, C. Proestos, Comparison of the antioxidant and antiradical activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) by ultrasound-assisted and classical extraction. Anal Lett. 49(9), 69–78, **2016.**
[158] A. Sood, M. Gupta, Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. Food Biosci. 12, 1–6, **2015.**
[159] M. Kazemi, R. Karim, H. Mirhosseini, A.A. Hamid, Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: punicalagin and hydroxybenzoic acids. Food Chem. 206(1), 56–66, **2016**.
[160] K. Kaderides, A.M. Goula, K.G. Adamopoulos, A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasoundassisted extraction and encapsulation. Innov Food Sci Emerg Technol. 31(2), 04–15, **2015.**
[161] X. Zheng, B. Liu, L. Li, X. Zhu, Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel. J Med Plants Res. 5(6), 04–11, **2011**.
[162] A.C. Diamanti, P.E. Igoumenidis, I. Mourtzinos, K. Yannakopoulou, V.T. Karathanos Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. Food Chem. 214(6), 1–7, **2017.**
[163] S.D. Siah, S. Agboola, J.A. Wood, I. Konczak, C.L. Blanchard, A Comparison Study of Phenolic Contents and in Vitro Antioxidant Activities of Australian Grown Faba Beans (Vicia faba L.) Varying in Seed Coat Colours as Affected by Extraction Solvents, American Journal of Analytical Chemistry10(6), 227-245, **2019.**
[164] A. Bocco, M.E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts, j. Agric. Food Chem. 46(6), 2123-2129, **1998**.
[165] A. Escarpa M.D. Morales M.C. González, Performances analytiques de composés phénoliques disponibles dans le commerce et non disponibles à l'aide d'échantillons réels par chromatographie liquide haute performance - détection par barrette de diodes, Analytica Chimica Acta, 460 (1), 61-72, **2002** .
[166] K.R. Markham, techniques of flavonoid identification, London, Academic press **1982**.
[167] J. Sun, F. Liang, Y. Bin, P. li, C. Duan, screening non-colored Phenolics in red wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries, Molecules, 12, 679-693, **2007**.
[168] N.T.R. Meda, M.J. Bangou, S. Bakasso, J. Millogo-Rasolodimby, O.G. Nacoulma, Antioxidant activity of phenolic and flavonoid fractions of *Cleome gynandra* and *Maerua angolensis* of Burkina Faso. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(2): 36-42, **2013**.
[169] S. Albayrak, A. Aksoy, S. Albayrak, O. Sagdic, In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science &Technology* A1**:** 1-9, **2013**.
[170] J. Duran-Bedolla, M.H. Rodriguez, V.S. Navor, S.R. Arancibia, M. Cerbon, M.C. Rodriguez Oxidative stress: production in several processes and organelles during

*Plasmodium* sp development. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* 2(2): 93-100, **2013**.

[171] L. Rochette, J. Lorin, M. Zeller, J.C. Guilland, L. Lorgis, Y. Cottin, C. Vergely, Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets *Pharmacology & Therapeutics.* 2013. 07.004, **2013.**

[172] C. Penna, D. Mancardi, R. Rastaldo, P. Pagliaro, Cardioprotection: A radical view free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 781-793, **2009**.

[173] A. Capasso, Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules* 18: 690-700, **2013**.

[174] D. Grassi, G. Desideri, C. Ferri, Flavoniods: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2: 889-902, **2010**.

[175] E. Pérez-Pérez, P. Vit, F. Huq, Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine* 1(4): 63-72, **2013**.

[176] A.V. Ivanov, B. Bartosch, O.A. Smirnova, M.G. Isaguliants, S.N. Kochetkov, HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses* **5**: 439-469, **2013**.

[177] G. Kocsy, I. Tari, R. Vanková, B. Zechmann, Z. Gulyás, P. Poór, G. Galiba, Redox control of plant growth and development. *Plant Science* 211, 77-91, **2013**.

[178] M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets, Role of peroxisomes in ROS/ RNS-metabolism: implication of human disease. *Biochemica et Biophyicas Acta* **1822**: 1363-1373, **2012.**

[179] C.K. Roberts, K.K. Sindhu, Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* 84: 705–712, **2009**.

[180] E. Bargagli, C. Olivieri, D. Bennett, A. Prasse, J. Mullerquernheim, P. Rottoli, Oxidative stress in the pathgenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med* 103, 1245-1256, **2009**.

[181] M. Ahmed, M.I. Khan, M.R. Khan, N. Muhammad, A.U. Khan, R. Ali Khan, Role of medicinal plants in oxidative stress and cancer. *Open Access Scientific Reports* 2(2): 1-3, **2013**.

[182] P. Ma, Y. Wu, Q. Zeng, Y. Gan, J. Chen, Ye X. and X. Yang, Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and Chemical Toxicology* **58**: 177-183, **2013.**

[183] S. Borrego, A. Vazquez, F. Dasí, C. Cerdá, A. Iradi, C. Tormos, J.M. Sánchez, L. Bagán, J. Boix, C. Zaragoza, J. Camps and G. Sáez , Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dg) as a possible tumor marker. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 3467-3486, **2013**.

[184] E. Shacter. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews* **32(3&4)**: 307-326, **2000**.

[185] S. Kuka, Z. Tatarkova and P. Kaplan. Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta Medica Martiniana* **12(1)**: 5-11, **2012**.

[186] Y. Zhao, J. Dou, T. Wu and H. Akber Aisa. Investigating the Antioxidant and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceam. Molecules* **18**: 951-962, **2013**.

[187] A. Rofi'I, F. Fatchiyah, P. Rahayu, R. Muhyi, S.B. Sumitro. Reactive oxygen species, NFlevels in tissue of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science.* **2(2)**: 143-147, **2013**.

[188] T.B.A. Devasagayam, J.C. Tilak, K.K. Boloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi and R.D. Lele. Free radical and antioxidants in human health: current status and future prospects. *JAPI* **52**: 794-804, **2004**.

[189] K. Rajesh, A.H.M V. Swamy, S.S. Inamdar, V. Joshi and A.N**.** Kurnool. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of mentha arvensis leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *International Journal of PharmTech Research* **5(2)**: 426-430, **2013**.

[190] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem 125*, 288–306, **2011.**

[191] M. Inoue, L.E. Craker, Medicinal and aromatic plantsduses and functions. In: Dixon, G.R., Aldous, D.E. (Eds.), Horticulture: Plants for People and Places, Environmental Horticulture, vol. 2. Springer, Sherborne, UK, **2014.**

[193] J. Giacometti, D.B. Kovacevic, P. Putnik, D. Gabric, T. Bilusic, G. Kresic, V. Stulic, F.J. Barba, F. Chemat, G. BarbosaCanovas, R. Jambrak. Extraction of bioactive compounds and essential oils from Mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: a review. Food Res. Int. 113, 245e262, **2018.**

[194] M.S. Oliveira, M.M. Almeida, M.L.A.R. Salazar, F.C.S. Pires, F.W.F. Bezerra, V.M.B. Cunha, R.M. COrdeiro, G.R.O. Urbina, M.P. Silva, A.P.S. Silva, R.H.H. Pinto, R.N. Carvalho Junior. Potential of medicinal use of essential oils from aromatic plants. In: El-Shemy, H. (Ed.), Potential of Essential Oils. IntechOpen, London, UK, **2018.**

[195] P. Wesley Schultz. The structure of environmental concern: concern for self, other people, and the biosphere. J. Environ. Psychol. 21, 327e339, **2001**.

[196] E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas, P. Florou-Paneri, Aromatic plants as a source of bioactive compounds. Agriculture 2, 228e243, **2012**.

[197] I. Giannenas, E. Bonos, E. Christaki, P. Florou-Paneri. Essential oils and their applications in animal nutrition. Med. Arom. Plant. 2, 140, **2013**.

[198] S. Sen, R. Chakraborty. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: importance, challenges and future. J. Tradit. Complement. Med. 7, 234e244, **2016.**

[199] A.D. Solomou, K. Martinos, E. Skoufogianni, N.G. Danalatos,. Medicinal and aromatic plants diversity in Greece and their future prospects: a review. Agric. Sci. 4, 9e21 **2016**.

[200] M. S. Alwash, N. Ibrahim and W. Y. Ahmad. Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum linn* leaves. *American Journal of Infectious Diseases* **9(2)**: 46-58, **2013**.

[201] I. Bagre, C. Bahi, G. Gnahoue, A. J Djaman and G F**.** Guede. Composition phytochimique et evaluation in vitro de l'activite antifongique des extraits des feuilles de Morinda morindoides )baker( milne-redhead (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans. J. sci. pharm. biol* **8(1)**: 15-23, **2007**.

[202] Z.D. Stevanovic, J. Bosnjak-Neumuller, I. Pajic-Lijakovic, J. Raj, M. Vasijevic. Essential oils as feed additives - future perspectives. Molecules 23, 1717, **2018.**

[203] G. Gebreyohannes, F. Moges, S. Sahile, N. Raja. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed.* **3(6)**: 426-435, **2013**.
[204] F.C. Tenover. Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine.* **119 (6A)**: S3-S10, **2006**.
[205] L. Rizzo, C. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M.C. Ploy, I.Michael, D. Fatta-Kassinos. Urban Wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*. **447**: 345–360, **2013**.
[206] M C. Sahu, N. K . Debata. and R. N. Padhy. Antibacterial activity of Argemone mexicana L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S800 - S807, **2012.**
[207] M. Sivananthan. Antibacterial activity of 50 medicinal plants used in folk medicine. *Int. J. Biosci*. **3(4)**: 104-121, **2013**.
[208] A. Rodríguez-Rojas, J. Rodríguez-Beltrán, A. Couce, J. Blázquez. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology.* **303**: 293–297, **2013.**
[209] K. Dhama, S.K. Latheef, S. Mani, H.A. Samad, K. Karthik, R. Tiwari, R.U. Khan, M. Alagawany, M.R. Farag, G.M. Alam, V. Laudadio, V. Tufarelli. Multiple Beneficial applications and modes of action of herbs in poultry health and production-A review. Int. J. Pharmacol. 11, 152e176, **2015.**
[210] M.-L. Gaucher, S. Quessy, A. Letellier, J. Arsenault, M. Boulianne,. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, Clostridium perfringens and Campylobacter jejuni occurrences at the farm level. Poult. Sci. 94, 1791e1801, **2015**.
[211] G. Suresh, R.K. Das, S. Kaur Brar, T. Rouissi, A. Avalos Ramirez, Y. Chorfi, S. Godbout. Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. Crit. Rev. Microbiol. 44, 318e355, **2018.**
[212] M. Nic, L. Hovorka, J. Jirat, B. Kosata, et J. Znamenacek,. International Union of Pure and Applied Chemistry, **2005**.
[213] G.P. LEGRY, Corrosion: Vieillissement, Tech. Ing. Corros. Vieil. **2003**.
[214] P. Marcus, Surface science approach of corrosion phenomena, Electrochimica Acta, 43 109–118, **1998**.
[215] J.-L. CROLET, G. BERANGER, Tech. Ing. Matér. Métalliques, **1998**
[216] C.D. Fernández-Solis, A. Vimalanandan, A. Altin, J.S. Mondragón-Ochoa, K. Kreth, P. Keil, A. Erbe, Lang, Y. Liu (Eds.), Soft Matter Aqueous Interfaces, Springer International Publishing, Cham, pp. 29–70, **2016**.
[217] B. Normand, PPUR presses polytechniques, **2004**.
[218] A. Popova, E. Sokolova, S. Raicheva, et M. Christov, Corros. Sci., 45, 33–58, **2003**.
[219] D.J. Constable, A.D. Curzons, V.L. Cunningham, Metrics to 'green' chemistrydwhich are the best? Green Chemistry 4 ; 521e527 **2002**.
[220] C. Verma, E.E. Ebenso, I. Bahadur, M. Quraishi, An overview on plant extracts as environmental sustainable and green corrosion inhibitors for metals and alloys in aggressive corrosive media, Journal of Molecular Liquids 266, 577e590 **2018**.
[221] S.A. Umoren, U.M. Eduok, Application of carbohydrate polymers as corrosion

inhibitors for metal substrates in different media: a review, Carbohydrate Polymers 140, 314e341 **2016.**
[222] S.A. El Rehim, S.M. Sayyah, M.M. El-Deeb, S.M. Kamal, R.E. Azooz, *Mater. Chem. Phys.*, 123, 20–27, **2010**.
[223] E. McCafferty, N. Hackerman, *J. Electrochem. Soc*., 119, 999–1009, **1972**.
[224] S. Sternberg, V. Brânzoi, *Electrochimica Acta*, 29, 15–19, **1984**.

# Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des produits naturels issus des plantes aromatiques médicinales. Nous avons voulu apporter par la présente contribution une meilleure connaissance de six plantes (à caractère médicinal et/ou agroalimentaire) très peu étudiées jusqu'à présent. Dans ce contexte et dans l'optique de rechercher de nouveaux composés bioactifs, douze types d'extraits au solvant (macération, soxhlet) appartenant à six différentes familles de plantes, ont été évalués leurs effets antioxydant et antimicobien pour des applications dans le domaine agroalimentaire et/ou pharmaceutique. Ainsi, notre étude se propose d'évaluer *in vitro* les deux activités suivantes: antioxydantes et biologiques (activité antibactérienne), et d'étudier leur pouvoir inhibiteur de corrosion vis-à-vis de l'acier doux en milieu acide.

## *I. Matériel*

### *I.1. Matériel végétal*

Les six plantes ciblées et explorées au cours de notre étude ont été sélectionnées sur la base d'une recherche bibliographique méticuleuse, qui a montré que ces espèces végétales sont très peu étudiées. L'endémisme était un autre facteur important et a été pris en considération lors de notre choix.

Les six plantes utilisées (appartenant à des familles différentes) ont été récoltées durant la période allant du mois d'avril jusqu'au mois de septembre 2018. Ces dernières ont été séchées pendant une semaine dans un milieu frais, sec et aéré. Après séchage, les différentes plantes ont été broyées finement et stockées dans une boîte en plastique opaque jusqu'à utilisation ultérieure. Les informations concernant les espèces végétales étudiées (nom latin, famille, et parties utilisées) sont mentionnées dans le tableau II.1:

**Tableau II.1:** Noms, familles et parties investiguées des espèces végétales étudiées.

| Plante | Nom latin | Nom vernaculaire Arabe | Famille | Partie utilisée |
|---|---|---|---|---|
| Grenadier | *Punica granatum* | الرمان | Lythracées | Ecorces |
| Garance | *Rubia tinctorum* | الفوة | Rubiacées | Racines |
| Coquelicot | *Papaver rhoeas* | شقائق النعمان | Papavéracées | Fleurs |
| Hibiscus | *Hibiscus sabdareiffa* | الكركدي | Malvacées | Fleurs |
| Chêne Vert | *Quercus ilex* | السنديان الاخضر | Fagacées | Ecorces |
| Henné | *Lawsonia inermis* | الحناء | Lythracées | Feuilles |

**Tableau II.2** Taxonomie des plantes étudiées.

| **Classification scientifique** | ***Punica granatum*** | ***Rubia tinctorum*** | ***Papaver rhoeas*** | ***Hibiscus sabdariffa*** | ***Quercus ilex*** | ***Lawsonia inermis*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Règne** | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae |
| **Sous règne** | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaeplantae | Viridaepl-antae | Viridaeplantae |
| **Embranchement** | Spermaphytes | Spermatophytes | Spermatophytes | Angiospermes | Magnoli--ophyta | Angiospermes |
| **Classe** | Equisetopsida | Equisetopsida | Equisetopsida | Equisetopsida | Equiset--psida | Equisetopsida |
| **Ordre** | Myrtales | Gentianales | Ranunculales | Malvales | Fagales | Myrtales |
| **Sous-classe** | Magholiidae | Magholiidae | Magholiidae | Magholiidae | Magholii-dae | Magholiidae |
| **Famille** | **Lythracées** | **Rubiacées** | **Papaveracées** | **Malvacées** | **Fagacées** | **Lythracées** |
| **Sous-famille** | Punicoideae | Rubioideae | | Malvoideae | Fagoidées | Lagerstroemioideae |
| **Tribu** | Pyrées | Rubieae | Fumaroidae | Hibisceae | | Lythreae |
| **Genre** | Punica | Rubia | Papaver | Hibiscus | Quercus | Lawsonia L. |
| **Espèce** | *P. granatum* | *R. tinctorum* | *P. rhoeas* | *H. sabdariffa* | *Q. ilex* | *L. inermis* |
| **Synonyme** | *Granatum puniceum*<br>*Granatum punicum*<br>*Punica florida*<br>*Punica granatum*<br>*Punica granatum var.*<br>*Punica nana*<br>*Punica spinosa*<br>*Rhoea punica* | *Galium rubia*<br>*Rubia iberica*<br>*Rubia peregrina*<br>*Rubia sylvestris* | *Papaver commutatum*.<br>*Papaver insignitum*<br>*Papaver intermedium*<br>*Papaver roubiaei*<br>*Papaver strigosum*<br>*Papaver tenuissimum*<br>*Papaver trilobum*<br>*Papaver tumidulum* | *Hibiscus fraternus* | *Quercus cookii*<br>*Quercus expansa*<br>*Quercus gracilis*<br>*Quercus gramuntia*<br>*Quercus ilex* subsp. | *Lawsonia alba*<br>• *Lawsonia purpurea*<br>• *Lawsonia speciosa*<br>• *Lawsonia spinosa* |

*I.2. Produits chimiques et solvants*

Les standards (références) utilisées dans ce travail comme l'acide gallique, quercétine et catéchine pour la qualification de l'instrument UV (dosage) ainsi que les réactifs antioxydants suivants : acide ascorbique, diphényl-picryl-hydrazyl ($DPPH^{\cdot}$), tripyridyltriazine ferreux [$(Fe(II)\text{-}TPTZ)_2$] sont de qualité purs et proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Tous les solvants d'analyses utilisés sont de grade analytique (grade HPLC) ou spectroscopique (Prolabo) et dont les propriétés physico-chimiques sont consignés dans le tableau II.2.

**Tableau II.3:** Propriétés physico-chimiques et indice de polarité des solvants utilisés lors de l'extraction.

| Solvant | Masse molaire ($g.mol^{-1}$) | Température d'ébullition (°C) | Densité | Miscibilité avec l'eau | Indice de polarité |
|---|---|---|---|---|---|
| méthanol | 32 | 64.7 | 0.79 | Oui | 6,6 |
| acétone | 58 | 56 | 0.8 | Oui | 5,1 |
| acétate d'éthyle | 88.1 | 77.1 | 0.9 | 87g.L-1 à 20 °C | 4,3 |
| hexane | 86.18 | 68.73 | 0.66 | Non | 0 |

*I.3. Souches bactériennes*

Six souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude dont trois à $Gram^{+}$ (*Staphylococcus aureus; Listeria monocytogenes* et *Enterobacter faecalis*) et trois à $Gram^{-}$ (*Echerchia coli, Klebsiella pneumonia et Salmonella sp*). Tous les souches ont été conservés sur des billes Microbank (Prolab Diagnostics Ltd.) dans le Bouillon de soja tryptique (TSB) avec 15 % de glycérol et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Ces perles ont été ranimées sur des supports de l'agar tryptone soja (TSA) dans des conditions normales. La partie réservée aux tests antibactériens a été effectuée au sein du Laboratoire de Microbiologique à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès dirigé par le Professeur Dr. Bahia BENNANI. Ces organismes (souches bactériennes) sont souvent utilisés comme modèle pour les tests de sensibilité aux études antibactériennes.

*II. Méthodes*

*II.1. Méthodologie*

Nous avons adopté une approche permettant de sélectionner les plantes potentiellement actives afin d'augmenter significativement les chances de découvrir de nouveaux constituants actifs. Ainsi, notre démarche expérimentale est résumée selon le schéma suivant (Figure II.1).

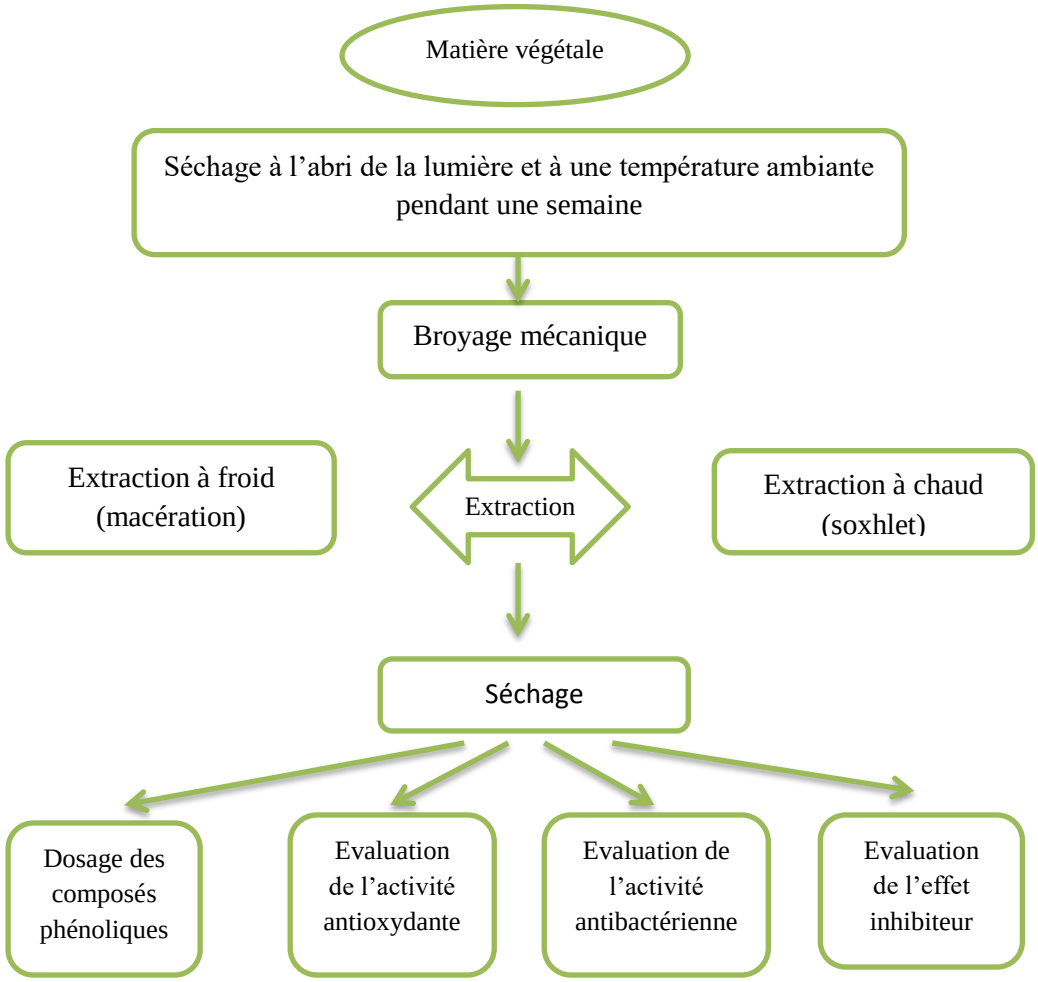



**Figure II.1**: Démarche expérimentale d'extraction (macération, soxhlet) et d'évaluation des extraits au solvant de six différentes plantes étudiées.

*II.2. Préparation des extraits bruts*

Les extraits bruts des poudres séches issues des plantes médicinales suivantes : *Punica granatum* L., *Rubia tinctorum* L., *Papaver rhoeas* L., *Hibiscus sabdareiffa*, *Quercus ilex* et *Lawsonia inermis* L., ont été obtenus par les techniques de macération et d'extraction au soxhlet. Les extractions ont été effectuées selon la procédure modifiée décrite par Kisangau et

al. (2007) [2]. L'extraction au soxhlet a été effectuée en plaçant le matériel végétal dans une cartouche poreuse en cellulose, qui est ensuite introduite dans l'appareil de soxhlet. Chaque extraction a été effectuée dans chacun des quatre solvants suivants de polarités différentes : acétone, acétate d'éthyle, méthanol et un mélange méthanol/acétate d'éthyle/hexane (40 : 40 : 20 v/v/v). Le rapport entre la masse de l'échantillon introduit et le volume du solvant utilisé était de 1/10 (p/v). L'extraction est arrêtée dès que la couleur du solvant apparaisse claire dans la partie supérieure de l'extracteur soxhlet (figure II.2). Quant à la procédure de macération, le matériel végétal a été macéré avec les mêmes types de solvants précédemment évoqués dans le cas du soxhlet. les solvants étaient changés quotidiennement et le solvant collecté était stocké dans le réfrigérateur,. Les extraits obtenus à partir des deux procédures ont ensuite été filtrés deux fois sous vide et sur du papier Whatman No.1. D'éventuelles traces d'eau qui risquent d'être présentes dans le milieu ont été éliminées en ajoutant du sulfate de sodium anhydre ($Na_2SO_4$). Les extraits ont été concentrés sous pression à l'aide de l'évaporateur rotatif, puis conservés dans des récipients en verre opaque à l'abri de la lumière et maintenus à la température de -4°C pour analyses ultérieures.

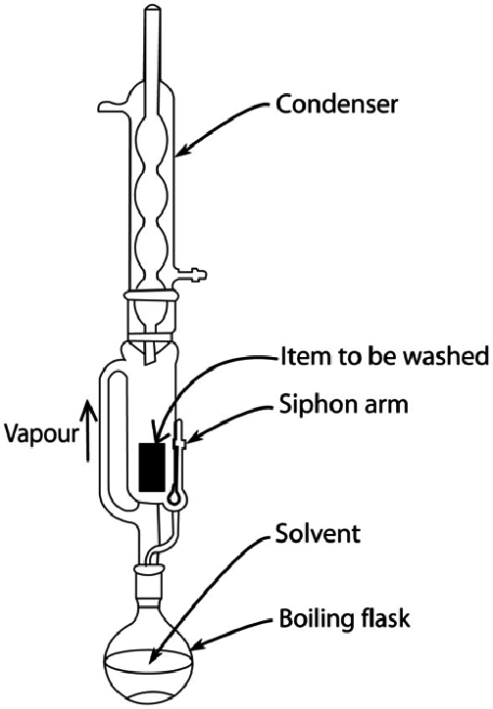



**Figure II.2:** Diagramme schématique d'un appareil d'extraction soxhlet.

*II.3. Screening phytochimique*

Une fois le matériel végétal prétraité, les parties de la plante ciblées ont été soumises à différents types de tests pour pouvoir détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels présents dans l'échantillon, ceci le criblage ‘‘*screening*’’ phytochimique.
Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée est mise en évidence par l’utilisation d'un réactif approprié.

*II.3.1. Révélation des polyphénols*

Afin d'évaluer la présence de polyphénols, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique ($FeCl_3$) a été ajoutée à 2 mL de l'extrait. L'apparition d’une couleur bleu-noirâtre confirme ainsi la présence de polyphénols [3].

*II.3.2. Révélation des flavonoïdes*

Dans un tube à essai, quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et 2 à 3 copeaux de magnésium ont été ajoutés à 5 mL de l'extrait de plante étudiée. Une coloration orange-rosâtre ou violacée indique la présence de flavonoïdes.

*II.3.3. Révélation des saponines*

Dans un tube à essai contenant 5 ml de l'extrait, 10 mL d'eau distillée ont été ajoutées, puis agitées pendant 20 s et laissées se reposer pendant 15 min. L'apparition d'une mousse persistante de plus d’un centimètre (1 cm) de hauteur indique la présence de saponosides [4].

*II.3.4. Révélation des stérols et des polyterpènes*

1 ml d'anhydride acétique, 0,5 mL de chloroforme et 0,5 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés respectivement à 5 mL de l'extrait. L'apparition d'un anneau violet ou pourpre (à l'interphase) tournant au bleu puis au vert, indique la présence de stérols et de polyterpènes (Ghedadba et al. 2015 [5]).

*II.3.5. Révélation des alcaloïdes*

Dans un bain-marie, 6 mL d’acide chlorhydrique (HCL) à 1% ont été ajoutés à 15 mg d'extrait de la plante pendant 5 min. Après filtration du mélange, 1 mL de solution d'iodure de potassium mercurique (réactif de Mayer) a été ajouté, la formation d'un précipité de couleur crèmeuse indique la présence d'alcaloïdes [6].

Les résultats sont évalués comme suit :

| Fortement positif | Moyennement positif | Faiblement positif | Négatif |
|---|---|---|---|
| +++ | ++ | + | - |

*II.4. Dosage des composés phénoliques*

La détermination des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes totaux présents dans les différents extraits de plantes étudiées a été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type Cary 50.

Les différents types d'extraits étudiés ont été soumis à des analyses à la fois qualitative et quantitative, généralement basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation, suivies de recherche des teneurs de constituants par dosage spectrophotométrique UV (mesure d'absorbances accompagnées des longueurs d'onde spécifiques). Cette dernière démarche s'effectue après avoir étalonné le dispositif (spectrophotomètre UV) selon les normes spécifiques liées à chacun des constituants recherchés.

*II.4.1 Détermination du contenu phénolique total*

Le contenu phénolique total des extraits étudiés a été déterminé en utilisant le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu, Singleton et al. 1999 [8] et Li et al. 2007 [9]). Un volume de 200 µL d'extrait méthanolique a été mélangé avec 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu récemment préparé (dilué 10 fois) et 0,8 mL de $Na_2CO_3$ (75 mg/ml soit 7,5%). Le mélange a été incubé et laissé dans l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. La valeur de l'absorbance a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à la longueur d'onde de 760 nm (et Brahmi et al. 2020 [10]), extraite à partir de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme référence.

La teneur en phénol total a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par rapport à 1g de la matière sèche (mg EAG/g MS). Les données obtenues représentent la moyenne d'une analyse répétée trois fois.

Avant enregistrement des spectres UV, l'échantillon a été agité soigneusement à l'aide d'un agitateur MS1 Minishaker IKA (allant jusqu'à 2500 tr/min) afin d'homogénéiser le milieu et d'éviter le dépôt sur les parois.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme standard et dilué à différentes concentrations est représentée dans la Figure II.3.

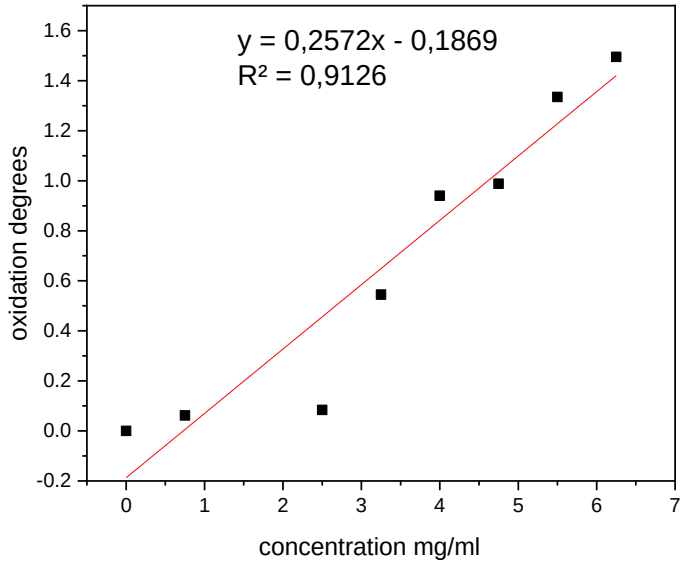



**Figure II.3 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme étalon (760 nm).

*II.4.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes*

La quantification de la teneur totale en flavonoïdes a été réalisée en utilisant la procédure (dosage) colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme réactif (Kasmi et al. 2017 [11]). Dans un tube à hémolyse en verre, 120 µl de nitrite de sodium $NaNO_2$ (5%) sont ajoutés à 400 µl d'extrait, ou d'étalon, ou d'eau distillée. Après 5 minutes, on ajoute 120 µl d'une solution de $AlCl_3$ à 10% et le mélange a été agité d'une manière vigoureuse à l'aide d'un vortex. Une fois les 6 minutes écoulées, un volume de 800 µl de NaOH 1M a été ajouté au milieu, puis agité vigoureusement à l'aide d'un vortex. L'absorbance a été immédiatement déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à la longueur d'onde de 510 nm [7,11]. Une solution méthanolique (solution mère) du standard quercétine (flavon-3-ol) a été préparée et dont les solutions filles issues de cette dernière ont été aussi préparées à différentes concentrations allant de 0 jusqu'à 1000 µg/ml, et qui seront exploitées par la suite pour tracer la courbe d'étalonnage (calibrage ou qualification de l'appareil). Les résultats ont été exprimés sous la forme mg équivalent quercitine par rapport à 1g de la matière sèche (mg EQ/g MS). Les données obtenues constituent la moyenne d'une analyse effectuée en triple.

La courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée comme référence et diluée à différentes concentrations est représentée dans la Figure II.4.

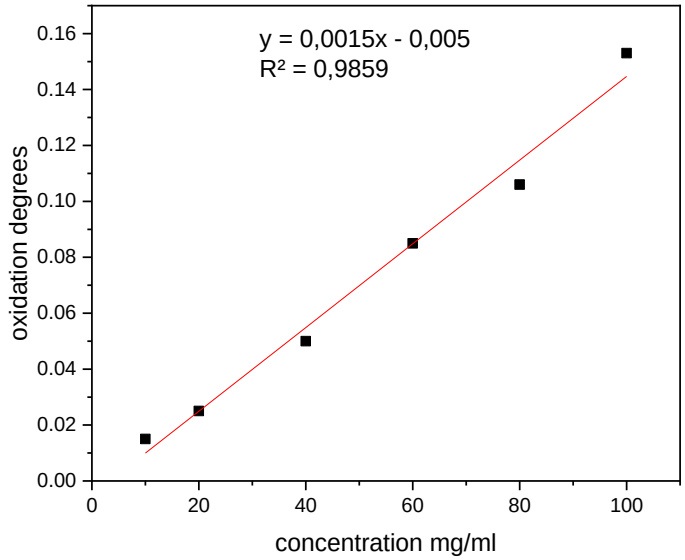



**Figure II.4:** Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée comme étalon (256 et 372 nm).

*II.5. Techniques spectroscopiques d'identification des extraits de plantes*

*II.5.1. Caractérisation par spectrophotométrie ultra-violet et visible des constituants contenus dans les extraits étudiés.*

L'analyse par spectrophotométrie UV a été réalisée sur un spectrophotomètre UV-visible de type Jasco 630. Les échantillons ont été dissous dans une solution de méthanol (grade spectroscopique) et enregistrés dans la région spectrale ultraviolette (200-400 nm) et visible (400-800 nm). L'absorption maximale ($\lambda_{max}$) des échantillons étudiés dans la plage spectrale UV-visible (200-800 nm) a été mesurée avec une résolution de 1 nm. Les cellules étaient des cuvettes en quartz rectangulaire avec une longueur de parcours de 1 cm. Les spectres ont été collectés à température ambiante, et les résultats obtenus constituent une moyenne d'analyse répétée deux fois. L'approche analytique adoptée par spectrophotométrie UV sert à déterminer à la fois les longueurs d'onde ainsi que leurs absorbances correspondantes.

*II.5.2. Investigation structurale par spectroscopie infrarouge (IRTF) des groupements fonctionnels contenus dans les extraits étudiés*

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) ont été enregistrés en mode de transmission sur un spectromètre FT-IR Vertex 70 avec une résolution de 4 $cm^{-1}$ et un nombre d'accumulations de 32, en utilisant le bromure de potassium (KBr) en poudre pour l'élaboration des pastilles. La plage spectrale des fréquences était comprise entre 4000 et 400

$cm^{-1}$. Les pastilles de KBr ont été obtenues en broyant une petite quantité de l'échantillon avec du bromure de potassium (KBr) en poudre de qualité IR, le mélange est ensuite soumis à une pression de 10 tonnes par $cm^2$ dans un moule cylindrique de 13 mm de diamètre. Les spectres ont été collectés en double et à température ambiante, avec des ajustements de la ligne de base et une normalisation du signal en utilisant la méthode d'apaisement pour éliminer le bruit de fond des signaux. Les données spectrales des différents extraits sont traitées par le logiciel informatique Origin 2018 68bit.

### *II.6. Activités antioxydantes*

#### *II.6.1. Capacité antioxydante totale (CAT)*

La capacité antioxydante totale (CAT) de l'extrait a été évaluée en utilisant la procédure au phosphomolybdène (Prieto et al. (1999) [14]). Cette méthode est basée sur la réduction du molybdène Mo(VI) en Mo(V) (transformation de l'ion molybdate $MoO_4^{2-}$ en $MoO^{2+}$) en présence de l'extrait ciblé, formant à pH acide un complexe phosphate / Mo(V) de couleur verte.

La procédure consiste à mélanger 0,3 mL de chaque extrait méthanolique en présence de 3 mL d'une solution du réactif suivant : (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Après incubation à 95 °C pendant 90 minutes, on refroidit le mélange, et on mesure l'absorbance de la solution du blanc à 695 nm. La solution du blanc contient 3 mL d'une solution du réactif précédemment décrit en présence de 0,3 mL de méthanol, puis incubée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon (extrait). La capacité antioxydante totale est exprimée en équivalents milligrammes d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA / g MS). L'expérience a été répétée trois fois.

#### *II.6.2. Piégeage du radical 2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$)*

Pour évaluer l'activité antiradicalaire de nos extraits méthanoliques, nous avons utilisé en premier lieu le protocole expérimental qui est basé sur le radical libre : diphényl picryl-hydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) (Mansouri et al. 2005 [15]). Ce dernier est connu par sa couleur violette avant réaction, qui est ensuite réduit par les antioxydants (phénols des extraits) dont la couleur est jaune (caractéristique de sa réduction). L'apparition de cette coloration jaune est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante de notre extraits [16].

La procédure expérimentale consiste à travailler avec 1300 µL d'une solution alcoolique de DPPH (0,004% préparé dans du méthanol), additionnée à 100 µL de la solution de l'extrait

contre un blanc (100 µl de méthanol pour le contrôle négatif). L'incubation a été effectuée pendant 30 minutes, à température ambiante et dans l'obscurité. Dans les mêmes conditions de nos échantillons, nous avons mesuré l'absorbance à 517 nm de l'étalon qui est l'acide ascorbique, considéré comme antioxydant standard contre le radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH) pour le contrôle positif de chaque concentration. Tous les tests sont répétés trois fois.
L'activité antioxydante des différents échantillons étudiés a été estimée en exploitant l'équation (1) donnée ci-après.

$$\%\ d'activité\ antiradicalaire = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100 \quad (1)$$

avec : $A_0$ est l'absorbance du contrôle négatif (échantillon blanc contenant la même quantité de solvant et de solution de DPPH) et $A_1$ est l'absorbance de l'échantillon.
Les valeurs de l'activité antiradicalaire (CI50) peuvent être déterminées graphiquement par régression linéaire, informant sur la concentration inhibitrice de 50% du radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH·).
Le schéma suivant (Figure II.5) illustre la réduction du radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH·) en présence des antioxydants présents dans les extraits étudiés.

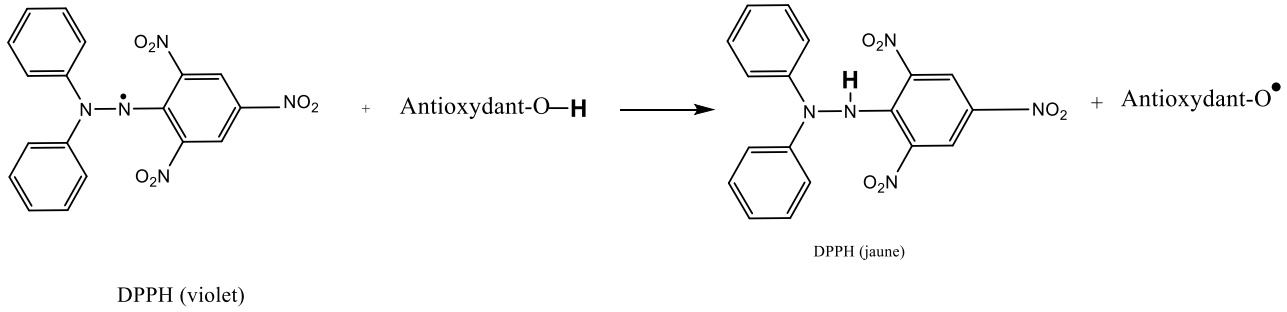
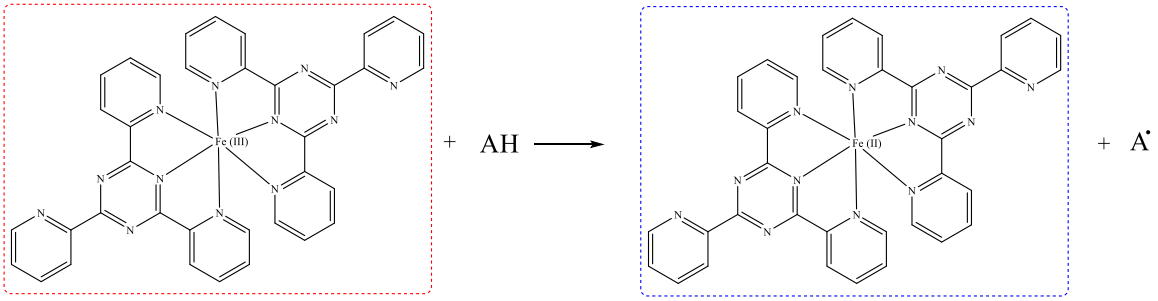



**Figure II.5:** Réaction de réduction du radical DPPH· (Couleur violet) avec l'antioxydant présent dans l'extrait favorisant la formation du DPPH (couleur jaune)

*II.6.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)*

La méthode du pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) a été développée par Benzie et Strain (1996) [17] et correspond à la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)$_2$] en un nouveau complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)$_2$], via l'ajout d'un antioxydant de type AH, en milieu acide à pH=3,6 permettant de maintenir la solubilité du fer (Figure II.6).
La solution du test FRAP a été préparée en mélangeant les trois solutions suivantes: solution tampon d'acétate de sodium à 300 mM (pH= 3.6), solution TPTZ à 10 mM (HCL 40 mM

comme solvant) et une solution de $FeCl_3$ à 20 mM, dont les volumes respectifs sont 10/1/1 (v/v/v). La solution de test FRAP est maintenue dans un bain thermostaté à la température de 37°C. Le test consiste à faire réagir, dans des tubes à hémolyse en verre, 100 µL de chaque extrait avec 3 mL de la solution de test FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à la longueur d'onde de 593 nm, et ce après 4 min d'incubation à température ambiante.




**Fe (III)- TPTZ** **Fe (II)- TPTZ**

**Figure II.6:** Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) : Réaction de réduction entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et l'antioxydant (AH) présent dans l'extrait.

*II.7. Activités antibactériennes*

*II.7.1 Souche bactérienne et préparation de l'inoculum*

Les extraits des six plantes ont été testés contre trois types de bactéries à gram-négatives (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia* et *Salmonella*) et trois autres à gram-positives (*Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes* et *Enterobacter faecalis*). Ces souches bactériennes sont responsables d'infections nosocomiales et sont isolées chez les patients cliniques de l'unité de soins intensifs en milieu hospitalier (CHU de Fès, Maroc). Elles ont été conservées à -20°C dans une solution mère de 20 % de glycérol. Avant utilisation, des sous-cultures fraîches ont été réalisées en milieu de gélose Muller-Hinton (MHA) à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, 2 à 3 colonies ont atteint de manière aseptique un pic dans une solution saline physiologique stérile par une boucle de fil métallique. La turbidité a été ajustée sur une échelle de 0,5 McFarland avec un spectrophotomètre UV (625 nm) pour atteindre une concentration finale de 108 CFU/mL [18].

*II.7.2. Méthode de diffusion de disque*

D'après Balouiri et al. 2016 [18], un dépistage antibactérien préliminaire est nécessaire sur les extraits préparés lors de l'utilisation de la méthode de diffusion de disque. En bref, l'inoculum

bactérien préparé au préalable a été utilisé pour inoculer une boîte de Pétri contenant du milieu MHA. Ensuite, 15 µL de l''extrait brut de chaque plante ont été appliqués sur des disques de papier filtre stérile de 6 mm (Whatman No.1, Sigma Aldrich, UK) sur la surface de gélose et immergés dans une boîte. L'expérience a été réalisée en triple et les plaques ont été incubées pendant 24 h à la température de 37 °C. L'activité inhibitrice des composés a été déterminée en comparant les tailles moyennes des zones d'inhibition (mm), y compris les disques diamètre, des différents extraits avec ceux des contrôles.

*II.7.3. Antibiogramme*

Afin d'étudier la sensibilité des souches bactériennes via la même méthode de diffusion de disque, huit antibiotiques disponibles dans le commerce (15 µg/disque) ont été testés : érythromycine (famille des macrolides), ofloxacine et (norfloxacine**)** (famille des quinolones), et cinq autres appartenant à la famille des β-lactames (ticarcilline du groupe carboxypénicilline), oxacilline (groupe pénicilline M), ampicilline (groupe pénicilline), et deux antibiotiques : ceftazidime et cefotaxime (groupe céphalosporine de troisième génération).

*II.7.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) représente la plus faible concentration d'extrait qui inhibe complètement la croissance bactérienne. Selon l'expérience du Comité national des laboratoires cliniques, le test de micro-dilution a été utilisé dans 96 microplaques de puits avec quelques modifications. En bref, chaque extrait a été dilué en série dans de l'eau distillée stérile additionnée de 0,2% (p/v) de gélose bactérienne, de sorte que la concentration finale de chaque extrait était respectivement de 60 à 0,014 mg/mL. Ensuite, 50 µL d'inoculum bactérien ont été ajoutés à chaque puits à une concentration finale de 1,5 106 UFC/ mL. Après une incubation de 18 à 24 heures à 37°C, ajouter 20 µL de solution aqueuse de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (1%) à chaque puits, et incuber pendant une heure supplémentaire.

La concentration bactéricide minimale (CMB), qui est considérée comme la concentration la plus faible de l'échantillon à laquelle les souches bactériennes inoculées sont détruites, a été déterminée comme suit par inoculation du contenu de tous les puits après détermination de la CMI sur milieu de gélose Mueller Hinton et incubée à la température de 37°C entre 18-24 heures. La concentration la plus faible de l'extrait, qui n'a permis à aucune bactérie de survivre, était conforme à la CMB [19].

*II.8. Pouvoir inhibiteur de corrosion*

Cette partie a pour vocation de présenter les méthodes expérimentales suivantes : électrochimiques, gravimétrique, et les techniques d'analyse de surface (MEB, EDX) que nous avons adoptées pour réaliser le présent travail. Une description des montages et des procédures expérimentales a été également mentionnée.

*II.8.1. Conditions expérimentales*

*II.8.1.1. Echantillons utilisés*

Le matériau testé dans cette étude est un acier doux dont la composition chimique est illustrée dans le tableau II.3.

**Tableau II.4:** Composition chimique des échantillons de l'acier utilisé

| Eléments | Fe | Si | C | Mn | S | P | Al |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Teneur (%) | 99,12 | 0,38 | 0,21 | 0,05 | 0,05 | 0,09 | 0,01 |

Les teneurs en éléments normaux d'élaboration des constituants chimiques comme le Mn, Si, Cr, Mo, Ni, Al, Cu et W se trouvent relativement faibles (< 5 %), et par voie de conséquence caractérisent la présence d'un acier non allié.

*II.8.1.2 Préparation des échantillons et du milieu corrosif*

Dans le but d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, l'électrode de travail doit être traitée avant chaque opération. Le test du prétraitement consiste d'abord à polir la surface de l'électrode avec du papier Affinez progressivement abrasif (SiC # 800, # 1200 et # 2400), puis la rincer avec de l'eau bidistillée, et enfin la sécher sous un courant d'air.

Le milieu corrosif est constitué d'une solution d'acide chlorhydrique une fois molaire (HCL 1M), obtenue après dilution avec l'eau bidistillée de l'acide chlorhydrique concentré à 37% et de densité 1.19.

*II.8.2. Techniques expérimentales d'évaluation de la corrosion*

*II.8.2.1. Mesures gravimétriques*

Les mesures gravimétriques ont été effectuées conformément aux normes de l'ASTM G31-72 [20]. Les échantillons d'acier doux de dimensions 10 mm × 40 mm × 0,6 mm ont été grattés avec une série de papiers émeri SIC (220, 400, 800, 1000 et 1200), lavés à l'eau doublement distillée, dégraissés à l'acétone et séchés à température ambiante avant d'être utilisés. Les échantillons ont été pesés avec précision à l'aide d'une balance analytique, puis immergés dans une solution de HCL (1M) avec ou sans ajout d'inhibiteur pendant 6 heures à une température

de 298K. Les substrats en acier ont été retirés, nettoyés pour éliminer le produit de corrosion, lavés à l'eau distillée, puis séchés et pesés.

La perte de masse, le taux de corrosion $W_{corr}$ et l'efficacité d'inhibition ($\eta_W$ %) ont été calculés selon les deux équations suivantes [20]:

$$W_{corr} = \frac{\Delta m}{S \times t} \qquad (2)$$

$$\eta_w(\%) = \frac{w_0 - w}{w_0} \times 100 \qquad (3)$$

Où Δm représente la perte en poids moyen de l'acier doux, S est la surface des échantillons, et t est le temps d'immersion. $W_0$ et W représentent les taux de corrosion sans et avec inhibiteur.

*II.8.2.2. Mesures électrochimiques*

Dans le cadre de la recherche sur l'interface électrode/électrolyte, cas de la corrosion, des techniques électrochimiques aqueuses ont été généralement utilisées. Ils divisent tous les résultats de mesure de potentiel et/ou de courant en deux catégories de techniques : stationnaire et non stationnaire.

La technique dite stationnaire permet l'accès à la courbe potentiel-temps, la dynamique du potentiel, la polarisation cyclique. Quant à la technique non stationnaire (appelée aussi transitoire), elle est basée sur le graphique d'impédance électrochimique. Ces techniques permettent de collecter des informations liées à la dynamique du système étudié.

L'évaluation électrochimique a été réalisée avec un potentiostat de type Versastat 4, contrôlé et géré par un logiciel d'analyse (Versastudio) dans des conditions statiques. Dans cette étude, nous avons utilisé une cellule électrochimique avec trois électrodes : Ag/AgCl comme électrode de référence, un platine d'une surface de 1 $cm^2$ comme électrode auxiliaire et une troisième de surface 1,0 $cm^2$ comme électrode de travail. Les mesures électrochimiques ont été effectuées après stabilisation du potentiel en circuit ouvert (Eocp) durant 30 minutes.

*II.8.2.2.1. Méthodes stationnaires*

*II.8.2.2.1.1. Tracé des courbes de polarisation*

La présente méthode permet de déterminer avec précision les paramètres électrochimiques du métal en contact avec l'électrolyte, comme le courant de corrosion ($I_{corr}$), le potentiel de corrosion ($E_{corr}$), la pente de Tafel, la résistance de polarisation (Rp), etc [21,22]. Bard et al 1980 ont renseigné sur le changement du potentiel appliqué E (t) entre l'électrode de travail et

l'électrode de référence et permet d'enregistrer le changement de la densité du courant i(t) circulant entre les électrodes (électrode de travail et contre-électrode).
Les réactions de corrosion sont divisées en deux catégories et dépendent de l'étape cinétiquement limitante de la réaction [23]:

- ✓ corrosion contrôlée par la cinétique des réactions de transfert de charge à l'interface métal /électrolyte,
- ✓ corrosion contrôlée par la rapidité du transport de masse de l'oxydant ou des produits de corrosion.

Lorsque le transfert de charge limite la réaction sur l'électrode en milieu acide [24], l'équation de Butler-Wolmer exprime la relation entre la surtension η (différence entre le potentiel appliqué au système E et sa valeur à l'équilibre Eeq) et la densité de courant i, impliquant les paramètres cinétiques des deux demi-réactions en électrochimie, tout en considérant les caractéristiques des couples redox. Ainsi, une réaction électrochimique simple et réversible peut s'écrire selon la forme suivante : $\mathrm{Ox} + \mathrm{n}e^- \rightleftarrows \mathrm{Red}$, et dont l'équation de l'intensité peur s'écrire:

$$i(n) = i_a + i_c = i_0 \left( \left( e^{\frac{\alpha n F}{RT}\eta} \right) - \left( e^{-\frac{(1-\alpha) n F}{RT}\eta} \right) \right) \quad (4)$$

avec $\eta = \mathrm{E} - \mathrm{Ecorr}$

i : densité de courant global ($A.cm^{-2}$),
η : surtension appliquée à l'électrode η (V),
α: coefficient de transfert électronique anodique,
(1-α): coefficient de transfert électronique cathodique
n: nombre d'électrons échangés,
$i_0$: courant d'échange correspondant à l'équilibre,
R: Constante des gaz parfaits (8,314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$),
T: Température (°K),
F: Constante de Faraday (96450 C $mol^{-1}$).

En introduisant l'équation (5) dans les pentes de Tafel anode βa et cathode βc, ces dernières peuvent s'écrire comme suit:

$$\beta\mathrm{a} = \frac{RT}{\alpha \mathrm{NF}} \quad ; \quad \beta\mathrm{c} = \frac{-RT}{(1-\alpha) nF} \quad (5)$$

Enfin, l'équation finale de l'intensité est représentée comme suivant:

$$i(\eta) = i_0 \, (e^{\frac{\eta}{\beta a}} - \, e^{\frac{-\eta}{\beta c}}) \quad (6)$$

La représentation linéaire de la densité des courants anodique et cathodique d'une réaction d'électrode est illustrée en Figure II.7.

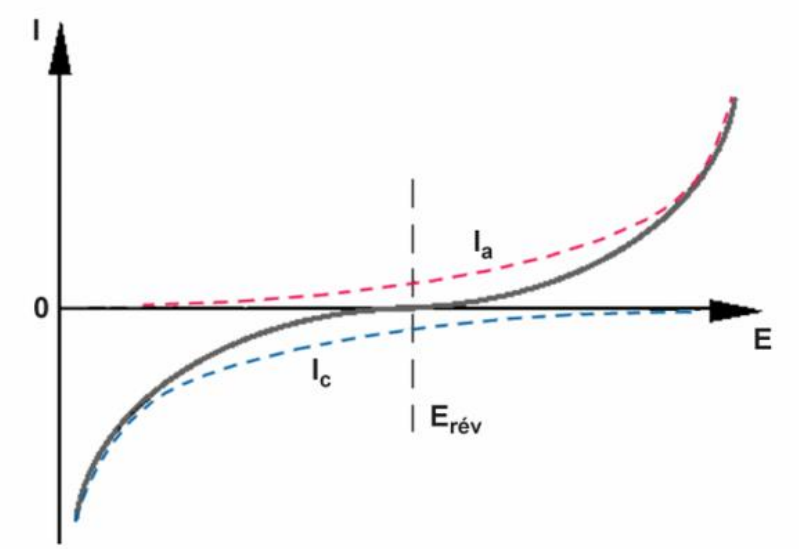



**Figure II.7:** Courbe de polarisation en échelle linéaire (cinétiquement contrôlée par un processus de transfert de charges). Les courbes de polarisation partielles anodique et cathodique sont représentées en pointillés.

La vitesse de corrosion peut être déterminée en fonction de la courbe intensité-potentiel. Dans ce présent travail, la méthode d'extrapolation basée sur la loi de Tafel a été utilisée pour extraire les paramètres électrochimiques pour la mesure de polarisation [25,26]. L'extraction des paramètres électrochimiques relatifs aux courbes de polarisation a été réalisée en adoptant la méthode de Tafel tout en se servant du programme EC-Lab. Le traitement des résultats de la spectroscopie d'impédance présentés dans le plan de Nyquist et de Bode a été effectué en utilisant le logiciel ZView.

*II.8.2.2.1.2. Méthode de polarisation de Tafel*

Pour des valeurs excessives (>> 100 mV), l'un des deux processus anodique ou cathodque est le plus prédominant, indiquant que le système électrochimique est de forte polarisation. Dans ce cas, et après simplification de l'équation de Butler Volmer, une relation linéaire entre le logarithme de la densité de courant et la surtension η est obtenue, appelée Loi de Tafel [22].

Pour la branche anodique $\log|i(\eta)| = \log|i_0| + \frac{\eta}{2.303\beta_a}$ (7)

Pour la branche cathodique $\log|i(\eta)| = \log|i_0| - \frac{\eta}{2.303\beta_c}$ (8)

L'inverse de la pente des droites, permet de déterminer la pente anodique $\beta_a$ et cathodique $\beta_c$. Lorsque la surtension ($\eta$) est nulle ($E = E_{eq}$), les deux intensités $i = i_0$, la droite de Tafel est extrapolée au potentiel d'équilibre, puis le courant d'échange $i_0$ est déterminé. Ainsi, pour une réaction rédox irréversible impliquant deux réactions basiques différentes, le potentiel de corrosion $E_{corr}$ correspond au potentiel d'équilibre $E_{eq}$. Ensuite, nous pouvons déterminer la valeur de la densité du courant de corrosion en extrapolant la droite de Tafel soit à l'anode, à la cathode ou dans les deux cas au potentiel de corrosion $E_{corr}$, comme le montre la figure II.8. En fait, la notation Tafel est généralement utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques $i_{corr}$, $\beta_a$ et $\beta_c$.

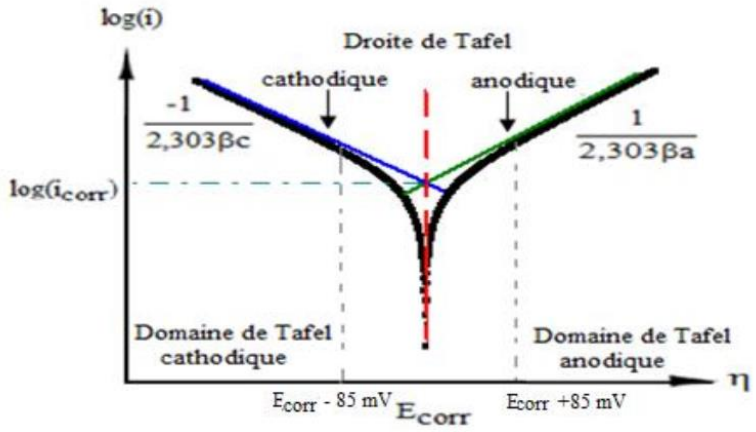



**Figure II.8**: Diagramme schématique de la courbe de polarisation (en coordonnées semi-logarithmiques) et des droites de Tafel.

Les mesures potentiodynamiques des échantillons d'acier doux ont été balayées de la direction cathodique à la direction anodique avec une vitesse de balayage de 1 mV/s et le potentiel de l'électrode se déplaçait de -650 à -250 mV. L'efficacité d'inhibition de la corrosion ($\eta$pp%) a été évaluée à partir des valeurs de densité de courant de corrosion à l'aide de l'équation suivante [27] :

$$\eta\,\% = \frac{i_{corr} - i'_{corr}}{i_{corr}} \qquad (9)$$

$i_{corr}$ Et $i'_{corr}$ sont les densités de courant de corrosion sans et avec l'extrait étudié, respectivement.

*II.8.2.2.2. Méthode transitoire: spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)*

La mesure d'impédance permet une analyse plus complète du mécanisme d'action. Les inhibiteurs sont comparés aux méthodes stationnaires, car ils peuvent être séparés les différentes étapes impliquées dans le processus de l'inhibition. Cependant, leur fonctionnement pose problème, parfois lié aux difficultés de trouver le meilleur circuit équivalent correspondant à l'interface électrode / électrolyte. En d'autres termes, expliquez Différents phénomènes s'y déroulant [28]. Par rapport à la technologie précédente, l'avantage de cette technologie est de distinguer les phénomènes de réaction par leurs temps de relaxation.

Ainsi, il est possible de distinguer les réactions partielles qui se produisent à l'interface électrode/électrolyte. Des processus électrochimiques rapides (transfert de charge) sont nécessaires dans le domaine de haute fréquence et lorsque la fréquence appliquée est réduite. L'effet des étapes apparaîtra plus lent, comme les phénomènes de migration de matière ou de diffusion en solution [4,5].

Les expériences de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) ont été réalisées dans une gamme de fréquences de 100 kHz à 100 mHz, avec 10 points par décennie dans le potentiel restant, après 30 minutes d'immersion dans l'acide et application d'une tension de 10 mV crête à crête. Les données d'impédance ont été analysées et équipées de la simulation Zview 2.80, circuit équivalent au logiciel. L'efficacité d'inhibition ($\eta_W$ %) a été évaluée à partir de Rp en utilisant l'équation 3 :

$$\eta_{imp}\% = \frac{R_p - R'_p}{R_p} * 100 \qquad (10)$$

où $R'_p$ et $R_p$ sont les résistances de polarisation de l'électrode en acier doux dans les solutions inhibées et non inhibées, respectivement.

Ainsi, Z (ω) peut être représenté par sa partie réelle et sa partie en coordonnées cartésiennes, nombre imaginaire (diagramme de Nyquist) ou module en coordonnées polaires Z et sa phase φ (diagramme de Bode).

Ces deux représentations différentes du même résultat ne sont pas concurrentes, mais plutôt complémentaires, montrant chacun un aspect spécifique du schéma d'impédance. La notation de Nyquist peut être représentée par différents "cercles et lignes droites", mais masque

généralement les résultats à haute fréquence. La représentation de Bode peut effectuer une visualisation complète du domaine fréquentiel sans évidence Identifiez certains phénomènes caractéristiques.

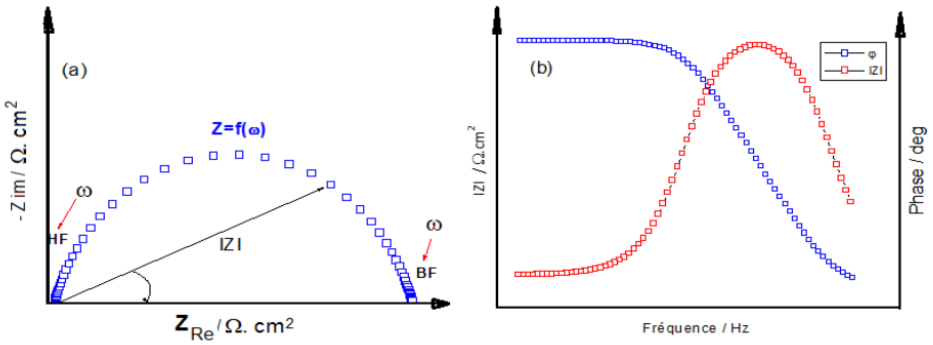



**Figure II.9:** Représentation des spectres d'impédance dans le plan de Nyquistet de Bode avec : HF: Haute Fréquence; BF: Basse Fréquence

L'analyse du spectre d'impédance peut être associée à chaque étape observée sur le diagramme de Nyquist et/ou de Bode représentant la grandeur physique, qui peut être réalisée en modélisant l'interface et en proposant un circuit équivalent.

*II.8.2.2.3. Exploitation des résultats par l'utilisation des circuits électriques équivalents (CEE).*

Les données obtenues lors de la mesure de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) sont généralement analysées en ajustant la mesure du circuit électrique du modèle de système électrochimique [20]. La plupart des composants électroniques utilisés dans ces circuits sont des composants simples, comme, les résistances, les condensateurs et les inductances. Cependant, il est souvent observé que le circuit équivalent ne contient que les éléments décrits, et par conséquent ne peut pas décrire correctement les données d'impédance expérimentales. Dans ce cas, l'élément de phase constante (CPE) est utilisé pour remplacer les condensateurs pour tenir compte de la non-idéalité des condensateurs (Tableau II.4).

**Tableau II.5:** Impédance des composantes électriques élémentaires.

| Composante électrique | Impédance | Unités |
|---|---|---|
| Résistance d'impédance R | R | [Ω cm$^2$] |
| Capacité | $1/jc\omega$ | [F.cm$^{-2}$] |
| Elément à phase constante CPE (Q) | $(1/Q)(j\omega)$-$\alpha$ | [Ω. s$^{\alpha}$. cm$^{-2}$] |
| Inductance L | jLω | [H. cm$^2$] |

Le circuit représentatif du système électrochimique étudié est appelé circuit équivalent. Pour rendre ce modèle utile, il faut que les circuits aient une réalité physique et peuvent être associés à des processus de base.

*II.8.2.2.4. Application de la* spectroscopie d'impédance électrochimique EIS *dans l'étude des inhibiteurs de corrosion*

L'évaluation des inhibiteurs de corrosion, recherche en spectre d'impédance, il permet de déterminer en particulier le mode d'action du produit d'une manière simple et s'adsorbant sur le substrat ou formant un film tridimensionnel à l'interface [29]. En ce qui concerne l'adsorption simple, le spectre d'impédance dans le plan de Nyquist est une boucle de condensateur plus ou moins plate, qui peut être déphasée par rapport à l'axe réel (figure II.11).

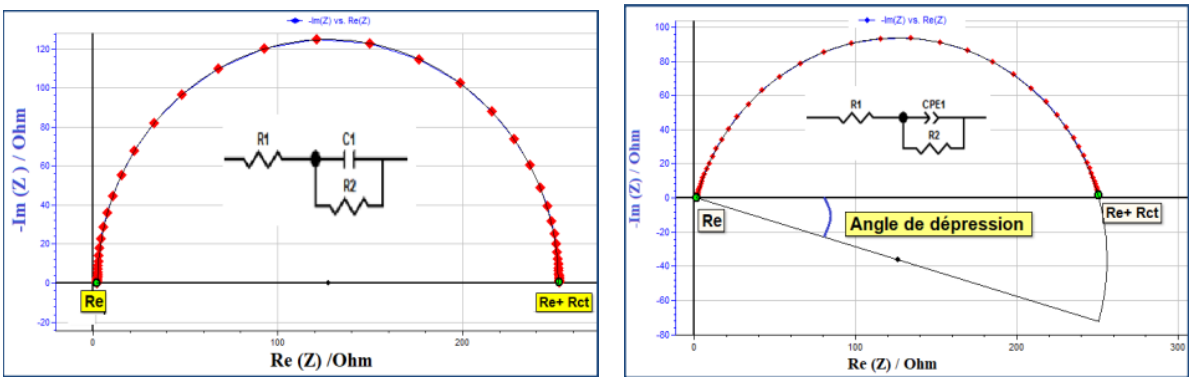



**Figure II.10:** Dépression α observée au niveau du repère du spectre: (a) Cas idéal, en théorie pour une surface uniformément accessible, (b) Spectre obtenu dans la plupart des cas pratiques.

## Références

[1] L.R. Snyder**.** *Journal Chromatographic Science* 16(6), 223-234, **1978**.

[2] D.P. Kisangau, H.V. Lyaruu, K.M. Hosea, C.C. Joseph**.** Use of traditional medicines in the management of hiv/aids opportunistic infections in tanzania: A case in the bukoba rural district. *Journal Ethnobiology Ethnomedicine* 3: 29-36, **2007**.

[3] K. N'Guessan, B. Kadja, G.N. Zirihi, D. Traoré, L. Aké-Assi**.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire) **.** *Sc. Nat.* 6, 1-15, **2009**.

[4] A. Banso, S. Adeyemo**.** Phytochemical screening and antimicrobial assessment of Abutilon mauritianum, Bacopa monnifera and Datura stramonium**.** *Biokemistri* 18, 39-44, **2006**.

[5] N. Ghedadba, L. Hambaba, A. Ayachi**.** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytpthérapie* 13, 118-129, **2015**.

[6] E.A. Iqbal, A. Linda, B.L. Lima**.** Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam**.** *J. King. Saud Univ. Sci.* 27, 224-232, **2015**.

[7] A. Marsoul, M. Ijjaali, F. Elhajjaji, M. Taleb, R. Salim, A. Boukir. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum* L): Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl. *Materials Today Proceeding* 27, 3193-3198. 2020.

[8] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178, 1999.

[9] H.B. Li H.B., K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F. Chen, Y. Jiang. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 102, 771-776, 2007.

[10] F. Brahmi, S. Haddad, K. Bouamara, D. Yalaoui-Guellal, E. Prost-Camus, J-P. Pais de Barros, M. Prost, A. G. Atanasov, K. Madani, L. Boulekbache-Makhlouf, G. Lizard. Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of Pistacia lentiscus L., Opuntia ficus indica (L.) mill. and Argania spinosa L. Skeels. *Ind. Crops Prod.* 151, 112456, 2020.

[11] M. Kasmi M., M. Aourach, M. El Boukari, S. Barrijal, H. Essalmani. Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au MarocEffectiveness of aqueous extracts of aromatic and medicinal plants against tomato grey mould in Morocco. *C. R. Biologies* 340, 386-393, **2017**.

[12] M.L. Price, L.G Butler**.** Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of Sorghum grain**.** *J. Agric. Food Chem.* 25, 1268–1273, **1977**.

[13] B. Sun, J.M. Ricardo-da-Silva, I. Spranger**.** Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins**.** *J. Agric. Food Chem*. 46(10), 4267−4274, **1998.**

[14] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar**.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 269: 337–341, **1999**.

[15] A. Mansouri, G. Embarek, E. Kokkalou, P. Kefalas, Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*) . *Food Chem*. 89, 411–420, 2005.
[16] C. Sanchez-Moreno. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 8, 121–137, **2002**.
[17] I.F.F. Benzie, I.J.J. Strain. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239 (1), 70-76, **1996**.
[18] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibnsouda. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal Pharmaceutical Analysis* 6 (2), 71-79, **2016**.

[19] A.I. Hussain, F. Anwar, S. Rasheed, P.S. Nigam, O. Janneh, S.D. Sarker**.** Composition and potential antibacterial, anticancer, antimalarial and antioxidant properties of the essential oils from two Origanum species growing in Pakistan**.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21, 943-952, **2011**.
[20] N. Gurker, M.F. Ebel, H. Ebel**.** Imaging XPS—A new technique, I—principles**.** *Surf. Interface Anal*. 5 (1), 13–19, **1983**.
[21] M.E. Orazem, B. Tribollet, *John Wiley & Sons, Inc, n.d.* **2008**.
[22] J. Tafel**.** Z. *Physik. Chem*. 50, 6661, **1905**.
[23] A.J. Bard, L.R. Faulkner, J. Leddy, C.G. Zoski**.** Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications**.** *Wiley New York*, **1980**.
[24] B. Zerga, A. Attayibat, M. Sfaira, M. Taleb, B. Hammouti, M.E. Touhami, S. Radi, Z. Rais**.** Effect of some tripodal bipyrazolic compounds on C38 steel corrosion in hydrochloric acid solution**.** *J. Appl. Electrochem.*, 40, 1575–1582, **2010**.
[25] B. Hammouti, A. Dafali, R. Touzani, M. Bouachrine**.** Inhibition of copper corrosion by bipyrazole compound in aerated 3% NaCl**.** *J. Saudi Chem. Soc*. 16, 413–418, **2012**.
[26] F. Abrigach, Y. Karzazi, R. Benabbes, M. El Youbi, M. Khoutoul, N. Taibi, N. Karzazi, N. Benchat, M. Bouakka, E. Saalaoui, R. Touzani**.** Synthesis, biological screening, POM, and 3D-QSAR analyses of some novel pyrazolic compounds**.** *Med. Chem. Res*. 26, 1784–1795, **2017**.
[27] N.K. Gupta, C. Verma, M.A. Quraishi, A.K. Mukherjee. Schiff's bases derived from L-lysine and aromatic aldehydes as green corrosion inhibitors for mild steel: Experimental and theoretical studies. *J. Mol. Liq.* 215, 47-57, 2016.
[28] A.A. Al-Sarawy, A.S. Fouda, W.A.S. El-Dein. Some thiazole derivatives as corrosion inhibitors for carbon steel in acidic medium. *Desalination* 229, 279–293, 2008.
[29] A. Döner, R. Solmaz, M. Özcan, G. Kardaş. Experimental and theoretical studies of thiazoles as corrosion inhibitors for mild steel in sulphuric acid solution. *Corros. Sci.*, 53, 2902–2913, 2011.

# *Chapitre 3 : Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes*

## *I. Extractions et Rendements obtenus*

L'extraction au solvant des six plantes qui font l'objet de notre étude (*Punica granatum* L. *Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa*, *Quercus ilex* et *Lawsonie inermis*) a été réalisée en utilisant les deux méthodes suivantes : macération et soxhlet, moyennant quatre types de solvants de différentes polarités (acétone : 5,1; acétate d'éthyle : 4,3; méthanol : 6,6; mélange ternaire de solvants : Hexane-AcoEt-MeOH (20 : 40 : 40%). Les conditions opératoires en termes de quantités en matières premières (20 g) et durée de réaction (48 h) ont été similaires dans les deux méthodes, exception faite au niveau de la température qui est ambiante dans la première (macération) et variable dans la seconde car elle dépend de la température d'ébullition de chaque type de solvant utilisé.

**Tableau III. 1.** Rendements des extraits de six plantes dans différents types de solvants (*Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonie inermis).*

| | **Macération** | | | | **Soxhlet** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange |
| *P. granatum* | 21 | 23 | **42** | 31 | 27 | 32 | **52** | 39 |
| *R. tinctoum* | 18 | 26 | **31** | 29 | 18 | 28 | **46** | 32 |
| *P. rhoeas* | 15 | 19 | **28** | 25 | 17 | 25 | **43** | 36 |
| *H. sabdariffa* | 16 | 19 | **31** | 26 | 16 | 23 | **41** | 36 |
| *Q. ilex* | 22 | 26 | **48** | 37 | 25 | 29 | **57** | 42 |
| *L. inermis* | 23 | 25 | **32** | 28 | 28 | 28 | **41** | 35 |

Mélange ternaire de solvant : Hexane-AcoEt-MeOH (20 : 40 : 40%)

D'après les résultats du tableau III. 1, les rendements obtenus par extraction au soxhlet sont prédominants par rapport à ceux obtenus par macération. Dans le cas de l'extraction par soxhlet, les rendements les plus élevés ont été attribués aux extraits méthanoliques suivis de ceux dérivant du mélange ternaire de solvants (Hexane-AcoEt-MeOH 20 : 40 : 40%), ainsi que ceux issus de l'acétate d'éthyle. Il est à noter que les extraits acétoniques représentent les rendements les plus faibles dans les deux types d'extraction. Cette différence pourrait être expliquée par l'effet de polarité des solvants utilisés.

Les deux méthodes d'extraction menées à des températures basse permettent d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou des modifications probables dues à une température d'extraction élevée dans d'autres méthodes d'extraction.

Il serait difficile de faire une étude comparative entre les résultats obtenus et ceux dérivant de la littérature, du fait que les rendements obtenus ne sont que relatifs et dépendent aussi des procédures d'extraction utilisées ainsi que les conditions dans lesquelles ont été effectuées.

*II. Screening phytochimique*

En se référant aux résultats du tableau III. 2, le criblage phytochimique a révélé que les extraits méthanoliques des six plantes étudiées présentent des quantités importantes en polyphénols par rapport aux autres extraits étudiés, suivis des flavonoïdes et des tanins, tandis que les stérols et les polyterpènes sont présents mais en faible quantité. Il est à noter l'absence des deux constituants saponosides et alcaloïdes dans le cas des deux plantes suivantes : *Punica g.* et *Hibiscus s.* Seules les deux plantes *Quercus i. et Lawsonia i.* ont montré la présence de saponosides, cependant *Rubia t.* et *Papaver r.* ont affiché la présence d'alcaloîdes. Ces derniers ont été récemment confirmés dans la partie fleur de cette dernière plante par Bakour et al. 2019 [1], en exploitant l'analyse par chromatographie HPLC.

## Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes

**Tableau III. 2.** Criblage phytochimique des extraits de six plantes dans différents solvants (*Punica granatum L., Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonie inermis)*

| | | **Macération** | | | | **Soxhlet** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange |
| *Punica granatum* | Polyphénols | + | + | ++ | ++ | + | + | +++ | ++ |
| | Flavonoïdes | + | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| | Saponosides | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tanins | - | - | ++ | ++ | - | - | +++ | ++ |
| *Rubia tinctorum* | Polyphénols | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flavonoïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Saponosides | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Tanins | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Papaver rhoeas* | Polyphénols | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flavonoïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Saponosides | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Tanins | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Hibiscus sabdareiffa* | Polyphénols | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Flavonoïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Saponosides | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tanins | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Quercus ilex* | Polyphénols | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | Flavonoïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Saponosides | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tanins | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| *Lawsonie inermis* | Polyphénols | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | Flavonoïdes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Saponosides | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Stérols et Polyterpenes | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Alcaloïdes | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Tanins | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : présence ; ++ : forte présence ; - : absence ;
Mélange ternaire de solvant : Hexane-AcoEt-MeOH (20 : 40 : 40%)

**Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes**

En général, la distribution des métabolites secondaires dans l'extrait au soxhlet a montré la présence de la majorité des composés chimiques examinés, exception faite sur certains saponosides et alcaloides, et dont les résultats obtenus sont en bon accord avec ceux rapportés par la littérature [1-11]. Il est à noter que la superficie récoltée et d'autres paramètres (tels que le pH et son abondance dans la matière organique) ont une influence très importante sur la présence de ces composés dans les plantes.

Ya'akov et al. (2019) [2], ont montré que les écorces de *Punica g.* sont riches en tanins condensés, proanthocyanidines et anthocyanines. Il est à signaler que l'extrait dépend de nombreux paramètres, comme, l'âge de la plante, sa partie utilisée, son cycle végétatif, ainsi que les conditions géographiques et climatiques [2.3]. Des résultats similaires ont été rapportés par Deshpande et al. (2019) [3], indiquant la présence des différents métabolites secondaires dans les extraits de *rubia tinctorum*. Par analogie avec les résultats de la littérature concernant *Papaver r.*, Akrout et al. (2010) [4] et Kumaravel et al. 2019 [5], ont confirmé la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, phénols et stérols, tout en mentionnant l'absence des tanins et saponosides (saponines) dans les extraits de ce type de plante [4.5]. Quant à l'*Hibiscus s.*, les résultats obtenus sont en accord avec des travaux antérieurs conduits par konan et al (2016) [6] et Kallo et al. (2018) [7]. Concernant le *Quercus i.*, Rtibi et al. 2017 [8] ainsi que Hidalgo et al. 2020 [9] ont confirmé les résultats obtenus. En accord avec Adedeji et al. (2017) [10] et Audu et al. (2018) [11] ils ont révélé que les feuilles de *Lawsonie inermis* contenaient des substances phytochimiques relativement très élevées. La littérature suggère que les plantes riches en tanins présentent une activité antidiarrhéique, anti-inflammatoire et antioxydante. Les saponines, les phénols et les flavonoïdes sont présents dans toutes les plantes, ces substances phytochimiques sont connues chez les plantes aromatiques et médicinales par leurs activités antifongiques, antiallergiques, antispasmodiques et anti-inflammatoires. Il a été constaté aussi que les alcaloïdes encouragent plus les l'activité des plantes médicinales, et la présence de cette substance phytochimique implique que ces plantes peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens.

*III. Analyse quantitative*

*III.1. Détermination de la teneur totale en polyphénols*

En raison de leur large diffusion et de leurs effets bénéfiques sur la santé par le biais de l'alimentation, les phénols et leurs dérivés ont récemment fait l'objet d'une attention particulière. Plus récemment, les consommateurs, les scientifiques et les entreprises de

fabrication d'aliments et de boissons sont également intéressés aux polyphénols en raison de leurs propriétés antioxydantes, leurs effets sur la santé, ainsi que leurs activités biologiques principalement antibactériennes. Ces composés présentent des effets bénéfiques et préviennent contre diverses maladies, comme celles associées au stress oxydatif [12-14].

Afin de déterminer quantitativement la teneur en polyphénols totaux dans les six différents extraits étudiés, nous avons fait appel à la méthode de dosage colorimétrique en utilisant le test de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1965 [15] and 1999 [16]) et dont l'absorption par UV a été mesurée à la longueur d'onde de 760 nm [17]). L'acide gallique a été choisi comme étalon pour la courbe d'étalonnage, et dont la longueur d'onde d'absorption en UV est de 272 nm [18-20], permettant ainsi de quantifier la présence des polyphénols totaux (Figure III.1, et Tableau III.3).

D'après la courbe d'étalonnage présentée dans la figure III.1, le coefficient de corélation ($r^2$ = 0,9126) présente une valeur significative de 91 % permettant de déterminer la teneur en phénol totaux dans les deux types d'extraits, et qui seront corrélés par la suite à l'activité antioxydante.

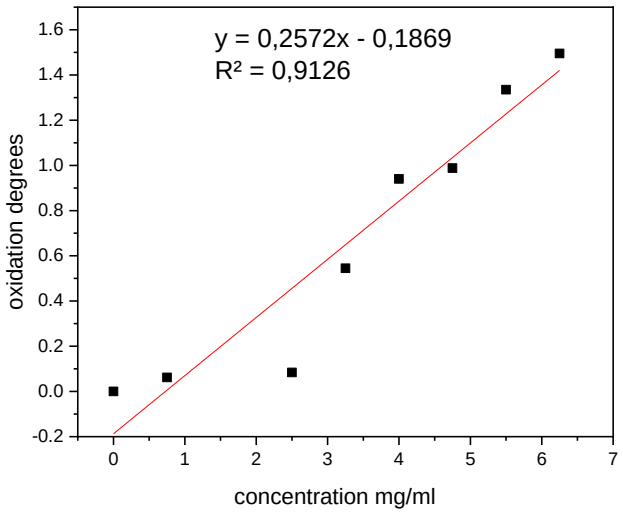



**Figure.III.1** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme étalon (272 nm).

Les teneurs en phénols totaux des six différents extraits étudiés sont regroupées dans le Tableau III. 3 suivant.

**Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes**

**Tableau III. 3.** Détermination des concentrations en composés phénoliques totaux dans les six extraits des plantes suivantes: *Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareifa, Quercus ilex et Lawsonie inermis*

| | **Macération** µg/mg GAE/mg poids sec | | | | **Soxhlet** µg/mg GAE/mg poids sec | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange |
| *Punica g.* | 46,16±0.59 | **72.5**±1.35 | **125**±3,04 | **84.21**±1.07 | 93.22±0.18 | 134±1.45 | **272,82**±3,05 | **186.24**±1.42 |
| *Rubia t.* | 26.5±1.28 | 45.4±2.45 | **89.5**±0.88 | 59.13 ±1.05 | 43.36±1.33 | 67.2± 0.47 | **129,4** ±1.78 | **82.6**±1.25 |
| *Papaver r.* | 36.61±2.05 | 45.7±0.75 | **95,4** ±2,42 | 61.03±1.24 | 68.25±1.08 | 81.02±3.12 | **165,4** ±3,84 | **93.5**±1.05 |
| *Hibiscus s.* | 23.76±1.22 | 35.13±0.33 | **67.8**±2.48 | 42.86±0.16 | 26.42±0.56 | 39.13±1.36 | **96.12**±2.01 | **56.82**±1.69 |
| *Quercus i.* | 63.39±3.04 | **104.87**±0.96 | **223.96**±6.31 | **137.06**±3.07 | 122.72±2.23 | 195.76±1.53 | **486.98**±5.19 | **289.21**±4.21 |
| *Lawsonie i.* | 47.22±2.5 | 67.08±2.04 | **86,17**±1.55 | 69.27±2.76 | 65,4±1.25 | 125,2±2.20 | **186,82**±1.2 | **131,91**±1.3 |

D'après les résultats consignés dans le tableau 3 on peut noter que les taux les plus prédominants ont été obtenus dans le cas des extraits au soxhlet, justifiant ainsi l'efficacité de cette méthode comparée à celle de macération.

En comparant les teneurs en polyphénols totaux des extraits des six plantes étudiées, il s'avère que les taux les plus élevés ont été enregistrés dans le cas de *Quercus i.*, utilisant le méthanol comme solvant d'extraction au cours des deux procédures : soxhlet (486.98 µg/mg GAE/mg poids sec) et macération (223.96 µg/mg GAE/mg poids sec), suivis de l'extrait au mélange ternaire de solvant (soxhlet : 289.21 µg/mg GAE/mg poids sec, macération : 137.06 µg/mg GAE/mg poids sec). Il vient par la suite l'extrait à l'acétate d'éthyle, et enfin les taux les plus faibles sont assignés aux extraits acétoniques.

Dans le cas de *Punica g.*, la teneur la plus élevée en polyphénols totaux correspond à l'extrait méthanolique utilisant le principe de soxhlet et dont la valeur est de 272,82 ±3,05 µg/mg GAE/mg poids sec au lieu de 125 ±3,04 µg/mg GAE/mg poids sec dans le cas de la macération. Nos résultats enregistrés ont été confrontés aux données de la littérature et s'avèrent meilleurs que ceux rapportés par Ardekani et al. 2011 [21] et Mansure et al. 2013 [22], représentant ainsi les valeurs suivantes de 98,24 et 226,56 µg GAE/mg, et 230,4 µg GAE /mg respectivement. Des résultats relativement similaires ont été rapportés récemment par Derakhshan et al. 2018 [23] atteignant la valeur de 276 ±12,69 µg GAE /mg.

**Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes**

En se référant aux travaux de Hasnaoui et al. 2014 [24] et Li et al. 2006 [25], la teneur totale en phénol contenue dans la pelure de grenade oscillait entre 205,07 et 261,70 mg GAE/g d'échantillon, et se trouvait légèrement inférieure à celle obtenue dans notre cas, Il est à signaler que d'autres auteurs (Gullon et al. 2015 [26]) ont quantifié une fraction beaucoup plus faible que celle trouvée par nos études (19,30 ± 0,34 μg GAE/mg). Cette différence pourrait être corrélée aussi bien à la méthode d'extraction utilisée qu'à la nature du solvant d'extraction, ainsi que d'autres facteurs.

Les composés phénoliques sont reconnus par leur grande solubilité dans les solvants organiques polaires [27-29]. Il en résulte que l'extrait méthanolique de *Quercus i.* présente la teneur la plus élevée en polyphénols.

Des valeurs relativement faibles en phénols totaux ont été raporté aux extraits de la garance (*Rubia t.*) sa valeur atteint (129,4 ±1.78 mg GAE/g en poids sec). Ce résultat est largement significatif par rapport à celui trouvé par Marhoume et al. (2019) [30] rapportaient des faibles teneurs dans le cas de l'extrait butanolique (0.011 ± 0,041 mg GAE/g en poids sec). De faibles quantités ont été aussi montrées par Rovčanin et al. (2015) [31] dans les deux types d'extraits (aqueux et éthanolique) ne dépassant pas les valeurs respectives de 14,7 mg EGA/g et 18,2 mg EGA/g. Des teneurs relativement importantes ont été rapportées récemment par Essaidi et al. 2017 [32] dans l'extrait méthanolique de la région 'Kebili' en Tunisie (38,84 ± 0,6 mg EGA/g), et par Oualcadi et al. (2020) [33], dans l'extrait au soxhlet de la région Marrakech au Maroc (52,97±3,20 mg GAE/g de la matière sèche).

Concernant l'extrait méthanolique de *Papaver r.*, La teneur en polyphénols totaux des extraits de fleurs varie entre 95,4 ±2,42 à 165,4 ±3,84 mg GAE/g d'extrait, et dont l'extrait au soxhlet représente la fraction majeure par rapport à celle issue de la macération (température ambiante). La différence obtenue pourrait être due à l'effet de température (T° d'ébullition du solvant méthanol) lors de l'extraction au soxhlet (Lovrić et al. 2017 [34]). Cette dernière procédure s'est montrée plus efficace avec une variabilité dans les constituants phénoliques extractibles qui seront corrélés aux essais d'activités antioxydantes [35].

En comparant nos résultats en composés phénoliques totaux dans les six extraits des plantes avec les données antérieures de la littérature, les teneurs étaient plus élevées que celles obtenues dans l'extrait méthanolique de feuilles basales espagnoles (25°C, 1h) avec 25,9 mg GAE/g [36], ainsi que dans l'extrait hydro-éthanolique marocain de macération de pollen

séché (une semaine), montrant la valeur de 34,8 mg/g [1]. Dans le cas de notre extrait de macération (feuilles de *Papaver r.*), des résultats similaires ont été rapportés par Isbilir et al 2012 [35] de maïs en utilisant un bain d'eau agité, et dont les valeurs sont de 79 mg GAE/g (acétone) et de 100 mg GAE/g (éthanol ou eau). Comparées à la procédure de soxhlet, les valeurs trouvées restaient beaucoup plus faibles.

De faibles différences ont été mises en évidence dans le cas de notre extrait au soxhlet (**165,4** ±3,84GAE/100 g) comparé à l'extrait méthanolique aqueux des feuilles fraîches italiennes (134,8 mg GAE/100 g) utilisant la méthode de centrifugation (4°C, 20 min) [37]. En outre, de faibles valeurs d'extraits de pétales de fleurs séchées de *Papaver r.* ont été enregistrées dans le cas des infusions aqueuses (25 à 90 °C) de Pologne allant de 135,9 à 137,2 ppm (Katarzyna et al. 2020 [38]), suivies par les extraits turcs utilisant trois méthodes d'extraction suivantes (sous vide, par micro-ondes et par des méthodes conventionnelles) [39] indiquant des valeurs de 1022,8 ; 936,4 et 925,8 mg GAE/kg, respectivement. Cependant, dans le cas des extraits de pétales de fleurs fraîches de Serbie, les valeurs exprimées ne dépassent pas la valeur de 12,4 mg d'EAG/g lors de l'utilisation de la procédure ultrasons en milieu aqueux-méthanolique [40].

Les quantités les plus faibles ont été montrées dans le cas des extraits d'*Hibiscus s.*, la teneur en phénols totaux contenue dans les différents extraits d'*Hibiscus s.* oscillait entre 23.76±1.22 et 96.12±2.01 mg/g. La fraction la plus élevée a été assignée à l'extrait méthanolique, cependant la plus faible correspond à l'extrait acétonique. La teneur totale en phénols des fleurs d'*Hibiscus* de Chine a été rapportée par Hashemi et al. (2019) [41] qui ont trouvé des résultats de l'ordre de 39.97±2.74 mg/g GAE. Ces données obtenues restent toujours supérieures aux valeurs indiquées par Jamini et al. 2019 [42] qui varient entre 0.009+0.06 et 0.404+1.08 mg/g GAE. Ces fluctuations en teneurs peuvent être dues probablement à la variété génétique de la plante, aux conditions géographiques et climatiques, au stade et saison de récolte (polymorphisme), et dépendent aussi du calibre des fruits utilisés ainsi que d'autres facteurs...

Les valeurs les plus importantes en phénols totaux ont été révélées (notées) dans le cas des extraits de *Quercus i.*, Le contenu phénolique total des échantillons de *Quercus i.* a montré de grandes variations, entre 63.39±3.04 et 486.98±5.19 mg d'EAG/g d'extrait (tableau 1). D'après les résultats, les extraits contenaient un mélange de composés phénoliques à différents niveaux dans l'ordre suivant : méthanol > mélange > acétate d'éthyle > acétone. La fraction

de l'extrait méthanolique avait une teneur totale en composés phénoliques remarquablement élevée (486.98±5.19 mg d'EAG/g). Il existe très peu d'études dans le La littérature qui s'est concentrée sur le contenu phénolique des racines de *Quercus i.* Vinha et al. (2016) [43], ont montré que le contenu phénolique total de *Quercus i.* s'échelonnait de 18 à 32 mg d'EAG/g d'extrait, Meziti et al (2019) [44], ont montré que L'extrait de *Quercus i.* à un taux de phénol élevé (490,81 ± 29,62 µg d'EAG/mg d'extrait sec), ce qui étaient similaire que les résultats actuels. Ces différences pourraient être liées à la divergence des répartitions du composé phénolique entre les une autre partie de la plante ou un climat différent [45,46].

Quant aux extraits méthanoliques de Henné (*Lawsonie i.*), Les résultats (tableau 1) ont montré les extraits par soxhlet ont les teneurs les plus élevées et que l'extrait méthanolique de Henné (*Lawsonie i.*) présentait une teneur de phénols plus élevé que les extraits de mélange, acétate d'éthyle et d'acétone qui sont d'environ 186,82±1.2 mg GAE/g pour l'extrait méthanolique, 131,91±1.3 mg GAE/g pour l'extrait de mélange, 125,2±2.2 mg GAE/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 65,4±1.25mg GAE/g pour l'extrait d'acétone. Les résultats obtenus restent significatifs par rapport à ceux trouvés par Singh et al. 2015 et Cherbi et al. 2016 [47,48].

La variabilité des teneurs en polyphénols peut être fortement influencée par l'origine botanique, la situation géographique, le génotype du cultivar, l'effet climatique, et peut être liée à de nombreux facteurs expérimentaux, tels que la partie de la plante utilisée, la méthodologie de préparation des extraits, la polarité du solvant utilisé, ainsi que le temps alloué pour la procédure d'extraction.

Les phénols jouent un rôle essentiel dans la détérioration des radicaux libres dans l'organisme et protègent contre la dégradation oxydative, leur absence dans le corps humain conduit au phénomène de stress oxydatif (Lakkab et al. 2019 [49]). Ce dernier est impliqué dans le développement de maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives de certains cancers et d'autres maladies chroniques, telles que le diabète et l'ostéoporose.

La méthode de soxhlet a montré une récupération plus élevée des teneurs totales en polyphénols que la procédure de macération, considérée comme la méthode de choix dans notre étude. Une teneur phénolique plus élevée dans l'extrait méthanolique est responsable de la bioactivité, par conséquent, on s'attend à ce que cet extrait présente de bons résultats en matière d'activités antioxydantes et antibactériennes.

*III.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes*

Les flavonoïdes sont l'un des plus importants groupes de polyphénols totaux, considérés comme des pigments responsables de la coloration des plantes, des fruits. Certains flavonoïdes tels que le kaempférol, la quercétine, la lutéoline sont présents dans la majorité des aliments (miel, caroube (*Ceratonia siliqua)*, huile d'argan...).

La détermination des teneurs en flavonoïdes dans les extraits a été basée sur la méthode colorimétrique mesurée à 510 nm, en utilisant le réactif trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Ce type de test a été utilisé pour quantifier la présence de flavonoïdes qui absorbent généralement entre 200-300 nm et entre 300-400 nm. Ainsi, la quercitine (famille des flavon-3-ol) a été choisie comme étalon pour la courbe d'étalonnage (flavonoîdes), absorbant aux deux longueurs d'onde suivantes : 256 et 372 nm [17], (figure III. 2).

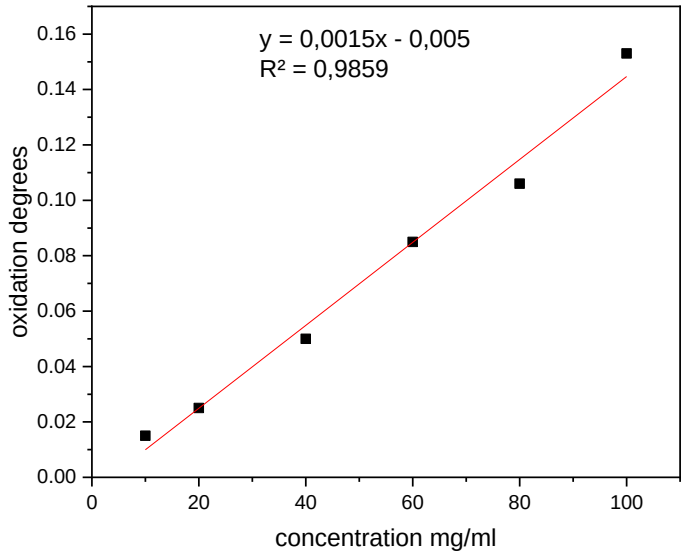



**Figure.III.2** : Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée comme étalon (256 et 372 nm).

**Tableau III. 4.** Concentrations en flavonoïdes dans les six extraits de plantes étudiées (*Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareifa, Quercus ilex et Lawsonie inermis)*

| | *Macération* µg QE/mg de poids sec | | | | *Soxhlet* µg QE/mg de poids sec | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange | Acétone | Ac-OEt | MeOH | Mélange |
| *Punica.G* | 5.89±1,25 | 9.47±0,95 | 16±0,34 | 12.48±0,74 | 10.45±0.27 | 19.28±1,35 | **38,26**±1,78 | **26.34**±1,05 |
| *Rubia.T* | 9.38±0.46 | 14.84±1.12 | 27.35±2.63 | 18.98±1.48 | 15.86±1.57 | 30.14±0.58 | **63.32**±1,41 | **41.57**±2.14 |
| *Papaver.R* | 3.65±0.74 | 4.85±0.89 | 8,67±0,024 | 6.52±0.77 | 7.57±0.94 | 10.57±1.18 | **21,72**±2,05 | **14.38**±1.61 |
| *Hibiscus.S* | 27.57±1.39 | 31.49±0.27 | 48.91±1.21 | 42.63±0.88 | 48.63±1.89 | 67.09±2.94 | **135** ±1,72 | **92.46**±2.47 |
| *Quercus. I* | 2.13±0.17 | 2.52±0.33 | 4.76±0.56 | 4.21±0.29 | 3,48± 0.12 | 5.23 ± 1.45 | **15,36**±1.07 | **9.75**± 0.78 |
| *Lawsonie.I* | 4.15±0.05 | 7.57±0.14 | 14,04±1,12 | 11,25±0,47 | 7,14±0,54 | 13,45±0,74 | 32,14±1,05 | 24,15±1,45 |

L'augmentation de la teneur en flavonoïdes a été corrélée à l'extrait de soxhlet avec une valeur de 38,26 ±1,78 µg/mg QE/mg de poids sec au lieu de 16 ± 0,34 µg/mg QE/mg de poids sec correspondant à l'extrait de macération (figure 4). Les données expérimentales relatives à l'extrait soxhlet sont supérieures à celles de la macération avec un coefficient de 2,4, justifiant ainsi son efficacité, tout en montrant que c'est une procédure d'extraction de choix.

L'étude menée par Orak et al. 2012 [50] sur quatre variétés de Turquie montre une variation entre 14,37 et 20,52 µg QE/mg de poids sec. Selon Elfalleh et al. 2012 [51], la concentration en flavonoïdes dans les extraits d'écorce de grenade tunisienne était de 21,03 µg RE/mg. Concernant les extraits serbes rapportés par Stojanović et al. 2017 [52], la valeur est de 5,83 mg CE/g. De plus, l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade cultivé en Afrique du Sud contient une concentration allant de 97,8 à 121,1 µg équivalent catéchine/mg, selon Hussein et al. 2019 [53]. Récemment, Derakhshan et al. 2018 [23] ont rapporté que les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques provenant des variétés d'écorce de grenade de Natanz, Shahreza et Doorak, représentent des concentrations de 36, 45 et 54 µg/mg, respectivement.

L'extrait méthanolique de *rubia tinctorum* par soxhlet a montré la teneur en flavonoïdes la plus élevée par rapport aux autres extraits de (63.32±1,41 mg QE/ g de la matière sèche), était significativement plus élevée que celle de Rovčanin et al. (2015) [31] dans deux extraits d'éthanol et aqueux, avec des valeurs de 1,1 et 1,3 mg EQ / g dm, respectivement. Pour l'extrait de méthanol de garance Rubia étudié par Essaidi et al. (2015), la valeur était de 13,41 ± 0,34 mg EQ.g-1, ce qui est le même résultat que celui trouvé par Marhoum et al. (2019)

[30], 0,7 ± 0,0055 mg CAE / 100 g MS et Oualcadi et al. (2020) [33] 52,92±2,20 mg RE/g de la matière sèche.

En ce qui concerne la courbe d'étalonnage présentée à la figure III. 3, la droite de régression présente un coefficient de corélation significatif de 98,5 % ($R^2$ = 0,9859), ce qui nous permet de quantifier la fraction de flavonoïdes dans les deux extraits, qui sont corrélés à l'activité antioxydante. Les proportions totales de flavonoïdes quantifiées dans les extraits de fleurs de Papaver rhoeas sont de 8,67 ±0,024 mg QE/g d'extrait (macération) et de 21,72 ±2,05 mg QE/g d'extrait (soxhlet). La proportion de flavonoïdes est inférieure à celle des composés phénoliques obtenus, et leur contribution à la capacité antioxydante sera donc moins prépondérante que celle de la fraction comparée. De la même manière que pour la fraction totale des polyphénols, une variation significative des teneurs a été démontrée entre les deux procédés d'extraction utilisés. Cette différence est due à la méthode d'extraction utilisée (soxhlet) et à l'effet de la température correspondante, considérée comme un paramètre important (Lovrić et al. 2017 [34]).

En comparant nos résultats sur la teneur totale en flavonoïdes à des études antérieures de la littérature, par exemple l'extrait méthanolique de feuilles basales espagnoles (25°C, 1h) a montré la valeur de 12 mg cathequin equiv./g (Morales et al. 2014 [36]), tandis que celle de la macération aqueuse-éthanolique de pollen marocain (une semaine) a révélé la valeur de 13 mg QE/g (Bakour et al. 2019 [1]). Ces deux valeurs restent légèrement supérieures par rapport à nos résultats de macération (8,7 mg QE/g). Néanmoins, des résultats presque similaires ont été montrés dans le cas des pétales frais de P. rhoeas serbe dans des extraits éthanoliques et méthanoliques allant de 9,5 à 9,7 mg QE/g, avec une légère augmentation dans le cas de l'extrait aqueux atteignant la valeur de 11,5 QE/g (Kostic et al. 2010) [40]. Cependant, l'ensemble des valeurs rapportées n'atteint pas celle obtenue dans notre étude par la méthode d'extraction au soxhlet (21,7 mg QE/g), exception faite sur les extraits méthanoliques de feuilles fraîches italiennes, qui ont présenté une différence notable révélée par la valeur la plus élevée de 119,0 ± 1,4 mg CE/g (Montefusco et al. 2015) [37].

Les teneurs totales en flavonoïdes (TFC) des feuilles de roselle (*Hibiscus sabdareiffa*) varient entre 27.57±1.39 et 135 ±1,72 mg QE/g de la matière sèche. Ces résultats restent supérieurs à ceux trouvés par Nunekpeku et al. en 2018 [54] qui ont enregistré les valeurs de 49,79 ± 0,48 µg/g et 10,04 ± 0,31 µg/g dans le cas de deux variétés d'*Hibiscus* de Ghana. Ces valeurs restent plus faibles que celles déterminées par Formagio et al. (2015) [55] dans des

feuilles d'*Hibiscus* de Brésil (140,29 ± 3,14 à 148 ± 2,42 mg/g), probablement due au type de culture utilisée. et qui est enrichie par des substrats organiques, ou due simplement à un facteur d'attribut génétique inhérent à ces types de variétés.

Dans le cas de *Quercus i*., les teneurs totales en flavonoïdes des extraits au soxhlet sont plus élevées que celles obtenues par macération et dont les valeurs des différents extraits aux solvants sont : acétone (3,48± 0.12 mg QE/ g MS) < acétate d'éthyle (5.23 ± 1.45 mg QE/ g MS) < mélange (9.75± 0.78 mg QE/ g MS) < méthanol (15,36± 1.07 mg QE/ g MS). La teneur en flavonoïdes totaux de *Quercus i.* était la plus élevée dans l'extrait méthanolique par soxhlet (figure 2). Un taux plus faible en flavonoïdes (0.203 ± 0.32 mg QE/g MS) a été révélé par Ouchemoukh et al. 2017 [56] dans la région d'Aichoune en Algérie. Les résultats de la présente étude ont montré que la teneur en flavonoïdes était significativement plus élevée que celle trouvée par Meziti et al. 2019 dans la région de Sétif en Algérie (3,11 ± 0,04 µg QE/mg). Ce résultat pourrait être dû à la variabilité de différentes classes en polyphénols qui sont présentes dans les extraits de plantes.

Cette variabilité de teneurs en flavonoïdes pourrait être due aux : génotype de la plante, situation géographique, conditions climatiques, fertilité du sol, conditions post-récolte (Prohens et al. 2005) [57] choix de la partie de la plante utilisée, procédure d'extraction, polarité du solvant utilisé, ainsi qu'à la durée de la méthode d'extraction utilisée.

Les deux extraits ont montré leur richesse en flavonoïdes et en polyphénols, avec une prédominance majeure des constituants reliables à l'extrait de soxhlet. On peut conclure que la procédure d'extraction au soxhlet reste la méthode la plus appropriée dans notre étude comparée à celle de macération.

## Références

[1] M. Bakour, M. da Graça Campos, H. Imtara, B. Lyoussi, Teneur en antioxydants et identification des composés phénoliques / flavonoïdes dans le pollen de quatorze plantes utilisant HPLC-DAD, J.Apic. Res., 59, 35-41**, 2020**.
[2] I. Bar-Ya'akov, L. Tian, R. Amir, D. Holland, Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit, frontiers in plant science, 10, 320, 2019.
[3] P. Deshpande, N. Gogia, A. Singh, Exploring the efficacy of natural products in alleviating Alzheimer's disease, Neural Regen Res. 14,1321–1329, 2019.
[4] A. Akrout, H. El Jani, T. Zammouri, H.Mighri, M. Neffati, Phytochemical Screening and Mineral Contents of Annual Plants Growing Wild in the Southern of Tunisia, journal of phytology, 2 (1), 2010.
[5] S. Kumaravel, P. Muthukumaran, N. Thomas , Phytochemical, GC-MS and FT-IR Analysi of Papaver somniferum L J. Innov. Pahrma., 7(1):1-8n, 2019.
[6] M.K. Konan, E.N. Koffi1, I. Cisse A.A. Adima, Y.A. Bekro, Phytochemical, nutritional and antioxidant capacity of five Ivorian edible leaves aqueous extracts, Journal of Applied Pharmaceutical Science 6 (09), 082-086, 2016.
[7] M.S. Kallo, R. Adamou, J. Sawadogo, A.A. Mahamane, I.M. Maarouhi, K. Ikhiri, Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *12*(2), 867-883, 2018.
[8] K. Rtibi, I. Hammami, S. Selmi, D. Grami, H. Sebai, A. Mohamed, L. Marzouki, Phytochemical properties and pharmacological effects of Quercus ilex L. aqueous extract on gastrointestinal physiological parameters in vitro and in vivo. Biomed. Pharmacother. 94, 787–793, 2017.
[9] C. López-Hidalgo, M. Trigueros, M. Menéndez, J.V. Jorrin-Novo, Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches, food chemistry, 838, 127803, 2021.
[10] G.A. Adedeji, O.Y. Ogunsanwo, T.O. Elufioye, Quantifications of phytochemicals and biocide actions of ***Lawsonia inermis*** linn. Extracts against wood termites and fungi, International Biodeterioration & Biodegradation, 116, 155-162, **2017.**
[11] B.S. Audu, S Yusuf, N.O.A. Malachy, O Jamiu, J.W. Wad, Phytochemical, proximate and sedative properties of henna (Lawsonia inermis) on the opercula ventilation rate of Tilapia zilli fingerlings, africain journal online, 13(4), **2018**.
[12] S. Gorinstein, Z. Zachwieja, M. Folta, H. Barton, J. Piotrowicz, M. Zemser, M. Weisz, S. Trakhtenberg, O. Màrtín-Belloso,Comparative Contents of Dietary Fiber, Total Phenolics, and Minerals in Persimmons and Apples . *Agric. Food Chem.* 49 (2) 952–957, **2001**.
[13] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5) 727–747, **2004**.
[14] S. Ye, J. Wu, Palladium-Catalyzed Carbonylative Reaction of 1-(2,2-Dibromovinyl)-2-alkenylbenzene and Carbon Monoxide, with Phenol or Alcohol, *Org. Lett*, 13 , 22 , 5980–5983, **2011**.

[15] V. L. Singleton, J. A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents, Am J Enol Vitic. 16, 144-158, **1965**.
[16] V.L. Singleton, R.Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology,* 299, 152-178, **1999**.
[17] A. Marsoul, M. Ijjaali, F. Elhajjaji, M. Taleb, R. Salim, A. Boukir, Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (Punica granatum L): Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl, J. Matpr, 27, 3193–3198,2020 .
[18] A. Marsoul, M. Ijjaali, I. Oumous, B. Bennani, A. Boukir. Determination of polyphenol contents in *Papaver rhoeas* L. flowers extracts (soxhlet, maceration), antioxidant and antibacterial evaluation. J. Matpr 31 () S183-S189, 2020.
[19] H.B. Li, K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F. Chen, Y. Jiang. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 102 () 771-776, 2007.
[20] F. Brahmi, S. Haddad, K. Bouamara, D. Yalaoui-Guellal, E. Prost-Camus, J-P. Pais de Barros, M. Prost, A. G. Atanasov, K. Madani, L. Boulekbache-Makhlouf, G. Lizard. Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of Pistacia lentiscus L., Opuntia ficus indica (L.) mill. and Argania spinosa L. Skeels. *Ind. Crops Prod.* 151, 112456**, 2020** .
[21] M. R. Shams Ardekani, M. Hajimahmoodi, M. R. Oveisi, N. Sadeghi, B. Jannat, A. M. Ranjbar, N. Gholam, & T. Moridi, (). Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (Punica granatum L.) Cultivars. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, *10*(3), 519–524, **2011**.
[22] E. Mansour, A.B. Khaled, B. Lachiheb, M. Abid, K. Bachar, A. Ferchichi, Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate. J. Agr. Sci. Tech. 15, 1393-1403, **2013**.
[23] Z. Derakhshan, M. Ferrante, M. Tadi, F. Ansari, A. Heydari, M.S. Hosseini, Elham K. Sadrabad, Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds, Food and Chemical Toxicology, 114, 108-111, **2018**.
[24] N. Hasnaoui, B. Wathelet, A. Jiménez-Araujo, Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties, Food Chemistry, 160, 196-203, **2014**.
[25] Z. Li, K. Wang, J. Zheng, F. Shin, G. Cheung, T. Chan, L. Zhu, F. Zhou, Interactions of the active components of *Punica granatum* (pomegranate) with the essential renal and hepatic human Solute Carrier transporters, Pharmaceutical Biology 52(12) 1510-1517, 2014
[26] B. Gullon, M.E. Pintado, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez, M. Viuda-Martos, *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability, Journal of Functional Foods, 19, 617-628, 2015.
[27] N.M. Sachindra, M.K.W.A. Airanthi, Hosokawa, M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. J Food Sci Technol 47, 94–99 , 2010.

[28] S. V. Chanda, K. V. Nagani, Antioxidant Capacity of Manilkara zapota L. Leaves Extracts Evaluated by Four in vitro Methods , Nature and Science, 8(10), 60-66, 2010.
[29] T. Kalaivani, L. Mathew, Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. *ex* Delile, an Indian medicinal tree, Food and Chemical Toxicology, 48 (1), 298-305, 2010.
[30] F. Marhoumea, M. Ait Laaradiab, Y. Zaidc, J. Laadraouib, S. Oufquirb, R. Aboufatimad, A. Chaitb, A. Bagria, Anti-aggregant effect of butanolic extract of Rubia tinctorum L on platelets in vitro and ex vivo, J. Ethnopharmacol., 241,111971, 2019.
[31] B.R. Rovčanin, T.Ćebović, D. Stešević, D. Kekić, M. Ristić, Antibacterial effect of *Herniaria hirsuta*, *Prunus avium*, *Rubia tinctorum* AND *Sempervivum tectorum* plant extracts on multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*, Biosci. J., Uberlândia, 31, 1852-1861, 2015 .
[32] I. Essaidi, A. Snoussi, H. Ben Haj Koubaier, H. Casabianca, N. Bouzouita, "Effect of acid hydrolysis on alizarin content, antioxidant and antimicrobial activities of Rubia tinctorum extracts", Pigment & Resin Technology, 46 , 379-384, 2017.
[33] Y. Oualcadi, A. Aityoub, F. Berrekhis, Investigation of different antioxidant capacity measurements suitable for bioactive compounds applied to medicinal plants, Journal of Food Measurement and Characterization, 2020. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00613-y
[34] V. Lovrić, P. Putnik, D. Bursać Kovačević, M. Jukić i V. Dragović-Uzelac, "Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers", Food Technology and Biotechnology, vol.55, br. 2, str. 243-250, 2017.
[35] S.S. Isbilir, A. Sagiroglu. An Assessment of In Vitro Antioxidant Activities of Different Extracts from Papaver rhoeas L. Leaves, International Journal of Food Properties, 15:6, 1300-1308, 2012 .
[36] P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, A.M. Carvalho, M.C. Sa´nchez-Mata, M. Camara, V. Ferna´ndez-Ruiz, M. Pardo-de-Santayana, J. Tardıo, Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. LWT Food Sci Technol 55:389–396, 2014.
[37] A. Montefusco, G. Semitaio, P.P. Marrese, A. Iurlaro, M. De Caroli, G. Piro, G. Dalessandro, M.S. Lenucci, "Antioxidants in Varieties of Chicory (Cichorium intybus L.) and Wild Poppy (Papaver rhoeas L.) of Southern Italy", Journal of Chemistry, 2015, 8, 2015.
[38] J. Katarzyna, J. Karolina, K. Patrycja, B. Mateusz, G. Izabela, “Mineral Composition and Antioxidant Potential in the Common Poppy (Papaver rhoeas L.) Petal Infusions”. *Biol. Trace Elem. Res.*. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02134-7,2020.
[39] E. Lutfiye, Effects of concentration methods on bioactivity and color properties of poppy (*Papaver rhoeas* L.) sorbet, a traditional Turkish beverage, LWT - Food Sc. Technol. 56 , 40-48,2014.
[40] D.A. Kostic, S.S. Mitic, M.N. Mitic, A.R. Zarubica, J.M. Velickovic, A.S. Dordevic, S.S. Randelovic, “Content of trace metals in medicinal plants and their extracts”. *J. Med. Plant Res.* 4, 1727-1732, 2010.

[41] A. Hashemi, A. Shahani, Effects of salt stress on the morphological characteristics, total phenol and total anthocyanin contents of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). Plant Physiol. Rep. 24, 210–214 , 2019.

[42] T. S. Jamini, A. K. M. A. Islam, M. Mohi-ud-Din & M. M. H. Saikat, Phytochemical composition of calyx extract of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) genotypes. J Food Tech Food Chem, 2(102), 2, 2019.

[43] A. F. Vinha, J. C. Barreira, A. S. Costa, & M. B. P. Oliveira. A new age for Quercus spp. fruits: review on nutritional and phytochemical composition and related biological activities of acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(6), 947-981, 2016.

[44] H. Meziti, H. Bouriche, S. Kada, I. Demirtas, M. Kizil, A. Senator, "Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex L. and Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7 (4), 260-272, 2019.

[45] S. Khadem, and R.J. Marles, Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. Molecules 15, 7985–8005, 2010.

[46] MT. Tolić, IP, Krbavčić, P, Vujević, B , Milinović, IL, Jurčević, N, Vahčić. Identification of phenolic compound by HPLC-TOF MS. Pol J Food Nutr Sci 67: 67–74, 2017.

[47] S. Singh, N. Verma, R. Karwasra, P. Kalra, R. Kumar, Y.K. Gupta, Safety and efficacy of hydroalcoholic extract from Lawsonia inermis leaves on lipid profile in alloxan-induced diabetic rats. Ayu 36, 107–112, 2015.

[48] R. Cherbi, C. Hamia, N. Gourine, I. Bombarda, M. Saïdi, & M. Yousfi, Lipid Classes, Fatty Acids, Tocopherols Compositions and Antioxidant Activity of Lawsonia alba Seed Oils Growing in Algeria. *Current Nutrition & Food Science*, *13*(2), 121-130, 2017.

[49] I. Lakkab, H. El Hajaji, N. Lachkar, R. Lefter, A. Ciobica, B. El Bali, & M. Lachkar. Ceratonia siliqua L. seed peels: Phytochemical profile, antioxidant activity, and effect on mood disorders. *Journal of Functional Foods*, *54*, 457-465, 2019.

[50] H. H. Orak, H. Yagar, & S. S Isbilir. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (Punica granatum L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, *21*(2), 373-387, 2012.

[51] W. Elfalleh, H. Hannachi, A. Guetat, N. Tlili, F. Guasmi, A. Ferchichi, & M. Ying. Storage protein and amino acid contents of Tunisian and Chinese pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. *Genetic resources and crop evolution*, *59*(6), 999-1014, 2012.

[52] I. Stojanović, K. Šavikin, N. Đedović, J. Živković, T. Saksida, M. Momčilović,... & N. Menković. Pomegranate peel extract ameliorates autoimmunity in animal models of multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, *35*, 522-530, 2017.

[53] Z. Hussein, O. A. Fawole, & , U. L Opara. Bruise damage susceptibility of pomegranates (Punica granatum, L.) and impact on fruit physiological response during short term storage. *Scientia Horticulturae*, *246*, 664-674, 2019.

[54] W. Nunekpeku, H. M. Amoatey, S. Agbenyegah, M. Owusu-Ansah, V. Oduro, K. E. Danso,... & E. Achoribo. Screening for total antioxidant activity, flavonoids and phenolics

variability in forty-five accessions of roselle (Hibiscus sabdariffa L.). *African Journal of Biotechnology*, *17*(22), 694-699, 2018.

[55] A. S. N. Formagio, D. D. Ramos, M. C. Vieira, S. R. Ramalho, M. M. Silva, N. A. H. Zárate,... & J. E. Carvalho. Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology*, *75*(1), 69-76, 2015.

[56] N. Amessis-Ouchemoukh, S. Ouchemoukh, N. Meziant, Y. Idiri, D. Hernanz, C. M. Stinco,... & J. Luis. Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of Ficus carica L., Ceratonia siliqua L. and Quercus ilex L. extracts. *Industrial Crops and Products*, *95*, 6-17, 2017.

[57] J. Prohens, P. Gramazio, M. Plazas, H. Dempewolf, B. Kilian, M. J. Díez,... & S. Knapp. Introgressiomics: a new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica*, *213*(7), 158, 2017.

# Chapitre 4 : caractérisation spectrophotometrique UV-vis et spectrométrie IRTF

## *I. Caractérisation structurale par spectrophotométrie UV-vis des chromophores contenus dans les extraits de plantes (macération, soxhlet)*

La spectroscopie UV-visible est un outil analytique très important pour identifier les spectres d'absorption caractéristiques des extraits des plantes. Les spectres UV-vis des différents extraits de plantes (macération, soxhlet) ont été analysés par spectrophotomètre UV-visible et sont illustrés sur les figures ci-dessous. Les plantes ciblées étaient : écorce de grenade (*Punica g.*), racines de la garance (*Rubia t.*), fleurs de coquelicot (*Papavers r.*), roses d'Hibiscus s. (*Hibiscus s.*), écorce de chêne vert (*Quercus i.*) et feuilles de Henné (*Lawsonia i.*).

Afin de caractériser correctement les attributions des spectres UV-vis des différents extraits étudiés, les données antérieures et exhaustives de la littérature (UV-visible) ont été explorées et nous ont été d'un grand secours [1-39]. Les résultats trouvés sont regroupés dans le tableau IV.2.

### *I.1. Punica granatum*

Le profil des deux spectres UV (Fig. IV. 1) relatif aux deux extraits de *Punica g.* (soxhlet, macération), présente deux régions spectrales. La première est située entre 240-300 nm (transition $\pi -> \pi^*$) est de forte absorption (ε élevé) avec un maxima absolu à 260 nm (extrait de soxhlet) et un maxima relatif à 254 nm (extrait de macération). Quant à la seconde, elle présente une absorption entre 340-400 nm (transition $n -> \pi^*$), avec un minima relatif à 378 nm (extrait de soxhlet) et minima absolu à 360 nm (extrait de macération).

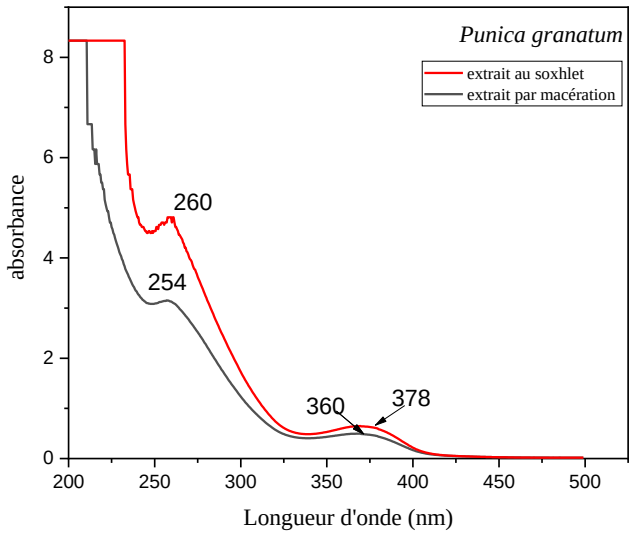
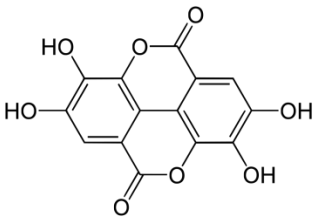



**Figure IV. 1** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Punica g.:* extrait de soxhlet (haut), extrait macéré (bas).

Le spectre UV de l'extrait issu de la macération (Fig. IV.1) a révélé la présence de deux bandes à 260 et 378 nm caractérisant le chromophore ellagyle. Ce dernier peut être attribué à la fois à l'acide ellagique sous forme d'aglycone qui est moins polaire (condensation de deux unités d'acide gallique en ester) et aussi à l'acide ellagique sous forme d'hétéroside qui est plus polaire [1-3].



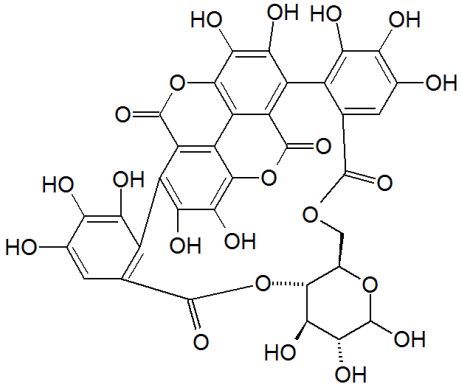

**Acide ellagique** (aglycone) : **254** et **360 nm**

**Figure IV. 2** Structures chimiques trouvées dans l'extrait par macération de *Punica g*.

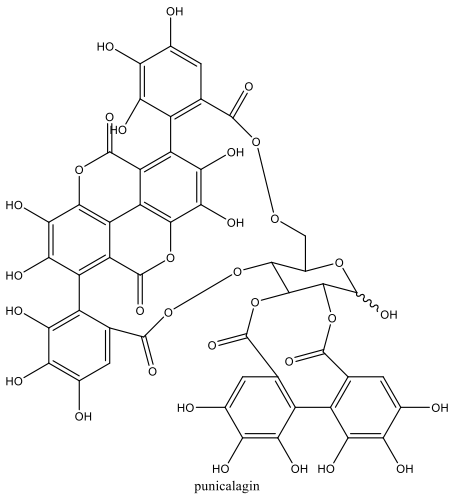
Quant au spectre UV de l'extrait au soxhlet (Fig. IV.1), les deux bandes suivantes aux longueurs d'onde de 260 et 378 nm ont été connectées au chromophore gallagyle, qui constitue les deux composés suivants : punicaline (anomère α et/ou β) et punicalagine (anomère α et/ou β) [1, 3-5]. [4], Le premier composé identifié (punicaline) est constitué d'une unité gallagyle reliée par ses extrémités (OH d'acide benzoïque) au cycle glycosidique formant deux fonctions esters conjuguées avec les noyaux aromatiques (*i.e.* squelette ellagyle lié de part et d'autre par deux unités gallyle dont les deux OH d'acides benzoïques sont

directement liés aux alcools du cycle hexose formant deux fonctions esters conjuguées). Quant au second composé punicalagine (chromophore : gallagyle), il ne diffère du premier (punicaline) que par l'ajout de deux unités gallyle (acides galliques) condensées entre elles, et branchées directement aux deux alcools du cycle hexose (qui est déjà lié en partie au noyau gallagyle) formant ainsi deux autres fonctions esters conjuguées avec les deux cycles aromatiques du noyau gallyle (soit au total quatre fonctions esters).

D'après Gil et al. 2000 [1], les punicalines sont considérées comme étant les premiers composés issus des réactions d'hydrolyse de punicalagines considérés comme des ellagitannins hydrolysables.



**Punicaline** (gallagyle: ellagyle + 2 unités gallyles séparées) : **260** et **378 nm**




**Punicalagine** (ellagitannins hydrolysables): (gallagyle + 2 unités gallyles condensées entre elles) : **260** et **378 nm**

**Figure IV. 3** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Punica g.*

En se référant aux études antérieures conduites par Lantzouraki et al. 2015 [3], Ben Ajmia et al. 2017 [5] dans le cas de l'extrait hydro-éthanolique, les longueurs d'onde de 264 et 375 nm ont été assignées à la punicaline (chromophore : gallagyl-hexose), tandis que celles de 253, 365 nm et 253, 361 nm ont été connectées respectivement à l'acide ellagique (aglycone) et l'acide ellagique (hétéroside). D'après Amyrgialaki et al. 2014 et références citées [6], la punicaline (anomères α et β) issue de l'extrait éthanolique absorbait à 256 et 374 nm, cependant celui de l'acide ellagique apparaissait à 252 et 362 nm. Dans le cas du jus de grenadine, les deux conformères de la punicalagine (α et β) ont été caractérisées par leurs longueurs d'onde à 258 et 378 nm [1].

Récemment, Imperatori et al. 2019 [7] ont montré la présence des mêmes chromophores que nous avons obtenus, tout en rapportant que les tanins hydrolysables sont les principaux constituants, et plus précisement les isomères de punicalagine α et β (31,5 et 57,2 %) ainsi que ceux de punicaline α et β (1,03 et 2,07 %), suivis de l'acide ellagique et de ses dérivés (6,25 %). Il est à signaler que l'acide gallique se retrouve en quantité très faible (0,38 %).

Il est à noter aussi que dans le cas de nos spectres UV, l'absence des pics d'absorption dans les deux régions de 526-503 et 276-280 nm permet d'exclure la présence d'anthocyanes (aglycone et/ou hétéroside), tels que les cyanidines, les pélargonidines et les delphinidines, qui sont caractérisés dans la littérature par les plages d'absorption UV respectives à (515-522, 274-280 nm), (503-511, 274-276 nm), et (526, 276 nm) [3,5].

En se référant à de nombreuses études quantitatives par chromatographie HPLC, sur les extraits d'écorces, les anthocyanines ont été détectées à des concentrations très faibles dans les échantillons d'Espagne [8], de Tunisie [5] et d'Italie [7]. Il en est de même dans le cas du jus de grenade, ceci a été vérifié sur les jus d'Italie [1,9], de Grèce [3]) et d'Espagne [10].

Les principaux composés identifiés par UV-vis dans nos échantillons (punicaline (isomère α et β), punicalagine (isomère α et β), acide ellagique sous forme d'aglycone) corroborent bien avec ceux trouvés dans certaines variétés de pelures de grenade, comme celles de Tunisie Wafa et al. 2017 [5], Kharchoufi et al. 2018 [11]), d'Italie (Gil et al. 2000 [1], Amyrgialaki et al. 2014 [6], Masci et al. 2016 [12], Imperatori et al. 2019 [7]), d'Espagne (Rosas-Burgos et al. 2017 [13]), de Grèce Lantzouraki et al. 2015 [3], de Serbie (Zivkovic et al. 2018 [14]), et d'Amérique (Madrigal-Carballo et al. 2009 [15]).

*1.1.1 Effet bathochrome, hypsochrome et hyperchrome des extraits au soxhlet et macération*

- *Cas de Punica granatum :*

En comparant le profil UV (Fig. IV.1) des deux extraits (soxhlet et macération) de *Punica g.* dans la zone spectrale entre 240-300 nm (transition $\pi -> \pi^*$ du cycle aromatique phénolique), un effet bathochrome a été noté dans le cas de l'extrait au soxhlet justifié par un déplacement de 6 nm vers le rouge (260 nm au lieu de 254 nm), accompagné de l'effet hyperchrome manifesté par l'augmentation de l'absorptivité molaire (ε).

L'effet bathochrome dans l'extrait au soxhlet s'explique par  par la présence du chromophore gallyle (*i.e.* ellagyle conjugué avec deux unités d'acide gallique sous forme de deux esters) absorbant à 260 nm dont le champ de résonance (conjugaison des électrons π) est plus étendu que celui du chromophore ellagyle issu de la macération (juste deux unités d'acide gallique

conjuguées entre elles et sous forme de deux esters) absorbant à 254 nm. L'effet hyperchromique pourrait être dû à la prédominance de la teneur en polyphénols dans le cas de l'extrait au soxhlet comparé à celui dérivant de l'extrait de macération (effet hypochromique).

Concernant le domaine 340-400 nm de faible intensité, ces absorptions sont dues aux transitions n−>π* liées aux groupements carbonyles [16]. En comparant les longueurs d'onde de l'extrait au soxhlet à celui macéré, l'effet bathochrome a été bien manifesté (378 nm au lieu de 360 nm) ainsi que celui hyperchrome (cas du soxhlet). Dans le cas de l'extrait macéré, un effet hypochrome a été remarqué justifié par la faible absorptivité molaire (ε). Cet effet pourrait s'expliquer par la contribution d'une faible quantité de transitions de type n− π* reliable aux groupements C=O dans le chromophore ellagyle (2 groupements carbonyles sous forme d'ester conjugué). Cependant, dans l'extrait au soxhlet cette participation (transitions de type n− π*) est beaucoup plus importante dans le cas du chromophore gallagyle due à la présence de quatre groupements carbonyles (4 C=O sous forme d'ester conjugué) constituant des composés punicalagine et punicalagine, contribuant à un effet hyperchrome.

L'effet bathochromique est dû généralement au phénomène de résonance induit par la conjugaison entre les électrons π de C=O et C=C entre eux ainsi que les électrons ''n'' de l'oxygène de OH phénolique avec les électrons π du noyau gallagyle (ellagyle + 2 unités gallyles séparées), et aussi bien entre les électrons ''n'' et les électrons π de C=O dans le cas de la zone spectrale de faible intensité (longueurs d'onde les plus élevées).

**Tableau IV. 1** Affectation des bandes UV-vis de l'écorce de grenade (*Punica. granatum*) dans les deux extraits : macération et soxhlet

| **Plante** | Nature des extraits | $\lambda_{max}$ (nm) | Chrom o-phore | Composé identifié | Références | **Description UV-visible** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Punica g.* | Macération | 254, 360 | ellagyl | ellagyl (esterifed phenolic acid), ellagic acid (aglycone) . polar ellagic acid (heteroside: glucose ring) | [1-3] | Effet hypsochrome et hypochrome |
| | Soxhlet | 260, 378 | gallagyl | . punicalin anomer (α/β) . punicalagin anomer (α/β) | [1,3-5], | Effet bathochrome et hyperchrome |

L'analyse par spectrophotométrie UV a permis d'identifier les chromophores liés à chaque type d'extrait et de discriminer entre les deux méthodes d'extraction utilisées, montrant ainsi l'apport de la procédure au soxhlet qui est d'une grande richesse et variabilité en contenu phytochimique (principalement les polyphénols). Ces résultats obtenus ne font que renforcer les données déjà obtenues lors des essais colorimétriques qui convergent aussi envers la méthode d'extraction au soxhlet.

*I.2. Rubia tinctorum*

Concernant le profil des deux spectres UV (Fig. IV. 4) des deux extraits de *Rubia t.* (soxhlet, macération), on peut noter la présence de trois zones spectrales : la première (240-300 nm) est d'intensité plus forte que la seconde (400-450 nm), suivie de celle entre 300-350 nm.

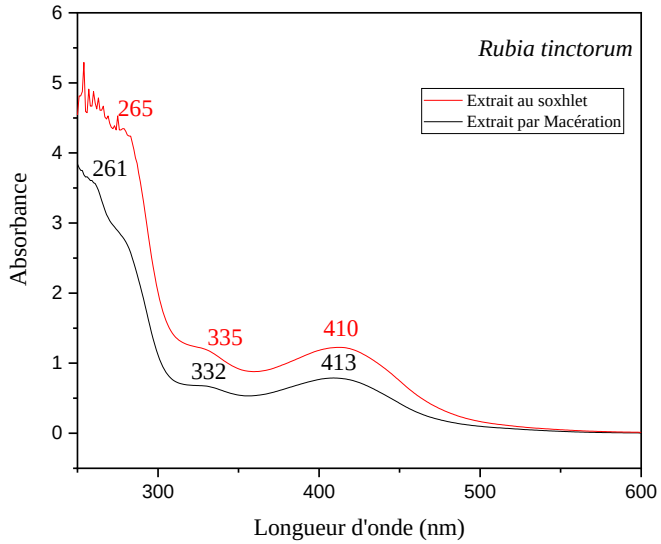
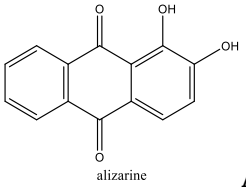



**Figure IV. 4** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Rubia t.* (soxhlet, macération).

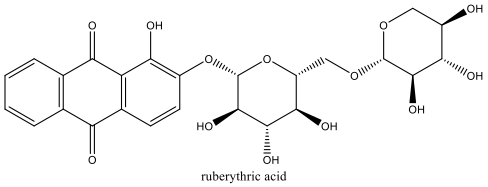
L'analyse par UV de l'extrait issu de la macération de *Rubia t.* (Fig. IV. 4) a montré la présence de trois types de bandes d'absorption à 261, 332 et 413 nm relatives au chromophore anthraquinone, et sont caractéristiques des composés suivants : alizarine (forme aglycone) et acide rubérythrique (forme hétéroside) [17], La bande d'absorption à λ= 261 nm est reliable à la transition π-π* du cycle aromatique de l'anthraquinone, [18], tandis que celle de λ = 332 nm correspond à la transition n-π* de la fonction carbonyle (C=O).

Dans le spectre UV de l'extrait au soxhlet (Fig. IV. 4), les bandes aux longueurs d'onde de 265, 335 et 410 nm sont relativement intenses (ε élevé : effet hyperchrome) et présentent un

effet bathochrome (λ élevé : 265 au lieu de 261 nm, et 335 au lieu de 332 nm) par rapport à celles de l'extrait macéré. Ceci peut être justifié par l'ajout des incréments en plus sur le noyau aromatique de type méthyle et hydroxyméthyle, responsables de l'augmentation de ces longueurs d'ondes et donnant lieu à de nouveaux chromophores anthraquinoniques plus substituées et sous formes d'aglycones, comme la rubiadine (substituée par $-CH_3$) et la lucidine (substituée par $-CH_2-OH$) (voir structures chimiques ci-après [17-19].

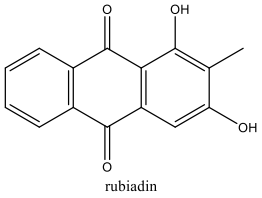



**Alizarine**

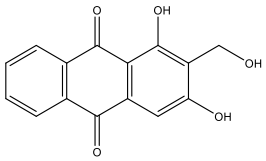



**Acide rubérythrique**

**Figure IV. 5** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Rubia t.*




**Rubiadine**




**Lucidine**

**Figure IV.6** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Rubia t.*

*I.3. Papaver rhoeas*

Sur les deux spectres UV des extraits de fleurs de *Papaver r*. (Fig. IV. 7), trois régions spectrales ont été identifiées : celle de 240-300 nm dont l'intensité est plus importante par rapport aux autres (ε très élevé), suivie de celle localisée entre 300-350 nm relativement faible, et la dernière entre 400-450 nm.

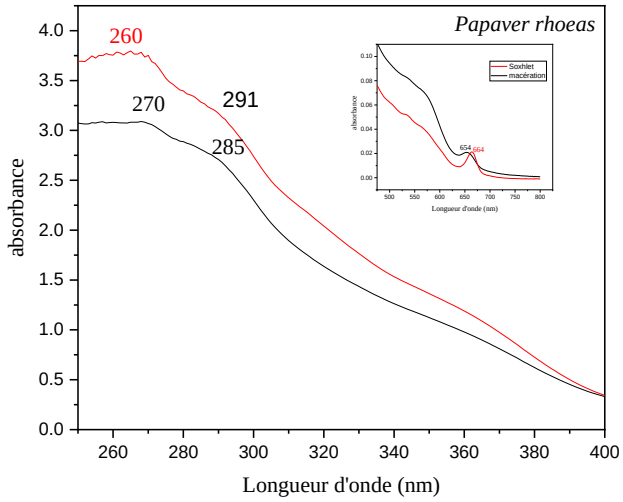
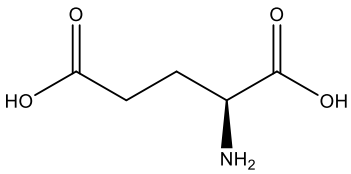



**Figure IV. 7** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Papaver r.* (soxhlet, macération).

Le profil UV de l'extrait macéré (Fig. IV. 7), présente deux bandes à 270 et 285 nm et sont corrélées à l'acide glutamique [20] a rapporté les mêmes valeurs en utilisant l'analyse par HPLC–DAD (à barette de diode). Récemment Grauso et al. 2019 [21], ont identifié dans les feuilles de *Papaver r.* la présence du même composé par analyse de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

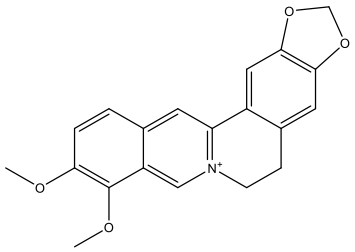
Le spectre d'absorption UV-vis de l'extrait au soxhlet (Fig. IV. 7) est caractérisé par la présence de trois bandes dont deux à 260 nm et 285 nm (transitions π-π*) correspondant au composé berberine [22,23], et l'autre à 664 nm de faible intensité (ε très faible) est reliable aux transitions **n-π***. En comparant nos résultats à celles de de la littérature (Hijjazi et al. 2017 [24]), la structure de berbérine présentait les mêmes longueurs d'onde UV, et a été aussi confirmée par spectroscopie de RMN et spectrométrie de masse (SM).




glutamic acid

**Acide glutamique**

**Figure IV. 8** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Papaver r.*




**Berbérine**

**Figure IV. 9** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Papaver r.*

*I.4. Hibiscus sabdariffa*

Les spectres UV des deux extraits d'*Hibiscus s*. (Fig. IV. 10) ont montré la présence de trois zones spectrales bien résolues allant de 240-300 nm (la plus intense), 300-350 nm (de moyenne intensité) et 500-550 nm (de faible intensité).

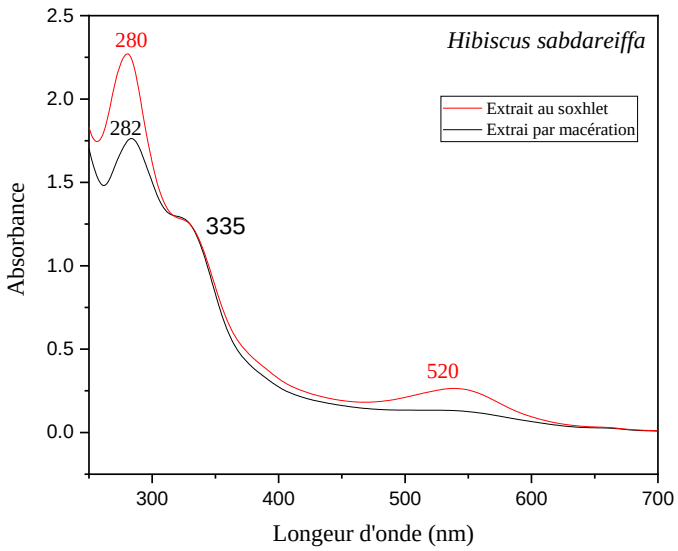
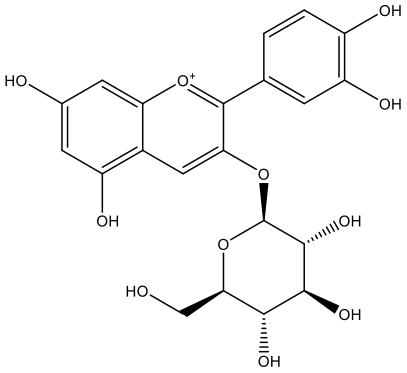



**Figure IV. 10** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Hibiscus s.* (soxhlet, macération).

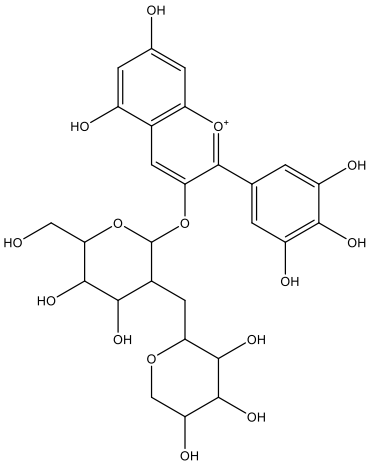
Le profil UV-vis de l'extrait au soxhlet d'*Hibiscus s.* (Fig. IV. 10) a montré une longueur d'onde maximale et bien résolue à 280 nm (transitions des orbitales liantes et antiliantes π-π*) accompagnée d'une autre vers les 335 nm (moins résolue), attribuables aux anthocyanes de type delphinidine-3-sambudioside et cyanidine-3-O-sambudioside [25,26]. Une autre bande de très faible intensité à 520 nm est assignée aux transitions de type n-π* des anthocyanes.

Le spectre UV de l'extrait issu de la macération (Fig. IV. 10) présente deux bandes dont une à 282 nm est la plus intense et l'autre moins résolue est située à 335 nm, reliables aussi au dérivé d'anthocyanes qui est le cianidine-3-glucoside [27].

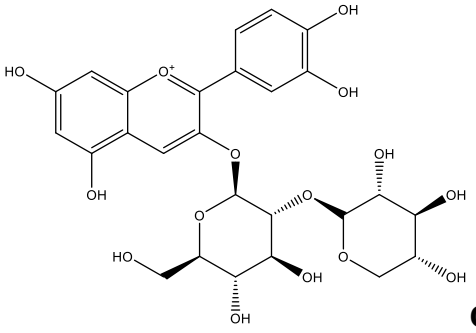


**Cianidin-3-glucoside**

**Figure IV. 11** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération d'*Hibiscus s.*



**Delphinidin-3-sambudioside**



**Cyanidine-3-O-sambudioside**

**Figure IV. 12** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet d'*Hibiscus s.*

*I.5. Quercus ilex*

D'après les profils des spectres UV des deux extraits de *Quercus i.* (Fig. IV. 13), trois zones spectrales peuvent être dégagées : 240-300 nm (de forte intensité), 350-400 (de faible intensité) et 450-500 nm (de très faible intensité).

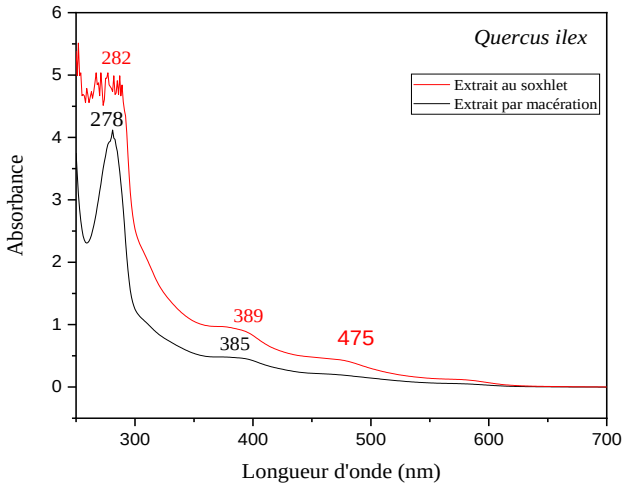
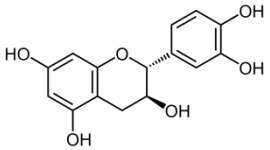


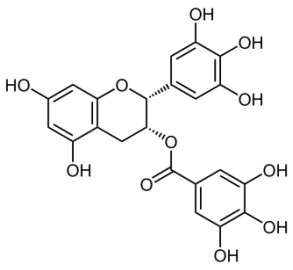

**Figure IV. 13** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Quercus i.* (soxhlet, macération).

Le spectre UV-vis de l'extrait au soxhlet de *Quercus i.* (Fig. IV. 13) est caractérisé par trois bandes, dont la première est de forte intensité à 282 nm (transition π-π*) tandis que la seconde est moyennement forte à 389 nm (transitions n-π*). Quant à la troisième de plus faible intensité à 475 nm, elle correspond à l'acide gallique [28].

Concernant le spectre UV de l'extrait macéré (Fig. IV. 13), les deux bandes d'absorption à 278 nm et 385 nm sont corrélées à la présence du composé épigallocatéchine (278 et 385 nm) et catéchine (385 nm) [29,31]. Ces résultats sont en bon accord avec les données rapportées par Meziti et al. 2019 [32], utilisant comme technique d'analyse la chromatographie HPLC à détecteur UV.

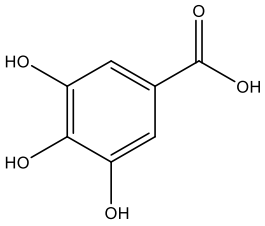


**Catechine**



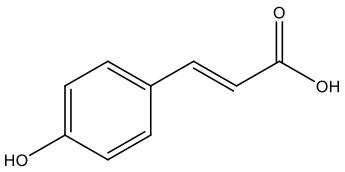
**Epigallocatechine**

**Figure IV. 14** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Quercus i.*




gallic acid

**Acide gallique**




coumaric acid

**Acide coumarique**

**Figure IV. 15** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Quercus i.*

*I.6. Lawsonia inermis.*

En comparant les profils des spectres UV des deux extraits de *Lawsonia i.* (Fig. IV. 16) par rapport aux cinq autres extraits de plantes (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s. et Quercus i.*), un total de huit bandes (mêmes valeurs) apparaissent chez les deux types d'extraits, dont six absorbant dans la région du visible témoignant de la diversité de chromophores contenus dans les deux types d'extraits de cette plante (*Lawsonia i.*).

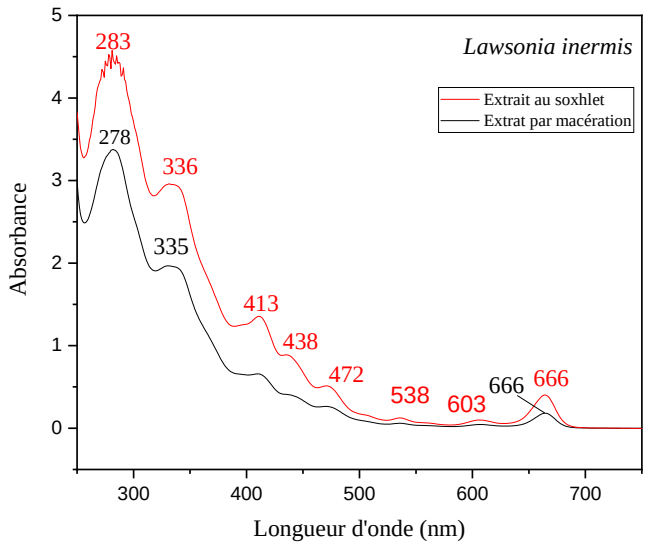



**Figure IV. 16** Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Lawsonia i.* (soxhlet, macération).

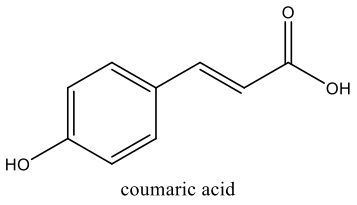
Le spectre UV de l'extrait au soxhlet de *Lawsonia i.* (Fig. IV. 16) a révélé la présence des bandes suivantes à 283, 336, 413, 438, 472, 540, 610 et 666 nm. La première présente un maxima à 283 nm et la seconde est relativement inférieure à 336 nm correspondent à des

transitions de type π-π*. Ces deux longueurs d'onde sont attribuables au chromophore du composé Lutéoline et eugénol [33].

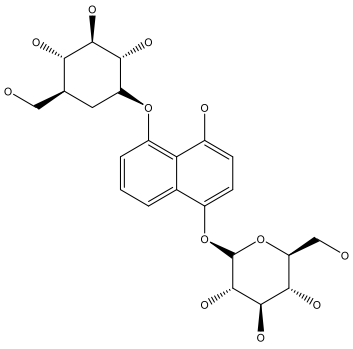
Les deux bandes suivantes à 413 et 666 nm sont connectées à la chlorophylle (**a**) [34]. Quant aux deux bandes absorbant à 472 et 610 nm, elles peuvent être assignées à la chlorophylle (b).

Les longueurs d'onde à 283, 438 et 540 peuvent être attribuables à lawsone [35,36], D'après Ali et al. 2009 [37] et Bhuiyan et al. 2017 [38], la Lawsone a été extraite à partir des feuilles de Henné en milieu alcalin pour la teinture du coton, et sa structure hydroxylée a été convertie envers un dérivé naphtoquinonique.

Concernant le spectre UV de l'extrait par macération (Fig. IV. 16), la bande d'absorption à 278 nm est assignée aux composés suivants : 1,2,4-trihydroxynaphthalene-1-O-ß-D-glucopyranoside (278 nm). La présence de ces derniers concorde avec les travaux de la littérature rapportés par Dhaouadi et al 2015 [33] et Ebrahimi et al. 2016 [39], utilisant comme technique d'analyse le couplage HPLC-DAD/SM.

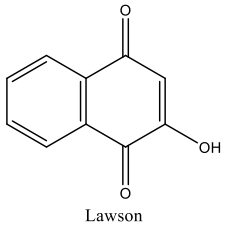



coumaric acid **Acide coumarique**

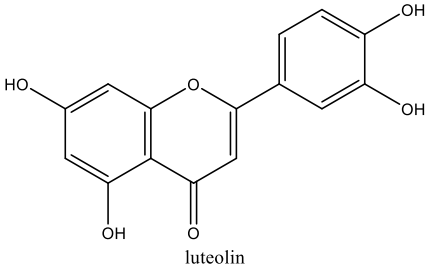


**trihydroxynaphthalene-1-O-ß-D-glucopyranoside**

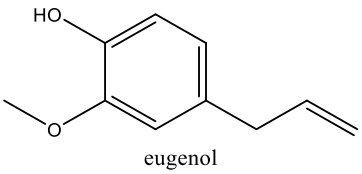
**Figure IV.17** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Lawsonia i.*



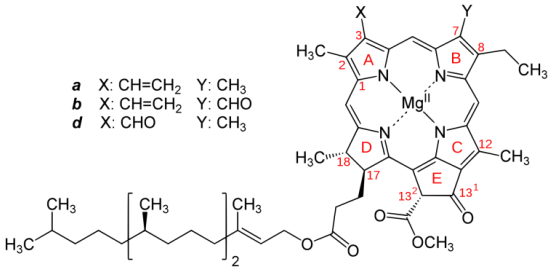

Lawson **Lawson**




luteolin **Luteoline**




**Eugenole**




**Chlorophylle a** (X= -CH=$CH_2$, Y= -$CH_3$):**λ= 413** et **666 nm**

**Figure IV. 18** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Lawsonia i.*

Les résultats des différentes longueurs d'onde obtenues par analyse UV-vis ainsi que les chromophores et composés caractérisés contenus dans chacun des deux types d'extraits (macération, soxhlet) sont regroupés dans le tableau IV.2 suivant.

**Tableau IV.2** Attribution des différentes λ (nm) obtenues par UV-vis et leurs chromophores relatifs aux deux types d'extraits (macération, soxhlet) de six plantes : (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*)

| **Plante** | **Nature des extraits** | **$\lambda_{max}$** (nm) | Description UV-visible | **Chromo-phore** | **Composé identifié** | **Références** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Punica g.* | macération | 254, 360 | Effet hypsochromique et hypochromique | ellagyl | ellagyl (esterifed phenolic acid), ellagic acid (aglycone)<br>. polar ellagic acid (heteroside: glucose ring) | [1-3] |
| | Soxhlet | 260, 378 | Effet bathochromique et hyperchromique | gallagyl | . punicalin anomer (α/β)<br>. punicalagin anomer (α/β) | [1,3-5] |
| *Rubia t.* | macération | 261, 331,413 | | | Alizarine<br>acide rubérythrique | [17] |
| | Soxhlet | 265, 335,410 | | | -Rubiadine<br>-Lucidine | [18,19] |
| *Papaver r.* | macération | 285, 665 | | | Acide glutamique | [20] |
| | Soxhlet | 260<br>664 | | | Berberine | [22,23] |
| *Hibiscus s.* | macération | 280, 520 | | | Sianidin-3-glucoside | [27] |
| | Soxhlet | 282,519 | | | Delphinidin-3-sambudioside<br>Cyanidine-3-O-sambudioside | [25,26] |
| *Quercus i.* | Macération | 281, 385, 475,575 | | | Catéchine<br>Epigallocatéchine | [29-31] |
| | Soxhlet | 281, 385,475, 575 | | | acide gallique | [28] |
| *Lawsonia i.* | Macération | 278, 335, 550<br>600<br>666 | | | 1,2,4-trihydroxynaphthalene-1-O-ß-D-glucopyranoside | [33] |
| | Soxhlet | 283, 336, 413, 550<br>600<br>666 | | | Lawson<br>Eugenol<br>Luteolin<br>Chlorophylle (**a**) (413, 666 nm) | [33,34,39] |

*II. Caractérisation structurale par spectroscopie IRTF des groupements fonctionnels contenus dans les extraits de plantes (macération, soxhlet)*

L'analyse qualitative par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a été appliquée aux extraits de six plantes (macération, soxhlet) : écorce de grenade (*Punica g.*), racines de la garance (*Rubia t.*), fleurs de coquelicot (*Papavers r.*), roses d'Hibiscus s. (*Hibiscus s.*), écorce de chêne vert (*Quercus i.*) et feuilles de Henné (*Lawsonia i.*). Le but était d'analyser les constituants (groupements fonctionnels, squelette hydrocarboné…) informant sur les changements structuraux des constituants dans les différents extraits, de comparer l'apport et l'efficacité de chaque procédure (macération, soxhlet), et enfin, de corréler les résultats à ceux rapportés par UV.

Les différents spectres IRTF des différents extraits (soxhlet, macération) ont été illustrés sur les figures (IV. 19 jusqu'à IV. 24). Leurs attributions ont été basées sur les données de la littérature et dont les résultats recueillis ont été consignés dans le tableau IV. 3 (page **130**).

Les spectres IRTF peuvent être sub-divisés en cinq régions principales : 3650-3100, 3000-2850, 1800-1200, 1190-950 et 900-400 $cm^{-1}$, dont les trois dernières sont plus informatives et très importantes pour la caractérisation structurale.

A première vue, les spectres des deux extraits (soxhlet, macération) issus de la même plante présentent une certaine ressemblance, moyennant des pics caractéristiques de polyphénols et dont leurs cycles aromatiques sont conjugués à des groupements carbonyles (esters) et aussi ramifiés par des molécules de sucres conférant une certaine polarité.

***II.1.*** *Analyse par spectroscopie IRTF des extraits de Punica granatum*

. Dans le cas du spectre IRTF de l'écorce de grenade (*Punica g.*), le signal intense à 1720 $cm^{-1}$ est clairement caractéristique du groupement carbonyle conjugué (esters d'acides phénoliques : Ar-CO-O-Ar) [40,41], constituant les chromophores des structures chimiques étudiées de type : ellagyl, gallagyl et galloyl. D'autres types de carbonyles existent sous forme d'esters reliés à l'hétérocycle du sucre (Ar-CO-O-sucre).

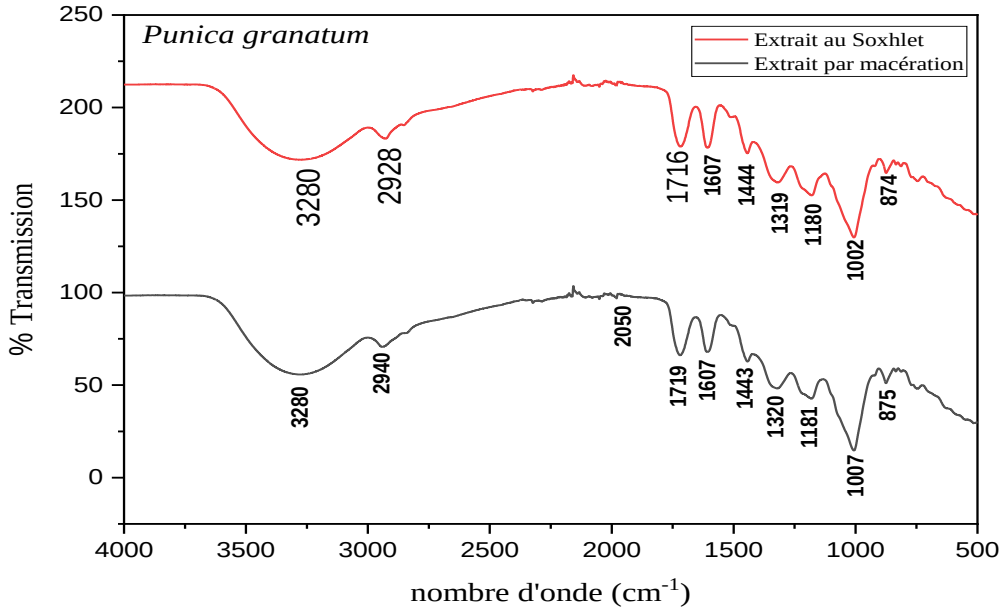



**Figure IV. 19** Spectres IRTF des deux extraits d'écorce de grenade (*Punica g.*): soxhlet (haut) et macération (bas).

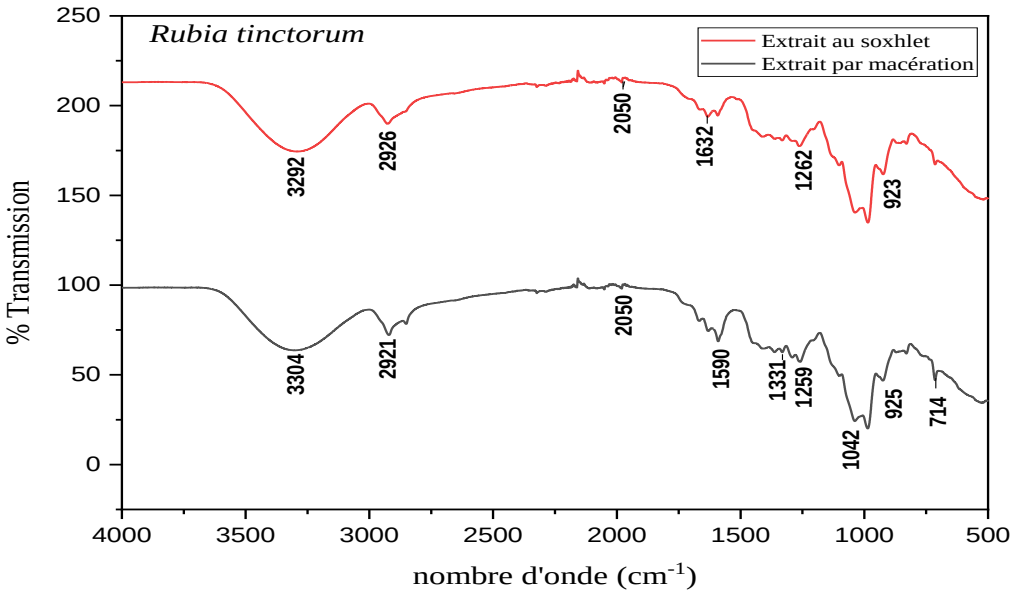



**Figure IV. 20** Spectres IRTF des deux extraits de *Rubia t.*: soxhlet (haut) et macération (bas).

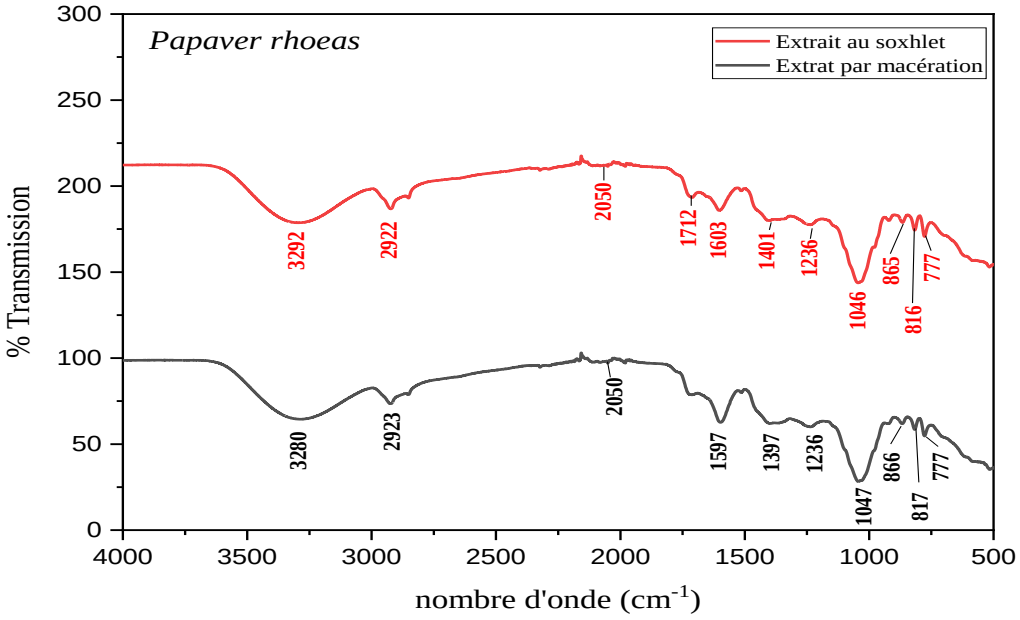



**Figure IV. 21** Spectres IRTF des deux extraits de *Papavers r.* : soxhlet (haut) et macération (bas).

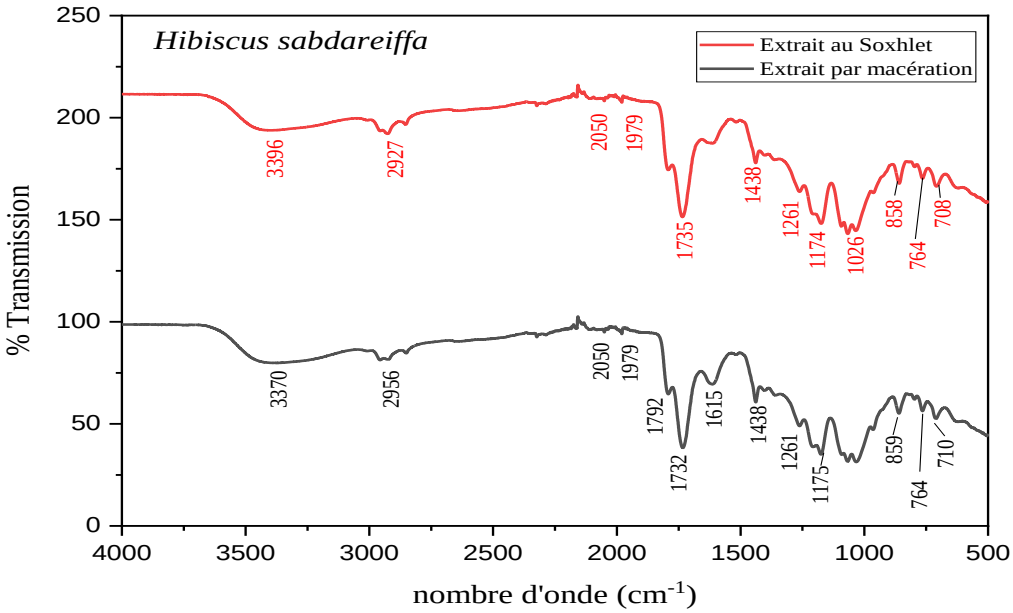



**Figure IV. 22** Spectres IRTF des deux extraits de *Hibiscus s.*: soxhlet (haut) et macération (bas).

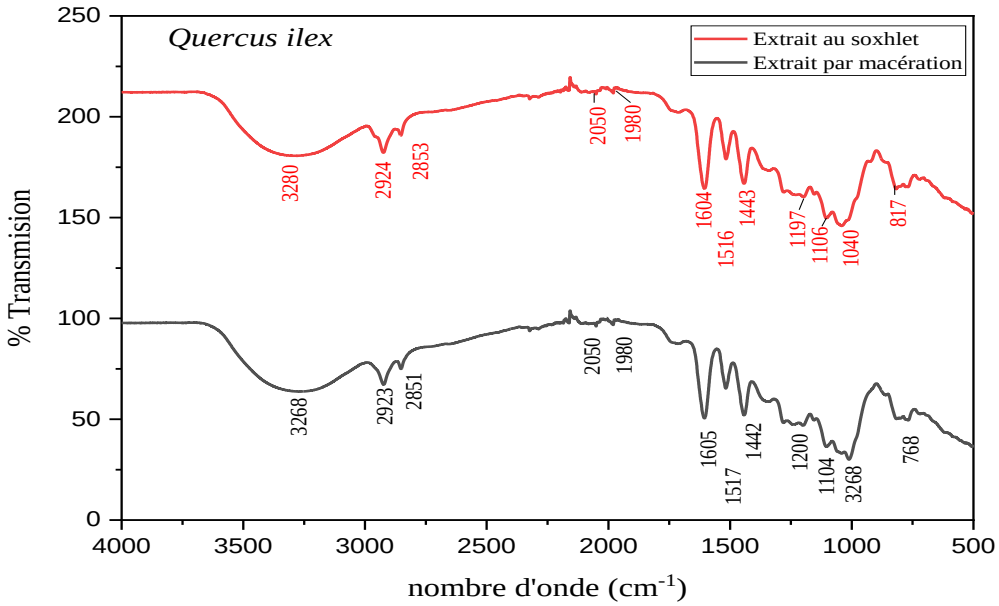



**Figure IV. 23**. Spectres IRTF des deux extraits de *Quercus i.* : soxhlet (haut) et macération (bas).

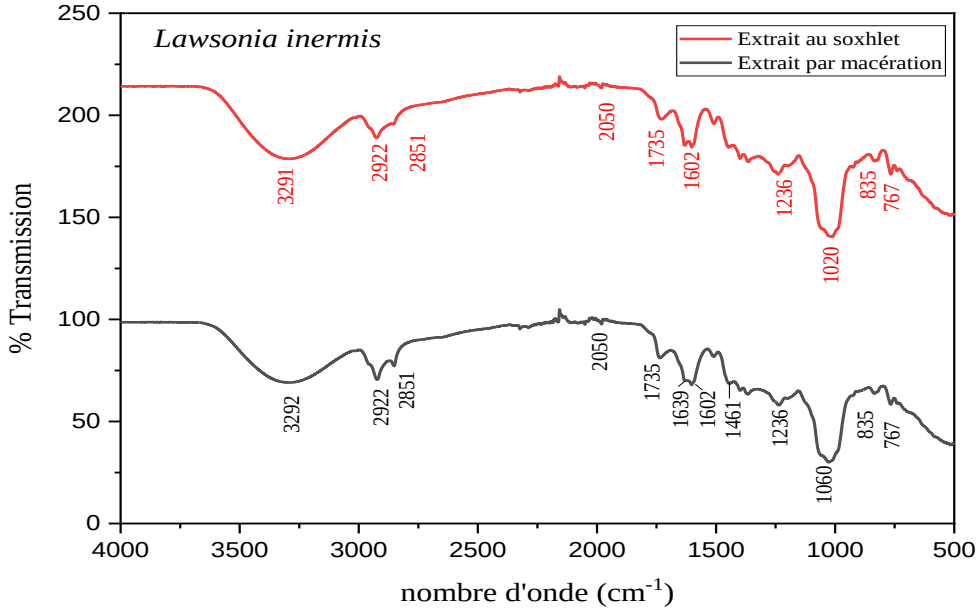



**Figure IV.24** Spectres IRTF des deux extraits de *Lawsonia i.* : soxhlet (haut) et macération (bas).

Le spectre IR expérimental est composé de deux régions, dans la première région, au-dessus de 1300 $cm^{-1}$, deux bandes sont observées, l'une à 1470 et l'autre à 1600 $cm^{-1}$. Dans la seconde région, en-dessous de 1300 $cm^{-1}$, le motif est plus complexe et dominé par trois bandes intenses, observées à 880, 995 et 1177 $cm^{-1}$.

Les dérivés aromatiques polaires ont été caractérisés par une bande légèrement large (au lieu de fine) à 1612 $cm^{-1}$ attribuée à la liaison $C_{ar}$=$C_{ar}$ à caractère polaire de l'unité phénolique, associée aux deux pics situés à 1505 $cm^{-1}$ ($C_{ar}$=$C_{ar}$) et entre 3700-3100 $cm^{-1}$ (OH phénolique) [41-43]. La forte absorption à 1268 $cm^{-1}$ confirme bien et une seconde fois la présence de cycle aromatique substitué par un groupement alkoxy (RO-) polaire attribuée à la bande $C_{ar}$-O indiquant la présence de phénol ramifié [41].

Une autre bande de faible intensité considérée comme empreinte digitale des aromatiques est située à 874 $cm^{-1}$ attribuable à la vibration de déformation hors du plan de C-H aromatique (γCHar : 1 $CH_{ar}$ isolé) [44,45], renseigne clairement sur le degré de substitutions du cycle aromatique (phénolique), et plus exactement sur les noyaux aromatiques de type : ellagyl, gallagyl, galloyl, et principalement ceux de punicalagine et punicaline (sauf unité ellagyle). Un autre pic de faible intensité à 751 $cm^{-1}$ est reliable à la vibration de déformation hors plan du $CH_{ar}$ 45]), et/ou au mode de déformation dans le plan de O-C-O des sucres [46].

En se référant aux travaux récents de Noda 2018 [47] lors de l'analyse par IRTF-2D, la région dont les pics sont très intenses entre 1190 et 950 $cm^{-1}$ correspond au C-O des deux anomères (α, β) du glucose qui absorbent respectivement à 995, 1030, 1055, 1074, 1104, 1145 $cm^{-1}$ et 992, 1020, 1035, 1080, 1108, 1158 $cm^{-1}$. Ces données constituent de bons indicateurs dans la discrimination stéréochimique des sucres, entre les deux conformères α et β.

Dans les spectres IRTF des extraits de *Punica g.*, le pic le plus intense centré à 1046 $cm^{-1}$ est assigné au C-O glycosidique, le profil de cette région est considéré comme une empreinte digitale des carbohydrates [46,48-50]. Cette attribution est également supportée à la fois par la présence d'autres pics relatifs à OH (associés par liaison hydrogène *inter*- et *intra*-moléculaire : absorption large) dans la plage spectrale entre 3700 à 3100 $cm^{-1}$, et par νC-O à 997 $cm^{-1}$ attribuable à la liaison axiale du carbone anomérique (α) du glucose [47]. Cependant celle en position équatoriale (conformère β) est relativement plus forte et attendue généralement à 1068 $cm^{-1}$. Un autre signal lié aux hydrates de carbone à 1187 $cm^{-1}$ est attribué à la vibration d'élongation asymétrique du pont osidique C-O-C (C-O-C des hydrates de carbone, et/ou liaison β-(1-4)-glycosidique). L'absorption large et moins intense dans

l'intervalle de 700-400 $cm^{-1}$ est connectée à la vibration de de déformation hors plan d'O-H glucidique et/ou phénolique. L'existence de ces hydrates de carbone (glucose) peut être branchée à des aglycones appelées aussi génines (*i.e* chromophores phénoliques carbonylés (sans sucre)), comme ceux de l'acide ellagique, punicaline, punicalagine. Une fois greffé à l'aglycone (génine), ils sont appelés hétérosides. L'apparition d'une bande sous forme d'épaulement et de faible intensité à 896 $cm^{-1}$ est assignée au mode de déformation de C-H de la liaison glycosidique β-1,4- [16].

En confrontant nos résultats aux données antérieures de la littérature, nous pouvons confirmer la présence de deux anomères α et β, probablement branchés aux groupements polaires (OH phénolique) des structures (chromophores) de punicalagine et et des esters ellagyliques. Des résultats similaires ont déjà été confirmés par la littérature et lors de l'analyse par UV-vis (voir la section UV).

Concernant le squelette hydrocarboné saturé, il est caractérisé par la présence de deux bandes de faibles intensités à 2960 $cm^{-1}$ ($\nu_{as}CH_3$ : radical méthoxyl greffé à l'aromatique) et 2928 $cm^{-1}$ ($\nu_{as}CH_2$ : chaîne latérale du cycle glucopyranosidique + $\nu_sCH_3$). [41,44,51]. Quant aux deux valeurs à 1444 $cm^{-1}$ ($\delta CH_2 + \delta_{as}CH_3$) et 1340 $cm^{-1}$ ($\delta_sCH_3$), elles sont attribuables aux vibrations de déformations de $CH_2$ de la chaîne latérale du cycle glucidique et de $CH_3$ du radical méthoxyl greffé au noyau phénolique. Cette dernière fréquence (plus faible) pourrait chevaucher avec les deux vibrations d'élongation suivantes : C-O-C (acétal) du cycle pyranose et la déformation angulaire (C-CO-O) du groupement ester.

Il est à signaler que dans les spectres IRTF des deux extraits, certains signaux présentent des profils similaires, d'où la difficulté de discrimination entre eux. C'est pourquoi, nous avons fait appel à une autre technique qui est celle de déconvolution, et qui nous a permis de distinguer l'apparition de nouvelles bandes et de montrer certaines différences entre les spectres étudiés, aussi bien au niveau des intensités de certaines bandes caractéristiques qu'au niveau de certains signaux larges et intenses qui cachent d'autres pics, dont leur caractérisation est informative par rapport au spectre des extraits d'origine (sans déconvolution).

***I.4.1.1.*** Déconvolution des spectres IRTF des extraits de *Punica g*.

La méthode de déconvolution a permis de répondre à certaines ambigüités rencontrées au cours de l'élucidation structurale de certains signaux, en montrant la présence de changements structuraux au niveau des deux spectres IRTF des deux extraits étudiés (Figure **IV. 25**).

Généralement, sur un spectre IRTF normal, Il serait difficile d'attribuer avec exactitude la présence éventuelle des deux anomères (α et β) évoqués dans le cas du glucose, car les six bandes caractéristiques de chacun des épimères sont voisines et se chevauchent (étroitement liées entre elles), donnant lieu à un seul signal intense à 1040 $cm^{-1}$, d'où la difficulté de leur distinction. Pour pallier à ce problème, la technique de déconvolution a été utilisée, et les bandes caractéristiques de chacun des isomères présents ont donc été mises en évidence.

En se basant aussi sur des études par spectroscopie vibrationnelle à deux dimensions (IRTF-2D), appliquées à la discrimination des deux anomères α et β dans le cas du glucose, récemment Noda et al. 2018 [47], ont montré que les bandes du conformère α apparaîssent à 1145, 1104, 1074, 1055, 1030 et 995 $cm^{-1}$, tandis que celles du conformère β sortent à 1158, 1108, 1080, 1035, 1020 et 992 $cm^{-1}$.

Dans les deux extraits analysés (soxhlet et macération), et en s'entraidant avec les données de la littérature, c'est grâce à la valeur de 1145 $cm^{-1}$ qu'on a pu attribuer l'anomère α et celle de 1158 $cm^{-1}$ pour identifier celui en β, car ces deux valeurs se trouvent plus éloignées par rapport aux autres. Ces résultats obtenus consolident bien la présence des anomères de glucose liés aux chromophores polaires obtenus par UV (extrait soxhlet : composés anomériques liés aux chromophores punicalagine et punicaline ; extrait macéré: ellagyl hétéroside).

Dans le cas de l'extrait au soxhlet (*Punica g.*) et après déconvolution du spectre IR, deux nouvelles bandes carbonyles (C=O) d'absorption différentes ont été localisées à 1740 $cm^{-1}$ et 1710 $cm^{-1}$ (deux types de carbonyles conjugués de l'acide phénolique estérifié) au lieu d'une seule à 1720 $cm^{-1}$, et sont d'une grande importance, caractéristiques de C=O relatif au punicalagine et punicaline, et corrélés aux noyaux gallagyles (Ar-CO-O-Ar) et au squelette gallylique (Ar-CO-O-sucre), respectivement. Cependant, dans le cas de l'extrait macéré, une seule bande a été observée à 1720 $cm^{-1}$, attribuable au carbonyle conjugué de l'ester d'acide phénolique (unité ellagyl typique Ar-CO-O-Ar). Ces données IR supportent bien et consolident les résultats déjà obtenus par spectrophotométrie UV.

Deux régions spectrales importantes ont été retenues pour l'analyse des spectres ayant fait l'objet de déconvolution, celle entre 1430-1250 $cm^{-1}$ et une autre entre 1250-1170 $cm^{-1}$.

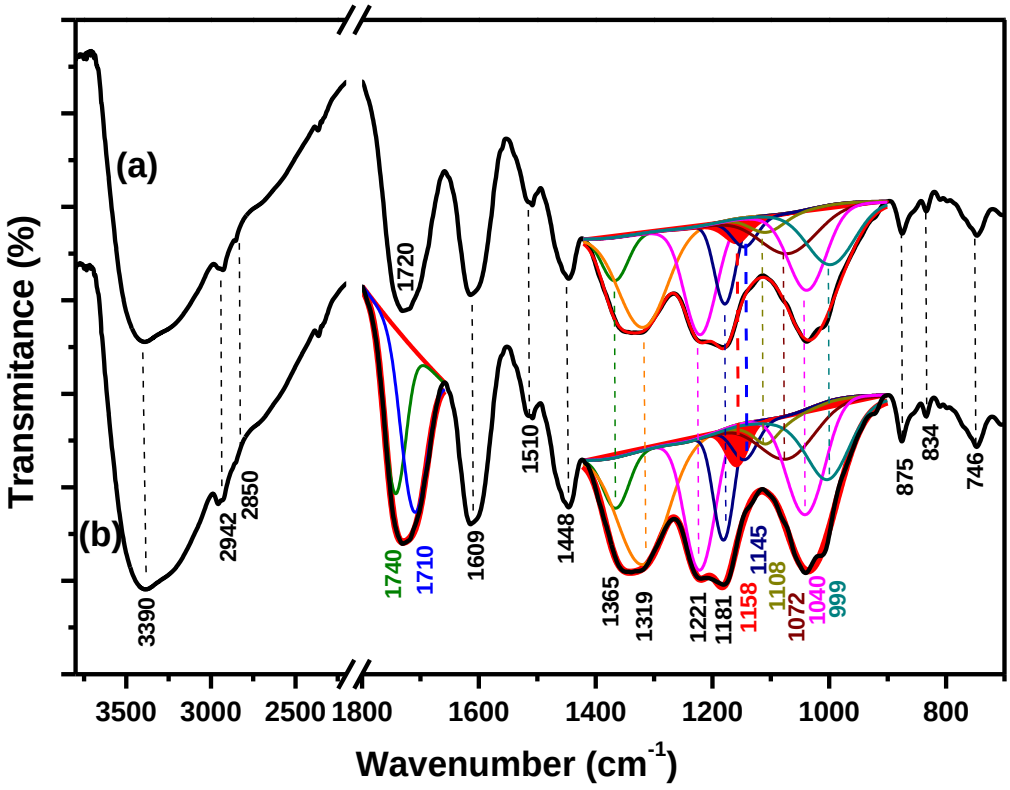



**Figure IV.25** Spectres IRTF d'extraits d'écorce de grenade (*Punica granatum*) après déconvolution: (**b**) macération et (**a**) soxhlet

### *I.4.1.1.a* Région 1430-1250 $cm^{-1}$

1365 $cm^{-1}$ : δC-H [41,42,52-54], $\delta_s CH_3$-O- groupement méthoxy lié au noyau aromatique de la quercétine [43,46,49,52,55-59].

1319 $cm^{-1}$ : $\delta CH_2$ des glucides [47,49] ou mode de balancement [43,53-55,57], anneau seringyl [55].

### *I.4.1.1.b* Plage spectrale 1250-1170 $cm^{-1}$

1221 $cm^{-1}$ : νCar-O : aromatique substitué par des groupements OH phénolique [49], (xylan) ; C-O-C du xyloglucane [41,43,53], δO-H : des glucides et des groupements COOH [42].

1181 $cm^{-1}$ : $\nu_{as}$C-O-C : pont de β-(1-4)-liaison glycosidique [42,46,48,52,54,56] ou νC-O-C des glucides [42,43,56], δC-H d'hydrates de carbone [43,48,53,57], δC-H [60].

*I.4.2.. Superposition et analyse par spectroscopie IRTF des différents extraits de plantes*

Les différents spectres IRTF des extraits au soxhlet issus de six plantes (*Punica g.*, *Rubia t.*, *Papavers r.*, *Hibiscus s.*, *Quercus i.*, *Lawsonia i.*) sont superposés et reportés sur la figure **8**, ceux dérivant des extraits macérés sont représentés sur la figure **9**, et dont les résultats sont résumés dans le tableau IV. **3**.

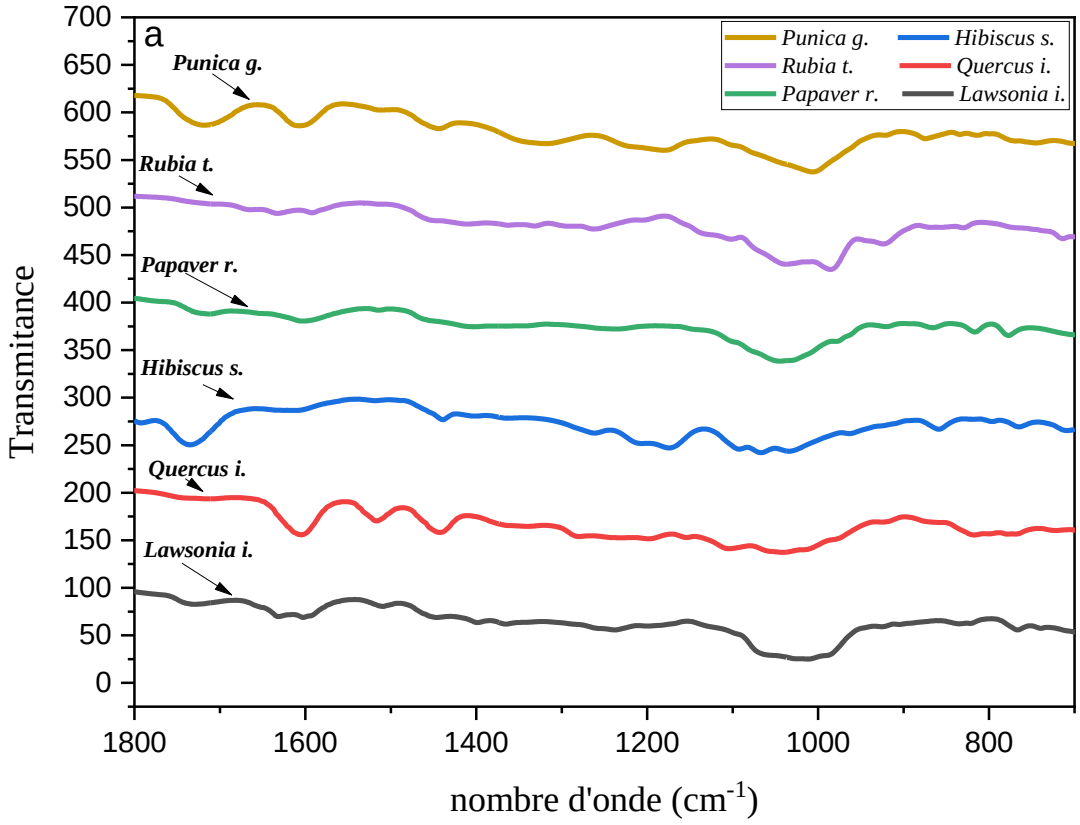



**Figure IV 26** : Superposition des spectres IRTF (1800-700 $cm^{-1}$) des extraits au **s**oxhlet de six plantes: (de haut en bas : *Punica g.*, *Rubia t.*, *Papavers r.*, *Hibiscus s.*, *Quercus i.*, *Lawsonia i.*).

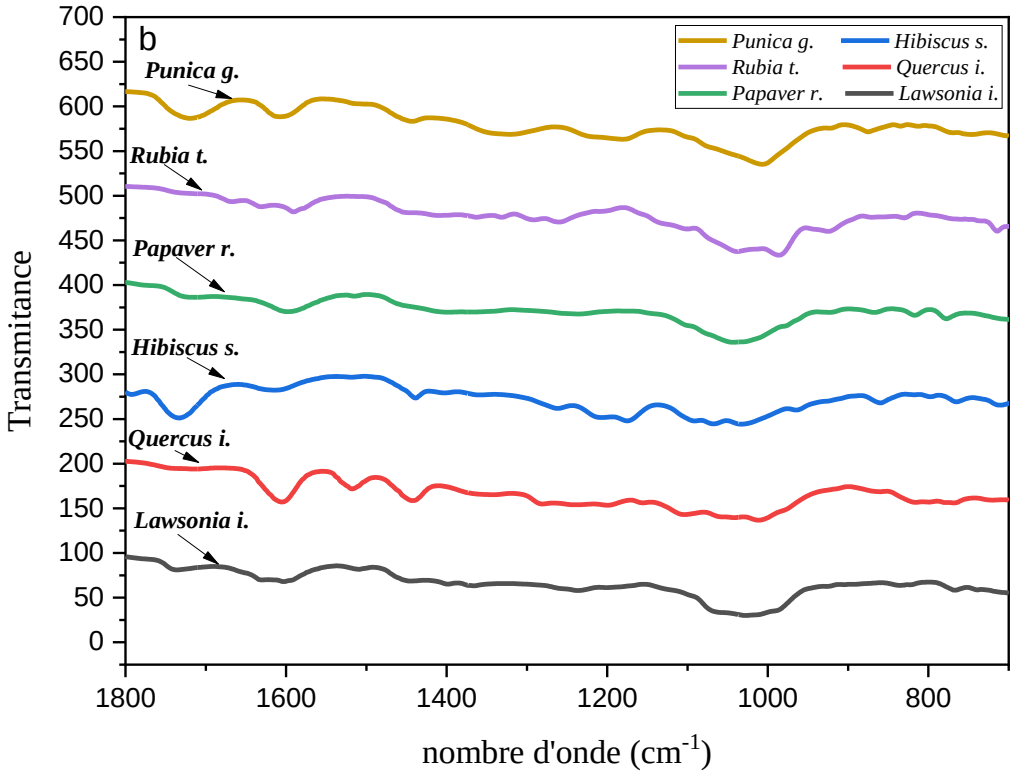



**Figure IV. 27** : Superposition des spectres IRTF des extraits macérés de six plantes : (de haut en bas : *Punica g., Rubia t., Papavers r., Hibiscus s., Quercus i., Lawsonia i.*).

Les données spectrales des différentes bandes localisées dans les spectres IRTF de différents extraits (soxhlet, macération) ont été regroupées dans le tableau **IV.3** suivant.

**Tableau IV. 3**. Principales bandes IRTF présentes dans les deux extraits (macération, soxhlet) et leurs attributions

| **Fréquence ($cm^{-1}$)** | **Attribution et description des modes vibrationnels** | **Références** |
|---|---|---|
| 3700-3100<br><br>centered at 3390 | νOH (*broad*): polyphenol + glucopyranosidic ring (*inter*- and *intra*-molecular hydrogen bonds) | [41-43] |
| 2942 | νCH intracyclic in glucopyranosidic ring | [51] |
| 2850 | $\nu_s CH_2$: side chain in glucopyranosidic ring ($\nu_{as}CH_2$: at 2923 $cm^{-1}$ hidden by the 2942 $cm^{-1}$ band) | [44] |
| 1740 | νC=O (*strong*): conjugate carbonyl in esterifed phenolic acids (gallagyl skeleton: Ar-CO-O-Ar) | [40] |
| 1720 | νC=O (*strong*): conjugate carbonyl in esterifed phenolic acids (ellagyl nucleus: Ar-CO-O-Ar) | [40,41,53] |
| 1710 | νC=O (*strong*): conjugate carbonyl in esterifed phenolic acids (gallyl skeleton: Ar-CO-O-sugar) | [44] |
| 1609 and 1510 | $\nu C_{ar}=C_{ar}$ (*strong*): polar aromatic bond of phenol with high richness (ellagyl, gallagyl, gallyl groups | [40-42,44] |
| 1448 | $\delta_{as}CH_2$ (*scissoring*): side chain of pyranose ring; | [41,50,53] |
| 1365 | δC-H intracyclic of carbohydrate (hidden by *strong* bands of νC-O-C of sugar acetal and δC-CO-O angular bending of ester group | [41,42,52] |
| 1319 | $\delta_s CH_2$ (*wagging*) : side chain of glucosidic ring or rocking | [41,43,48,55] |
| 1221 | $\nu C_{ar}$-O in aromatic ring linked to hydroxyl group (ellagyl, gallagyl and gallyl nuclei) | [41] |
| 1181 | $\nu_{as}$C-O-C: bridge of *β*-glycosidic linkage in pyranose ring | [43,48,50,45,56] |
| 1158, 1108, | νC-O : characteristic of anomer β-D-glucose | [47] |
| 1145, 1072, | νC-O : characteristic of anomer α-D-glucose | [47] |
| 1108 | νC-OH (very *strong*): fingerprint of carbohydrates (glucosidic ring) | |
| 1040 | νC-OH (very *strong*): fingerprint of carbohydrate (C-O of anomers α- + β-D-glucose) | [41,46,59] |
| 999 | νC-O: axial bond in anomeric carbon of glucopyranose (anomer α) | [47] |

| | | |
|---|---|---|
| 896 | C-H (shoulder): deformation of glucose characteristic of β-1,4-glycosidic bond | [16] |
| 875 | γC-$H_{ar}$: fingerprint of substituted aromatic (1 isolated $CH_{ar}$ *i.e*. pentasubstituted aromatic : typical ellagyl, gallagyl, gallyl nuclei) | [44,45] |
| 746 | $\delta_{oop}$C-$H_{ar}$ and/or δO-C-O of carbohydrate | [44-46] |
| 820-700 | $\delta_{oop}$O-H (*large*): carbohydrate et phénols | |

v : *mode de vibration d'élongation,* vas : *vibration d'élongation asymétrique,*
vs : *vibration d'élongation symétrique,* $\delta$ : *mode de déformation dans le plan,*
δas : *vibration de déformation asymétrique,*
δs : *vibration de déformation symétrique,*
γ : mode de déformation hors plan, r : vibration de rocking,
δoop : vibration de déformation hors plan.

Les deux techniques analytiques combinées (IRTF et UV) ont montré une complémentarité dans les résultats obtenus, informant aussi bien sur les différents groupements fonctionnels caractérisant les constituants présents (IR), que sur les fragments de différents squelettes constituant les structures moléculaires (chromophores : UV), et ont permis à la fin de discriminer entre les composés trouvés dans chacun des deux types d'extraits (soxhlet, macération), tout en renseignant sur la méthode d'extraction la plus efficace. Les résultats issus de la spectroscopie IRTF concordent bien avec les données obtenues par spectrophotométrie UV-vis.

## Références

[1] M.I. Gil, F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. 48, 4581–4589, **2000**.

[2] Amyrgialaki, D. P. Makris, A. Mauromoustakos, & P. Kefalas. Optimisation of the extraction of pomegranate (Punica granatum) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, *59*, 216-222, **2014**.

[3] D. Z. Lantzouraki, V. J. Sinanoglou, P. G. Zoumpoulakis, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Soković,... & C. Proestos. Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (Punica granatum L.) juices from different cultivars: a comparative study. *Rsc Advances*, *5*(4), 2602-2614 , **2015**.

[4] F. J. Mininel, C. S. Leonardo Junior, L. G. Espanha, F. A. Resende, E. A. Varanda, C. Q. F. Leite,... & L. C. dos Santos. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from Terminalia catappa Linn.(Combretaceae) and their mutagenic activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**.

[5] B. A. Wafa, M. Makni, S. Ammar, L. Khannous, A. B. Hassana, M. Bouaziz,... & R. Gdoura. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety Punica granatum L. extracts against Salmonella enterica (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International journal of food microbiology*, *241*, 123-131, **2017**.

[6] E. Amyrgialaki, D. P. Makris, A. Mauromoustakos, & P. Kefalas . Optimisation of the extraction of pomegranate (Punica granatum) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, *59*, 216-222, **2014**.

[7] F. Imperatori, G. Barlozzari, A. Scardigli, A. Romani, G. Macrì, N. Polinori,... & L. Santi. Leishmanicidal activity of green tea leaves and pomegranate peel extracts on L. infantum. *Natural product research*, *33*(24), 3465-3471, **2019**.

[8] R. Garcia-Villalba, J. C. Espín, K. Aaby, C. Alasalvar, M. Heinonen, G. Jacobs,... & S. Saha. Validated method for the characterization and quantification of extractable and nonextractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(29), 6555-6566, **2015**.

[9] R. Boggia, M. C. Casolino, V. Hysenaj, P. Oliveri, & P. Zunin, . A screening method based on UV–Visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food chemistry*, *140*(4), 735-741, **2013**.

[10] H. M. Díaz-Mula, F. A. Tomás-Barberán, & R. García-Villalba. Pomegranate fruit and juice (cv. Mollar), rich in ellagitannins and anthocyanins, also provide a significant content of a wide range of proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *67*(33), 9160-9167, **2019**.

[11] S. Kharchoufi, L. Parafati, F. Licciardello, G. Muratore, M. Hamdi, G. Cirvilleri, C. Restuccia, Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce Penicillium digitatum postharvest decay of oranges. *Food microbiology*, *74*, 107-112, **2018**.

[12] A. Masci, A. Coccia, E. Lendaro, L. Mosca, P. Paolicelli, & S. Cesa. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food chemistry*, *202*, 59-69, **2016**.

[13] E.C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, L. Noguera-Artiaga, M. Kačániová, F. Hernández-García, J.L. Cárdenas-López, A. A. Carbonell-Barrachina. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar, Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(3) , 802-810, **2017**.

[14] J. Živković, K. Šavikin, T. Janković, N. Ćujić, & N. Menković, . Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, *194*, 40-47, **2018**.

[15] S. Madrigal-Carballo, G. Rodriguez, C. G. Krueger, M. Dreher, & J. D. Reed . Pomegranate (Punica granatum) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of Functional Foods*, *1*(3), 324-329, **2009**.

[16] D. Xie, T. Gan, C. Su, Y. Han, Z. Liu, Y. Cao, Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble lignin-carbohydrate complexes (LCCs) isolated from wheat straw. *International Journal of Biological Macromolecules*. 161, 315-324, **2020.**

[17] G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, C. Vieillescazes, Characterization of madder and garancine in historic French red materials by liquid chromatography-photodiode array detection, J. Cult. Herit., 12, 98-104, **2011**.

[18] P.M. Paarakh, D.C. Sreeram, S. Shruthi, P.S.S. Ganapathy, A. Vedamurthy, Activité antiproliférative in vitro et in silico de la rubiadine isolée des racines de Rubia cordifolia. MJPMS 5 , 20-23, **2016**.

[19] S.C.N. Montoya, L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albesa, G.A. Argüello, J.L. Cabrera, Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production, J Photoch Photobio B**,** 78 , 77-83 , **2005**.

[20] P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, A.M. Carvalho, M.C. Sa´nchez-Mata, M. Camara, V. Ferna´ndez-Ruiz, M. Pardo-de-Santayana, J. Tardıo, Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. LWT Food Sci Technol 55:389–396, **2014**.

[21] L. Grauso, S. Emrick, G. Bonanomi, & V. Lanzotti. Metabolomics of the alimurgic plants Taraxacum officinale, Papaver rhoeas and Urtica dioica by combined NMR and GC–MS analysis. *Phytochemical Analysis*, *30*(5), 535-546, **2019**.

[22] J. Castillo, J. Hung, M. Rodriguez, E. Bastidas, I. Laboren, A. Jaimes, LED fluorescence spectroscopy for direct determination of monoamine oxidase B inactivation. *Analytical biochemistry*, *343*(2), 293-298, **2005**.

[23] Q.Q. Chen, W.B. Liu, M. Zhou, Y.J. Dai, C. Xu, H.Y. Tian, W.N. Xu, W. Effects of berberine on the growth and immune performance in response to ammonia stress and high-fat dietary in blunt snout bream Megalobrama amblycephala. *Fish & Shellfish Immunology*, *55*, 165-172, **2016**.

[24] M. A. Hijazi, A. El-Mallah M. Aboul-Ela, & A. Ellakany. Evaluation of analgesic activity of Papaver libanoticum extract in mice: involvement of opioids receptors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**.

[25] D.X. Hou, X. Tong, N. Terahara, D. Luo, M. Fujii,. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen

species-mediated mitochondrial pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics 440, 101–109, **2005.**

[26] I. C. Rodríguez-Medina, R. Beltrán-Debón, V. M. Molina, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, J. A. Menendez,... & A. Fernández-Gutiérrez. Direct characterization of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of separation science*, *32*(20), 3441-3448, **2009**.

[27] S. Nuryanti, & D. J. Puspitasari. Rosella (Hibiscus sabdariffa) Flowers as Alternative Indicators of Blue and Red Litmus. *Oriental Journal of Chemistry*, *35*(1), 476-480, **2019**.

[28] P. Maisuthisakul. Phenolic constituents and antioxidant properties of some Thai plants. *Phytochemicals-A Global Perspective of their role in Nutrition and Health, Venketeshwer Rao, Editor. In Tech Croatia*, 187-212, **2012**.

[29] K. Dettlaff, M. Stawny, M. Ogrodowczyk, A. Jelińska, W. Bednarski, D. Wątróbska-Świetlikowska,... & J. Jankun. Formulation and characterization of EGCG for the treatment of superficial bladder cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, *40*(2), 329-336, **2017**.

[30] A. Karioti, M. Sokovic, A. Ciric, C. Koukoulitsa, A. R. Bilia, & H. Skaltsa. Antimicrobial properties of Quercus ilex L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(12), 6412-6422, **2011**.

[31] R. Ferreira-Nunes, T.Angelo, S. M. M. da Silva, P. O. Magalhães, T. Gratieri, M. S. S. da Cunha-Filho, & G. M. Gelfuso. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. *Biomedical Chromatography*, *32*(2), e4062, **2018**.

[32] H. Meziti, H. Bouriche, S. Kada, I. Demirtas, M. Kizil, A. Senator, "Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex L. and Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7 (4), 260-272, **2019**.

[33] K. Dhaouadi, W. Meliti, S. Dallali, M. Belkhir, S. Ouerghemmi, H. Sebei, & S. Fattouch. Commercial Lawsonia inermis L. dried leaves and processed powder: Phytochemical composition, antioxidant, antibacterial, and allelopathic activities. *Industrial Crops and Products*, *77*, 544-552, **2015**.

[34] M. Makarska-Bialokoz et al., Computational Analysis of Chlorophyll Structure and UV-vis Spectra: A Student Research Project on the Spectroscopy of Natural Complexes. *Spectroscopy Letters* 47, 147-152. DOI: 10.1080/00387010.2013.781038**, 2014.**

[35] S Elavarasan and M Gopalakrishnan, Synthesis, structural analysis, theoretical studies of some lawsone derivatives. Spectrochim. Acta A, 133, 1-6, 2014.

[36] D K Singh, S Luqman and A K Mathur, Lawsonia inermis L.–A commercially important primaeval dying and medicinal plant with diverse pharmacological activity, Ind. Crops Prod., *65*, 269-286, **2015**.

[37] S. Ali, T. Hussain, R. Nawaz, Optimization of alkaline extraction of natural dye from Henna leaves and its dyeing on cotton by exhaust method. *Journal of cleaner production*, *17*(1), 61-66, **2009**.

[38] M. R. Bhuiyan, A. Islam, A. Ali, M.N. Islam, Color and chemical constitution of natural dye henna (Lawsonia inermis L) and its application in the coloration of textiles. *Journal of Cleaner Production*, *167*, 14-22, **2017**.

[39] I. Ebrahimi, & M. Parvinzadeh Gashti. Extraction of polyphenolic dyes from henna, pomegranate rind and Pterocarya fraxinifolia for nylon 6 dyeing. Color Technol. 132(2): 162-176, **2016**.

[40] A. Boukir, E. Aries, M. Guiliano, L. Asia, P. Doumenq, & G. Mille. Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. *Chemosphere*, *43*(3), 279-286, **2001**.

[41] A. Boukir, I. Mehyaoui, S. Fellak, L. Asia, P. Doumenq, The effect of the natural degradation process on the cellulose structure of Moroccan hardwood fiber: A survey on spectroscopy and structural properties, Mediter. J. Chem., 8 , 179-190, **2019**.

[42] J. Zhicheng, Y. Jian, L. Jianmei, H. Ting, H. ChangweiPromoting effect of sodium chloride on the solubilization and depolymerization of cellulose from raw biomass materials in water ChemSusChem, 8 ,1901-1907, **2015**.

[43] C.M. Popescu, P. Gradinariu, M.C. PopescuStructural analysis of lime wood biodegraded by white rot fungi through infrared and two dimensional correlation spectroscopy, J. Mol. Struct., 1124 ,78-84 ,**2016.**

[44] A., Boukir, M. Guiliano, P. Doumenq, A. El Hallaoui, & G. Mille. Caractérisation structurale d'asphaltènes pétroliers par spectroscopie infrarouge (IRTF). Application à la photo-oxydation. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, *1*(10), 597-602, **1998**.

[45] M. Guiliano, A. Boukir, P. Doumenq, G. Mille, C. Crampon, E. Badens, G. Charbit, Supercritical fluid extraction of bal 150 crude oil asphaltenes. *Energy & fuels*, *14*(1), 89-94, **2000**.

[46] L. Hajji, A. Boukir, J. Assouik, S. Pessanha, J. L. Figueirinhas, & M. L. Carvalho. Artificial aging paper to assess long-term effects of conservative treatment. Monitoring by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), and energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). *Microchemical Journal*, *124*, 646-656, **2016**.

[47] I. Noda, Two-dimensional correlation and codistribution spectroscopy (2DCOS and 2DCDS) analyses of time-dependent ATR IR spectra of D-glucose anomers undergoing mutarotation process in water. Spectrochimica Acta Part A 197 , 4-9, **2018**.

[48] L. Hajji, A. Boukir, J. Assouik, A. Kerbal, M. Kajjout, P. Doumenq, M.L. De Carvalho, A Multi-Analytical Approach for the Evaluation of the Efficiency of the Conservation–Restoration Treatment of Moroccan Historical Manuscripts Dating to the 16th, 17th, and 18th Centuries. *Applied Spectroscopy*, *69*(8), 920-938, **2015**.

[49] A. Boukir, S. Fellak, P. Doumenq, Structural Characterization of Argania Spinosa, Moroccan Wooden Artifacts during natural degradation progress using Infrared, Spectroscopy (ATR-FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). Heliyon 5, e02477, **2019.**

[50] A. Boukir, S. Fellak, Y. Bouramdane, A. Romane, S. Chakroune, Structural Elucidation of Lignocellulose Fibers Constituents of Recent and Aged Moroccan Cedar Softwood: Monitoring by Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) and X-ray Diffraction (XRD). Heliyon under revision, **2020**.

[51] B. Schindler, L. Barnes, G. Renois, A.R. Allouche, I. Compagnon, Anomeric memory of the glycosidic bond upon fragmentation and its consequences for carbohydrate sequencing. Nature Communications 8 ,973, **2017**.

[52] D. Tamburini, J. J. Łucejko, M. Zborowska, F. Modugno, W. Prądzyński, & M. P. Colombini. Archaeological wood degradation at the site of Biskupin (Poland): Wet chemical analysis and evaluation of specific Py-GC/MS profiles. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *115*, 7-15, **2015**.

[53] S. Durmaz, Ö. Özgenç, İ. H. Boyacı, Ü. C. Yıldız, & E. Erişir. Examination of the chemical changes in spruce wood degraded by brown-rot fungi using FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, *85*, 202-207, **2016**.

[54] S. Acharya, Y. Hu, H. Moussa, & N. Abidi. Preparation and characterization of transparent cellulose films using an improved cellulose dissolution process. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(21), **2017**.

[55] X. Huang, D. Kocaefe, Y. Kocaefe, Y. Boluk, & A. Pichette. Study of the degradation behavior of heat-treated jack pine (Pinus banksiana) under artificial sunlight irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, *97*(7), 1197-1214, **2012**.

[56] M. Traoré, J. Kaal, & A. M. Cortizas. Differentiation between pine woods according to species and growing location using FTIR-ATR. *Wood science and technology*, *52*(2), 487-504, **2018**.

[57] M. Schwanninger, J.C. Rodrigues, H. Pereira, B. Hinterstoisser, Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy*, *36*(1), 23-40, **2004**.

[58] Y. Song, J. Zhang, X. Zhang, T. Tan, The correlation between cellulose allomorphs (I and II) and conversion after removal of hemicellulose and lignin of lignocellulose. *Bioresource technology*, *193*, 164-170, **2015**.

[59] Z. Ling, T. Wang, M. Makarem, Effects of ball milling on the structure of cotton cellulose. *Cellulose* 26, 305–328, **2019**.

[60] H. Melkonyan, K. Sloyan, M. Odeh, I. Almansouri, M. Chiesa, M.S. Dahlem, Embedded parabolic fiber lens for efficient fiber-to-waveguide coupling fabricated by focused ion beam. *Journal of Physics: Photonics*, *1*(2), 025004, **2019**.

# Chapitre 5 : Evaluation d'activités antioxydantes et détermination des propriétés biologiques

## *I. Activités antioxydantes*

Les plantes aromatiques et médicinales contiennent une large variété d'antioxydants d'origine naturelle permettant de protéger et préserver leurs intégrités physiques et métaboliques ainsi que leurs hérédités. Bon nombre d'extraits de plantes contenant des composés phénoliques jouent un rôle très important dans la modération des effets du processus de vieillissement de la peau en limitant les conséquences biochimiques dues à la fois au phénomène d'oxydation et à d'autres effets néfastes.

Dans ce chapitre, l'activité antioxydante des extraits méthanoliques (macération, soxhlet) dérivant de six plantes différentes (12 échantillons) a été évaluée en exploitant les trois tests suivants: capacité antioxydante totale (CAT), piégeage des radicaux libres par le biais du 2,2-diphényl-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$), et enfin, le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP). Les activités antibactériennes ont été aussi déterminées en utilisant les deux méthodes de diffusion de disque pour calculer les diamètres des zones d'inhibition, et celle des puits (microdilution) pour évaluer les concentrations minimales inhibitrices CMI et bactéricides CMB, sur six types de bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus, Kliebsella pneumonia, Enterococcus feacalis, Escherichia coli, Salmonella sp, et enfin le Listeria monocytogenes* p.

### *I.1. Capacité antioxydante totale (CAT)*

La capacité antioxydante totale (CAT) a été mesurée à partir de la courbe d'étalonnage (Fig. V.1) et dont l'acide gallique est pris comme référence. La CAT est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique (mg GAE/g MS). Contrairement à d'autres tests, la CAT permet aussi bien la quantification de l'activité antioxydante des polyphénols présents que l'apport d'autres composés antioxydants (comme les vitamines (C, E, etc).

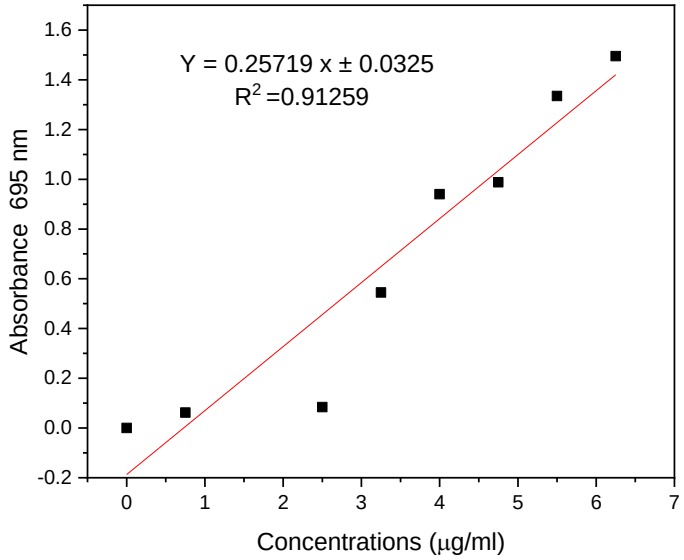



**Figure V.1**. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pris comme référence pour la détermination de la capacité antioxydante totale (absorbance déterminée à 695 nm).

La capacité antioxydante totale (CAT) a été testée sur chacun des extraits méthanoliques (macération et soxhlet) appartenant à six plantes différentes (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*) et dont les résultats sont consignés dans le tableau V.1.

**Tableau V.1.** Résultats de la capacité antioxydante totale de deux types d'extraits méthanoliques (macération et soxhlet) issus de six plantes différentes (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*).

| Plantes étudiées | *CAT de l'*extrait par macération (mg GAE/g MS) | *CAT de l'e*xtrait par soxhlet (mg GAE/g MS) |
|---|---|---|
| *Punica. g.* | **85.03**±1.13 | **156**±0.89 |
| *Rubia. t.* | 67.47 ± 0.87 | 91.08 ± 0.79 |
| *Papaver r.* | 45.17 ± 1.08 | 67.74 ± 1.37 |
| *Hibiscus s.* | 38.87 ± 1.17 | 57.05 ± 0.83 |
| *Quercus i.* | **97.23** ± 0.73 | **187.15** ± 1.45 |
| *Lawsonia i.* | 51.46 ± 0.78 | 78.61 ± 0.98 |

*CAT:* capacité antioxydante totale

Il est à noter que les différents extraits méthanoliques obtenus par soxhlet représentent la capacité antioxydante totale la plus élevée une fois comparés à ceux obtenus par macération.

Le *Quercus ilex* présente la capacité antioxydante totale la plus importante par rapport aux six autres extraits de plantes, ceci est valable dans le cas des deux types d'extraits méthanoliques: macération (97.23 ± 0.73 mg EAG/g de la matière sèche) et soxhlet (187.15 ± 1.45 mg EAG/g de la matière sèche). Il est suivi des extraits méthanoliques de *Punica granatum* dont les teneurs sont aussi relativement importantes et correspondent à 85.03±1.13 mg EAG/g (macération) et 156±0.89 mg EAG/g (soxhlet).

Quant aux extraits de *Rubia tinctorum*, ils ont révélé la présence des teneurs respectives suivantes : 67.47 ± 0.87 et 91.08 ± 0.79 mg EAG/g dans le cas des extraits par macération et par soxhlet. Les capacités relativement moins importantes ont été rapportées dans le cas des extraits de *Papaver rhoeas* avec des taux de 45.17±1.08 mg EAG/g dans le cas de la macération et 67.74±1.37mg EAG/g pour l'extrait au soxhlet. La capacité moyenne a été montrée dans le cas des extraits de *Lawsonia inermis* avec des teneurs de 51.46 ± 0.78 mg EAG/g dans l'extrait par macération et 78.61 ± 0.98 mg EAG/g dans le cas du soxhlet. Enfin, il est à signaler que les deux types d'extraits d'*Hibiscus sabdareiffa* présentent les capacités antioxydantes les plus faibles de toutes les plantes étudiées avec des valeurs respectives de 38.87±1.17 mg EAG/g (macération) et 57.05±0.83 mg EAG/g (soxhlet).

### ***I.****2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH·)*

La présence des constituants phénols et flavonoïdes ainsi que d'autres éléments tels que les tanins confèrent un pouvoir antioxydant aux extraits méthanoliques des différentes plantes étudiées contre le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH·). L'activité antioxydante des différents extraits a été étudiée en surveillant la réduction du radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH·) de couleur violette en couleur jaune (DPPH-**H** : fixation du proton) justifiant ainsi le déroulement de la réaction. Les résultats ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV à la longueur d'onde de 517 nm [1].

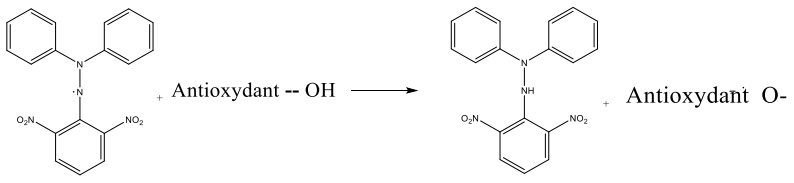



**Figure V.2.** Réaction entre les extraits riches en polyphénols (antioxydants) et le radical 2,2-diphénylpicryl-hydrazyl (DPPH·)



**Figure V.3**. Variation de la coloration du DPPH· dans différentes concentrations des extraits des plantes.

Les résultats des activités antiradicalaires (CI50) lors du piégeage du radical en utilisant le test DPPH· avec différents extraits méthanoliques dérivant de six plantes et obtenus par macération et soxhlet sont regroupés dans le tableau V.2 suivant.

**Tableau. V.2.** Activité antiradicalaire (**CI50**) avec test DPPH· de deux types d'extraits méthanoliques (macération, soxhlet) appartenant aux six plantes suivantes: *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*

| Plantes étudiées | CI50/DPPH· (mg/ml) de l'extrait par macération | CI50/DPPH· (mg/ml) de l'extrait au soxhlet |
|---|---|---|
| *Punica g.* | 0,78 ±0.31 | 0.65 ±0.27 |
| *Rubia t.* | 0.92 ± 0,5 l | 0.71 ± 0,0 l |
| *Papaver r.* | 4.97 | 3.81 |
| *Hibiscus s.* | 0.67 ± 0,12 | 0.35 ± 0,08 |
| *Quercus i.* | 1.19 ± 0.24 | 0.75 ± 0,1 |
| *Lawsonia i.* | 0.94 ± 0.15 | 0.49 ±0.07 |
| BHT | 2.029 ±0.09 | |
| Vitamine E | 3.50 ±0.26 | |
| Acide ascorbique | 0.42 ±0.05 | |

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ; CI50 est la concentration d'inhibition à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; Vitamine E : α-tocophénol ; BHT : hydroxytoluène t-butylé.

D'après le tableau V.2, les meilleurs résultats de l'activité antiradicalaire (CI50) ont été corrélés à l'extraction par soxhlet et dont les valeurs obtenues sont moins élevées que celles de la macération.

Dans le cas de *Punica granatum,* l'activité antioxydante correspondante aux deux types d'extraits méthanoliques (macération et soxhlet) est manifestée par les deux valeurs respectives suivantes : 48,45 et 72,14%. Les deux extraits méthanoliques de grenade (macération, soxhlet) ont été dotés d'une capacité antioxydante intéressante par rapport à celle de l'acide ascorbique (standard) correspondant à la valeur de 0,14 mg/ml. L'activité antiradicalaire (CI50) de l'extrait de soxhlet représente la valeur la moins élevée atteignant 0.65 ±0.27 mg/ml au lieu de 0,78 ±0.31 mg/ml dans le cas de l'extrait macéré. Les meilleurs résultats ont été attribués à la méthode par soxhlet. En ce qui concerne les extraits de *Rubia tinctorum,* l'activité de piégeage des radicaux libres la plus élevée a été obtenue à partir de l'extrait méthanolique par soxhlet avec la valeur de CI50 de 0.71 ± 0,0 l mg/ml, suivie de l'extrait par macération (0.92 ± 0,51 mg/ml) a montré une activité de piégeage des radicaux plus élevée que les composés de référence BHT et vitamine E (CI50 = 2.029 ±0.09 et 3.50 ±0.26 mg/ml respectivement) et moins élevée par rapport à l'acide ascorbique (CI50 = 0.42 ±0.05 mg/ml). Les résultats de tableau V. 2. ont révélé que les extraits de *Papaver rhoeas* présentaient un pouvoir antiradicalaire de 4.97 et 3.81 mg/ml pour les deux extraits par macération et soxhlet, respectivement. Quant aux extraits d'*Hibiscus sabdareiffa*, l'effet antioxydant examiné était moins important dans le cas de la macération (0.67 ± 0,12 mg/ml) qu'en soxhlet (0.35 ± 0,08 mg/ml), tandis que le pouvoir radicalaire $DPPH^{\cdot}$ du *Quercus ilex* était le meilleur avec des valeurs respectives de 1.19 ± 0.24 et 0.75 ± 0,1 mg/ml. Concernant les extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* par macération et soxhlet, les taux respectifs obtenus sont de l'ordre de 0.94 ± 0.15 et 0.49 ±0.07 mg/ml, et dont le piégeage des radicaux libres n'ont pas montré de différences significatives.

### ***I.****3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)*

Le test FRAP est basé généralement sur la capacité des composés phénoliques à réduire le complexe ferrique (tripyridyltriazine : $Fe^{III}$-TPTZ) de couleur jaune en complexe ferreux ($Fe^{II}$-TPTZ) de couleur bleu par action d'antioxydants donneurs d'électrons (Benzie et al. 1999, Oktay et al. 2003) [1,2]. La couleur bleue résultante a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre UV à la longueur d'onde 593 nm, est considérée comme linéairement liée à la capacité de réduction totale des antioxydants donneurs d'électrons.

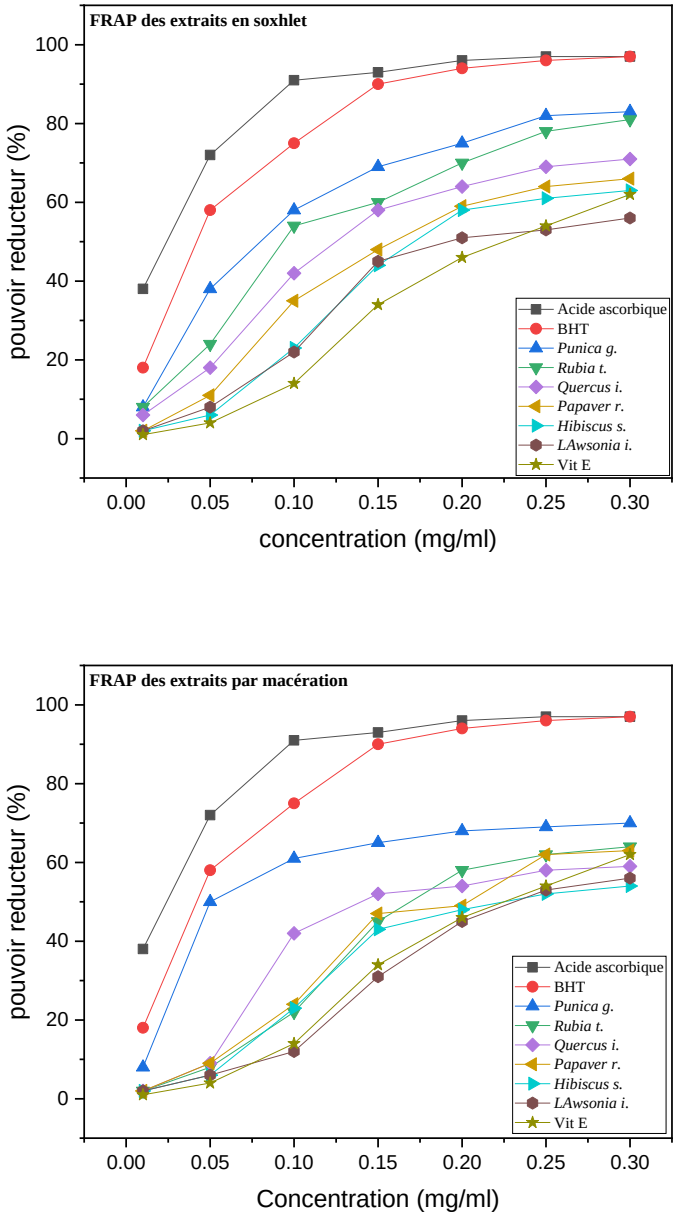



**Figure V.4.** Test **FRAP** : Evolution du pouvoir réducteur (FRAP) en fonction des concentrations des extraits méthanoliques issus des six plantes suivantes : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*

Les résultats des concentrations efficaces (CE50) lors de la réduction des ions ferriques avec différents extraits méthanoliques dérivant de six plantes (obtenus par macération et soxhlet) sont regroupés dans le tableau V.3 suivant.

**Tableau. V.3.** Concentrations efficaces **(CE50)** des extraits méthanoliques (macération et soxhlet) issus des six plantes suivantes : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i*.

| Plantes étudiées | CE50/FRAP (mg/ml) de l'extrait par macération | CE50/FRAP (mg/ml) de l'extrait par soxhlet |
|---|---|---|
| *Punica g.* | 0.051±0.02 | 0.08 ±0.12 |
| *Rubia t.* | 0.183 ± 0.07 | 0.097 ± 0.01 |
| *Papaver r.* | 0.208 ± 0.02 | 0.158 ± 0.07 |
| *Hibiscus s.* | 0.246 ± 0.08 | 0.172 ± 0.01 |
| *Quercus i.* | 0.149 ± 0.01 | 0.126 ± 0.00 |
| *Lawsonia i.* | 0.227 ± 0.07 | 0.195 ± 0.07 |
| BHT | 0.043 ±0.31 | |
| Vitamine E | 0.226 ±0.56 | |
| Acide ascorbique | 0.025±1.05 | |

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± standard de déviation ; CE50 est la concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0.5 ; Vit E : α-tocophénol ; BHT : hydroxytoluène t-butylé.

Par analogie avec la capacité antiradicalaire, les concentrations efficaces (CE50) des deux types d'extraits méthanoliques ont révélé une variabilité significative, due principalement à la procédure d'extraction utilisée (tableau V.3).

L'activité la plus importante était montrée dans le cas des deux extraits méthanoliques de *Quercus i.* : macération avec 0.149 ± 0.01 mg/ml et soxhlet avec 0.126 ± 0.00 mg/ml. En effet l'extrait par soxhlet de *Punica g.* présente une valeur plus importante en concentration efficace (0.08 ±0.12 mg/ml) que celle obtenue par macération (0.051±0.02 mg/ml). Ces valeurs reflètent la capacité de ces deux types d'extraits à réduire les ions ferrique $Fe^{3+}$ en $Fe^{2+}$. Dans le cas de l'extrait au soxhlet de *Rubia t.*, l'activité affichée (0.097 ± 0.01 mg/ml) était plus importante que celle trouvée par macération (0.183 ± 0.07 mg/ml). Quant aux extraits de *Papaver r.*, le pouvoir réducteur examiné était moins important dans le cas de la macération (0.246 0.208 ± 0.08 mg/ml) qu'en soxhlet (0.158 ± 0.07 mg/ml). Cependant dans le cas de *l'Hibiscus s.*, ce pouvoir était très important justifié par les valeurs respectives de 0.246 ± 0.08 et 0.172 ± 0.01 mg/ml dans les extraits de macération et de soxhlet. Concernant la plante *Lawsonia i.*, la capacité antioxydante de l'extrait au soxhlet était plus importante (0.195 ± 0.07 mg/ml) que celle de l'extrait macéré (0.227 ± 0.07 mg/ml).

Enfin, il est à noter que les extraits des six plantes étudiées ont montré une activité de réduction ferrique plus élevée que le composé de référence qui est la vitamine E (CE50 = 0.226 ±0.56 mg/ml), mais moins élevée par rapport à l'antioxydant synthétique BHT (CE50 = 0.043 ±0.31 mg/ml) et l'acide ascorbique (CE50 = 0.025±1.05 mg/ml).

**Evaluation d'activités antioxydantes et détermination des propriétés biologiques**

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des six différentes plantes (macération et soxhlet) a été évaluée par les trois tests décrits auparavant. Ces derniers ont montré une activité antioxydante très importante.

Les activités antioxydantes présentées dans les tableaux V.1, V.2 et V.3 sont très significatives, par la corrélation des résultats trouvés dans l'extrait de *Punica g.* on trouve des résultats significatifs par rapport à celles obtenues par Ilham Hamid et al. [3] dans le cas des extraits de grenade du Maroc (31,16 à 66,82%), et sont comparables à celles trouvées par Khalil et al. [4] dans le cas des variétés de grenade du Pakistan (63,36 à 78,23%).

Il est à noter que nos résultats sont beaucoup plus intéressants que ceux rapportés par Kanatt et al. (4,9 µg/ml) [5], Doostan et al. (27 µg/ml) [6], Shishavan et al. (15 µg/ml) [7] et Nelson et al. (38,70 µg/ml) [8]. Il est connu qu'une faible concentration de CI50 conduira à une activité antioxydante plus forte. Ces valeurs reflètent la capacité de ces extraits à réduire les ions ferrique $Fe^{3+}$. Cette dernière est plus importante que celle trouvée par Zeghad et al. en 2019 et dont la valeur est de 2.61±0.02 mg/ml. Quant aux écorces de grenade considérées comme déchet [9], les valeurs les plus élevées obtenues informent sur leurs richesses en antioxydants et peuvent être ainsi considérées comme une source d'antioxydants naturels.

Les résultats du pouvoir réducteur obtenus en utilisant le test FRAP étaient similaires à ceux de l'essai de piégeage des radicaux libres en utilisant le test $DPPH^{\cdot}$. L'extrait méthanolique du soxhlet présentait des valeurs d'absorption en UV supérieures à celles de l'extrait par macération en travaillant avec les mêmes concentrations. Les valeurs de la CE50 (Tableau V.3) indiquent que l'extrait au soxhlet de *Rubia tinctorum* (0.097 ± 0.01 mg/ml) présentait une activité très importante que celle trouvée par Essaidi et al. 2017 dans le cas des deux extraits de *Rubia t.* non hydrolysé (244.50 ± 0.03 mg/ml) et hydrolysé (63.20 ± 0.01 mg/ml), comparable à l'acide ascorbique et meilleur que vitamine E synthétique [10]. Les valeurs d'absorbance plus élevées donnent une capacité antioxydante plus importante car la valeur FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique, où les antioxydants sont l'agent réducteur. Les antioxydants sont des composés capables de donner un seul électron ou atome d'hydrogène pour la réduction (Rabeta et NurFaraniza, 2013) [11]. Une recherche précédente a démontré l'importante capacité de la *Rubia t.* à réduire l'ion ferrique (Siva et al., 2011) [12]. En se basant sur les résultats obtenus, la présence de fortes teneurs en phénol et flavonoïdes se sont bien corrélées à une importante activité antioxydante. *Rubia tinctorum* espèce comme *Rubia cordifolia* contient une grande variété d'antioxydants tels que l'alizarine qui fait partie

des plus puissants antioxydants appartenant à la famille des anthraquinones (Cai et al., 2004) [13], les hydroxyles d'anthraquinones et rubiadin ont été utilisés dans divers médicaments. Les groupements hydroxyles portés par le composé aromatique (benzène) de la structure anthraquinonique étaient essentiels pour que les anthraquinones hydroxylées montrent une structure de type *ortho*-dihydroxy (de type catechol) permettant d'améliorer leur l'effet, et la glycosylation une activité réduite (Priya et Siril, 2014) [14], c'est la raison pour laquelle il est utilisé à la fois comme antioxydant et colorant dans les aliments (Jeremic' et al., 2014) [15] ou pigment de textiles et tableaux d'arts.

Il a été rapporté que la capacité de piégeage des radicaux libres par des substances antioxydantes, notamment celles que l'on trouve dans les fleurs de certaines espèces, est très importante. En revanche, l'extrait par soxhlet de *Papaver r.* avait une teneur plus élevée en composés polyphénoliques par rapport à celle extrait par ainsi que des capacités antioxydante très importante, ceci a été confirmé lors de l'utilisation des essais de type CAT, FRAP et radical DPPH. Ces études prouvent que les fleurs de *Papaver r.* peuvent constituer un instrument plus efficace contre les radicaux libres de l'oxygène dans l'organisme ce qui est était confirmé par Hasplova et al., (2011) [16], dans leur évaluation du potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique des fleurs de *Papaver r.* avec un pouvoir d'inhibition d'environ 60 % de la DPPH, ce qui est comparable aux valeurs obtenues dans cette étude. Des paramètres plus élevés ont été obtenus par Kostic et al. (2010) [17], où l'extrait aqueux de *Papaver r.* a produit une inhibition de 90 %. La différence peut avoir été en raison de la méthodologie ou, plus encore, des concentrations des extraits étudiés et la source du matériel. Les résultats obtenus sont significatifs en comparaison avec les données de la littérature, indiquant respectivement les pourcentages suivants de 60 et 70 %. Des résultats similaires ont été montrés récemment par Katarzyna et al. 2020 [18] dans l'extrait de pétales et dont les taux varient entre 61,5 ±1,3 à 70,3 ± 1,6 µg/mg.

D'après la littérature, l'*hibiscus sabdareiffa* possède des propriétés antioxydantes bénéfiques pour la santé [19, 20]. Ainsi, les résultats de l'activité antioxydante totale CAT, pouvoir de piégeage des radicaux DPPH, et le pouvoir antioxydant de réduction des ions ferriques (FRAP) sont présentés dans les tableaux suivants : V.1, V.2 et V.3. Les tests effectués sur les deux extraits de cet échantillon ont montré la présence d'un effet notable de point de vue activités antioxydantes, qui sont plus importantes que celles trouvées par Tahir et al. 2015 [21] dans le cas d'*Hibiscus* Soudanais, (CAT : 24,50-26,54 mg EAG/100 g ; DPPH% : 70,49-74,11 % ; et FRAP : 137,86 à 140,61 mM$Fe^{2+}$/100 g). Das et al. 2019 [22] ont évalué l'effet

synergique d'extraits de la plante médicinale *Hibiscus sabdareiffa* pour maintenir l'activité antioxydante du thé vert décaféiné provenant de diverses régions de Turquie. Ces auteurs ont montré que dans le cas de l'extrait d'acétate d'éthyle la valeur de DPPH· était de 93,7 ± 4,6 mg/ml et celle du FRAP est de 1240,50 ± 1,2 mmol/g ; d'extrait d'acétate quant à l'extrait à chaud, elle est de 1151,56 ± 2,5 mmol/g [22]. Très récemment Mollah et al. 2020 [ 23] se sont intéressés à l'étude des propriétés antioxydants d'*Hibiscus s.* et ont rapporté les valeurs suivantes de 29060.83 ± 693.06 mg/100 g en utilisant le test de FRAP et de 5039.16 ± 15.63 mg/100 g dans le cas du DPPH·[23]. L'effet antioxydant s'est avéré significatif et dû principalement à l'activité inhérente de divers composés phénoliques présents dans les plantes médicinales (Jafarian 2014) [24] été déterminé dans le chapitre 3. Ces résultats confortent clairement l'activité antioxydante des extraits de fleurs d'*Hibiscus s*. lors de l'utilisation du test FRAP. (Bon pouvoir antioxydant manifesté par la réduction des ions ferriques). La valeur élevée du FRAP dans le cas de l'extrait méthanolique pourrait être corrélée à la présence de la teneur élevée en phénols et ses dérivés, considérés comme principaux constituants de cet extrait. Ainsi, l'*Hibiscus s.* peut agir comme source importante dans l'élimination des radicaux libres.

Les résultats des extraits de *Quercus ilex* obtenus ont montré une efficacité dans l'élimination du DPPH· et la réduction des ions ferriques FRAP. Les inhibitions obtenues étaient meilleures que celles affichées par les antioxydants standards de type : BHA, Vitamine E, et acide ascorbique. L'extrait par macération était moins efficace pour éliminer la que l'extrait en soxhlet. L'activité antioxydante pourrait être corrélée à la présence de composés phénoliques dans les extraits de l'écorce de chêne vert. Ces résultats sont très significatifs lorsqu'ils sont comparés à ceux rapportés par plusieurs études de la littérature au niveau de la même plante (Ouchemoukh et al 2016 ; Meziti et al 2019) [25, 26]. Les deux extraits présentaient un pouvoir réducteur (Fig. V. 3), ce qui est conforme à plusieurs résultats trouvés dans le la littérature [27-29], tandis que Il est à noter que le pouvoir inhibiteur du *Quercus ilex* était très puissant dans l'inhibition de la formation du complexe $Fe^{2+}$-ferrozine. D'après les résultats obtenus des deux échantillons étudiés, on peut noter certaines différences dans leurs activités antioxydantes, qui pourraient être liées aux constituants antiradicalaires contenus dans ces deux types d'extraits.

Concernant les extraits de feuilles de *Lawsonia inermis*, les données expérimentales obtenues ont montré des forts effets antioxydants potentiels en utilisant différents types de tests antioxydants. Ainsi, l'extrait au soxhlet a montré des effets antioxydants plus importants que

ceux obtenus par macération. Dans le cas des feuilles *Lawsonia i*., des activités antioxydantes modérées ont été affichées, et peuvent être corrélées à la présence de polyphénols, tel le cas de l'apigénine 5-glucoside. L'apigénine présente des effets antioxydants in vitro et in vivo, ainsi que des effets anti-mutagènes et anti-inflammatoires, permet l'inhibition du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la diminution du stress oxydatif [30]. Dans le la cas de *Lawsonia i.* de Tunisie, la fraction butanolique a montré de fortes activités antioxydantes attribuées à la présence des glycosides phénoliques, notamment le 1,2,4-trihydroxynaphtalène-1-O-β-d-glucopyranoside [31]. L'analyse par HPLC de l'extrait de *Lawsonia i*. a montré la présence des constituants phénoliques suivants : acide gallique, acide chlorogénique, kaempférol, quercétine, acide ellagique, acide férulique et vanilline [32]. Soobrattee et al. (2005) [33] ont étudié divers polyphénoliques pour la réduction du potentiel dans le test FRAP. L'acide gallique, l'acide ellagique, l'acide chlorogénique, la quercétine, le kaempférol, la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine ont présenté dans une étude de Kumar et al 2016 des valeurs FRAP de 5,25 ; 4,39 ; 3,22; 7,39; 1,95; 2,90 et 2,47 mmol Fe(II)/L respectivement. Selon une autre étude conduite par ….( ?? référence), les feuilles de *Lawsonia i.* de Tunisie ainsi que les extraits aqueux issus des graines ont montré aussi des activités antioxydantes, mais aucun composé actif n'a été identifié [34]. Les extraits aqueux des feuilles de *Lawsonia i.* iranien ont montré diverses activités antioxydantes associées aux écotypes [35]. Les extraits de feuilles de *Lawsonia i.* ont des activités antiprolifératives et cytotoxiques contre différentes cellules cancéreuses. Ces activités ont été corrélées à la composition chimique en polyphénols contenant le rutoside, hyperoside, quercétine, 3-glucuronide de quercétine et l'acide *p*-coumarique. Le rutoside (appelé aussi rutine) présente des activités antiprolifératives et cytotoxiques connues contre différentes cellules cancéreuses [36, 37]. Par conséquent, le potentiel antioxydant de l'huile issue des graines de henné ne peut être utilisé pour promouvoir son utilisation en cosmétiques.

Il ressort de notre étude que la méthode d'extraction par soxhlet est la procédure la plus efficace et pourrait être envisagée pour extraire des antioxydants en plus grande quantité. Une forte corrélation a été observée entre le contenu phénolique important et l'activité antioxydante, ceci a été confirmé par les travaux antécédents de plusieurs auteurs, Staszewski et al. (2011) [38], Deseo et al. 2020 [39], El Moussaoui et al. 2019 [40] et Nardini et al. 2020 [41].

## *II* ***Activités antibactériennes***

L'activité antibactérienne in vitro de deux types d'extraits méthanoliques (macération et soxhlet) issus de six plantes aromatiques médicinales (*Punica granatum L, Rubia tinctoum L., Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonia inermis*) a été évaluée contre six différentes souches pathogènes (Gram-positif et Gram-négatif) et a été testée par la méthode de diffusion de disque en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (tableau V.4), suivie de la méthode de microdilution permettant le calcul de la concentration minimale inhibitrice des extraits contre les différentes souches bactériennes. Les différents extraits testés ont montré une activité antibactérienne significative.

### *II.1. Méthode de diffusion*

Cette étude comprenant l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes étudiées sur six types de bactéries pathogènes, à savoir, *Staphylococcus aureus, Kliebsella pneumonia, Enterococcus feacalis, Escherichia coli, Salmonella sp, et Listeria monocytogenes* par la méthode de diffusion sur milieux gélosés en utilisant la technique des disques. Les résultats de l'évaluation antibactérienne des différents milieux gélosés, sont illustrés dans le tableau V .4.

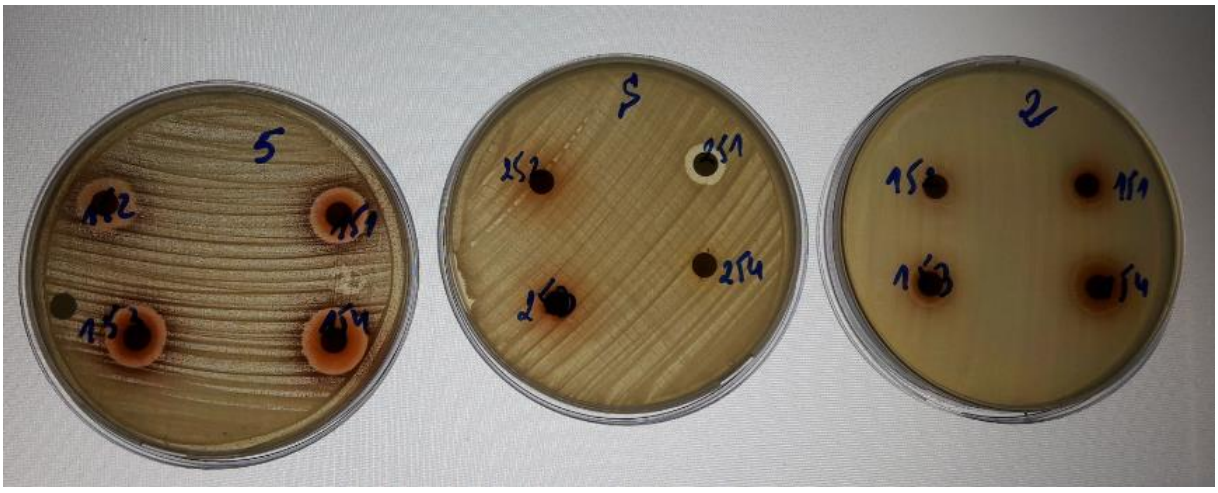


**Figure V.4** Effet des extraits méthanoliques sur la croissance des souches *Staphylococcus aurus* (**5**), *Salmonella sp* (**S**) et *Entrobacter feacalis* (**2**) par l'utilisation de la méthode de diffusion des disques

**Tableau V.4** Zones d'inhibition des deux extraits méthanoliques (macération et soxhlet) de l'écorce de *Punica granatum* L contre six souches bactériennes étudiées

| Souches / Extraits | | Gram$^+$ | | | Gram$^-$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *SA* | LM | EF | EC | *SSp* | KP |
| *Punica g.* | macération | 15 | 11 | 12 | 09 | 11 | 12 |
| | Soxhlet | 18 | 18 | 12 | 11 | 11 | 09 |
| *Rubia t.* | macération | 14 | 10 | 17 | 12 | 14 | 12 |
| | Soxhlet | 16 | 10 | 21 | 14 | 16 | 17 |
| *Papaver r.* | macération | 10 | 11 | 19 | 10 | 14 | 12 |
| | Soxhlet | 14 | 11 | 21 | 10 | 14 | 10 |
| *Hibiscus s.* | macération | 14 | 14 | 21 | 12 | 16 | 12 |
| | Soxhlet | 10 | 14 | 16 | 12 | 10 | 10 |
| *Quercus i.* | macération | 18 | 18 | 22 | 10 | 12 | 14 |
| | Soxhlet | 14 | 17 | 20 | 12 | 10 | 12 |
| *Lawsonia i.* | macération | 16 | 16 | 14 | 14 | 17 | 15 |
| | Soxhlet | 20 | 17 | 17 | 14 | 20 | 18 |

*avec : SA : Staphylococcus aureus, LM : Listeria monocytogenes EF : Enterococcus feacalis, EC : Escherichia coli, SSp : Salmonella sp, KP: Kliebsella pneumoniae.*

Les résultats des tests de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des douze extraits méthanoliques (macération, soxhlet) des six plantes étudiées sont énumérés dans le tableau V.4. Par considération du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne ainsi que la valeur moyenne de cette zone, les différentes bactéries sont dites "sensibles", si leur diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm, par contre s'il est compris entre 6 et 11 mm, elles sont "moyennement sensibles". En revanche s'il est inférieur à 5 mm, elles sont considérées comme "résistantes".

L'effet inhibiteur des extraits au soxhlet vis-à-vis des souches bactériennes Gram positif *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* s'est avéré très sensible. Ainsi, les extraits qui ont montré une plus grande efficacité d'inhibition contre *Staphylococcus aureus* sont respectivement : *Lawsonia i.* (20 ± 2,53 mm), *Punica g.* (18 ± 2.15 mm), *Rubia t.* (16 ± 1.56 mm), *Papaver r., Quercus i.* (14 ± 0,79 mm) et *Hibiscus s.* (10± 1,49 mm). On constate également une grande variation dans les valeurs relatives aux zones d'inhibition des extraits, dont les diamètres peuvent aller de 10 (*Rubia t.*) jusqu'à 18

mm (*Punica g.*). Il est à signaler que les extraits de *Rubia t.* et de *Papaver r.* se sont montrées les moins efficaces vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*. L'effet inhibiteur vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis* s'est avéré très sensible en présence de tous les extraits au soxhlet et s'est montré plus efficace que dans le cas des extraits obtenus par macération. Quant à la souche E. Coli, les deux extraits de *Rubia t.* et *Lawsonia i.* présentent la plus forte activité antibactérienne par rapport aux autres extraits avec une moyenne des diamètres de zones d'inhibition de 14 ± 1.56 mm (*Rubia t.*) et 14 ± 0.48 mm (*Lawsonia i.*), suivis de l'extrait au soxhlet de *Quercus i.* et les extraits d'*Hibiscus s.* avec une moyenne de diamètres de zones d'inhibition de 12 ± 1.06 mm (*Quercus i.*) et 12 ± 1.14 mm (*Hibiscus s.*). Il est à noter que les deux extraits de *Punica g.* et *Papaver r.* ont présenté globalement les plus faibles activités antibactériennes contre la souche *E. coli* avec respectivement une moyenne de diamètre de 11 ± 1,24 mm et 10 ± 0.78 mm dans le cas du soxhlet, et de 09 ± 0.67 mm et 10 ± 0.61 mm dans le cas de la macération. Concernant la souche *Salmonella sp,* l'effet inhibiteur des extraits s'est montré moyennement sensible. Cette dernière a connu un plus grand effet d'inhibition une fois traitée par les extraits de *Lawsonia i.* et dont les valeurs moyennes sont de 20 ± 2,05 (soxhlet) et 17 ± 1,31 (macération). Il en est de même avec l'extrait de *Rubia t.* dont la valeur moyenne est de 16 ± 1,07 mm pour le soxhlet et 14 ± 0.78 mm dans le cas de la macération. La dite souche s'est avérée moins sensible aux quatre extraits de plantes suivantes macérées (*Papaver r., Punica g., Hibiscus s. et Quercus i.*), et dont les diamètres de zones d'inhibition sont respectivement de 14 ± 1.45 mm, 11 ± 0,97 mm, 10 ± 1.08 mm et 10 ± 0.84 mm.

En regardant la souche *Kliebsella pneumonia*, l'effet inhibiteur est assez sensible en présence des extraits étudiés. Un effet d'inhibition important a été affiché lors du traitement par les extraits de *Lawsonia i.* (diamètre de 18 mm) et *Rubia t.* (diamètre de 17 mm), suivi de *Quercus i.* avec des valeurs de 14 ± 1.16 mm (macération) et 12 ± 0.78 mm (soxhlet). L'Effet inhibiteur des extraits de *Papaver r., Hibiscus s. et Punica g.* est plus prononcé dans le cas de la macération avec une moyenne du diamètre d'inhibition de 12 mm.

*II.2. Antibiogramme*

L'antibiogramme consiste à évaluer la sensibilité de souches bactériennes pathogènes et/ou d'altération, indicatrices pour les extraits des plantes et les bactéries, vis-à-vis de différents antibiotiques. Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits sur de 8 antibiotiques par la méthode standard des disques. Pour chaque bactérie testée les antibiotiques adéquats ont été

utilisés selon les recommandations de standardisation de l'antibiogramme (CLSI, 2016). Les mesures des zones d'inhibition sont rapportées dans le tableau V.5.

**Tableau V.5** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des antibiotiques testés contre *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and Enterobacter feacalis.*

| | *Staphylococcus aureus* | | *Kliebsella pneumonia* | | *Enterococcus feacalis* | | *Escherichia coli* | | *Salmonella. sp* | | *Listeria monocytogenes* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D(mm) | Interpretation | D(mm) | Interpretation | D(mm) | Interpretation | D(mm) | Interpretation | D(mm) | Interpretation | D(mm) | Interpretation |
| E | - | - | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 6 | R |
| OFX | 26 | S | 27 | S | 22 | S | 6 | R | 16 | R | - | - |
| TIC | - | - | - | - | 6 | R | 6 | R | - | - | - | - |
| OX | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 6 | R |
| AMP | - | - | 6 | R | 6 | R | 6 | R | 22 | S | 6 | R |
| NOR | - | - | 25 | S | 22 | S | 6 | R | 20 | S | - | - |
| CAZ | 14 | R | 15 | R | - | - | 6 | R | - | - | - | - |
| CTX | 18 | R | 20 | S | - | - | 6 | R | 20 | S | - | - |

E: erythromycin, OFX: ofloxacin, TIC: ticarcillin, OX: oxacillin, AMP: ampicillin, NOR: norfloxacin, CAZ: ceftazidim, CTX: cefotaxim.

- : antibiotic does not match this strain; R: Resistant; S: Sensitive;

Il ressort de cette étude (tableau V.5) que toutes les bactéries (exception faite sur la bactérie *Salmonella*) ont montré une résistance à l'érythromycine, ofloxacine, ticarcilline, ampicilline et ceftazidime. Ces mêmes bactéries ont montré une sensibilité à l'ampicilline. La zone d'inhibition est de 22 mm. En outre, il a été démontré que *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumonia* présentent une sensibilité intéressante aux antibiotiques fluoxacine et norfloxacine. En ce qui concerne *E. coli* et *Salmonella Spp,* aucune activité n'a été observée. Quant au céfotaxime, une sensibilité relative a été enregistrée et a été associée à la fois à *Klebsiella pneumonia* et *Salmonella*. Cependant dans le cas d'*E. coli* et Listeria monocytogenes, la résistance aux médicaments a déjà été démontrée et présente des signes évidents pour tous les antibiotiques. Pour les souches *d'Enterococcus faecalis* : sauf pour l'ofloxacine et la norfloxacine (zone d'inhibition de 22 mm), la résistance a été bien détectée dans les autres antibiotiques testés. La résistance aux médicaments a été bien détectée dans les autres antibiotiques testés.

*II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices* (CMI) *et bactéricides* (CMB)

Après la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents extraits par la méthode de diffusion des disques, nous avons essayé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) relatives aux extraits les plus actifs sur les six bactéries à $Gram^+$ et à $Gram^-$ Après avoir révélé les CMI, nous avons procédé à la détermination des concentrations

minimales bactéricides (CMB). Les résultats trouvés en CMI et CMB (exprimés en mg/ml) pour chacun des extraits sont consignés dans les tableaux suivants (V.6, V.7).

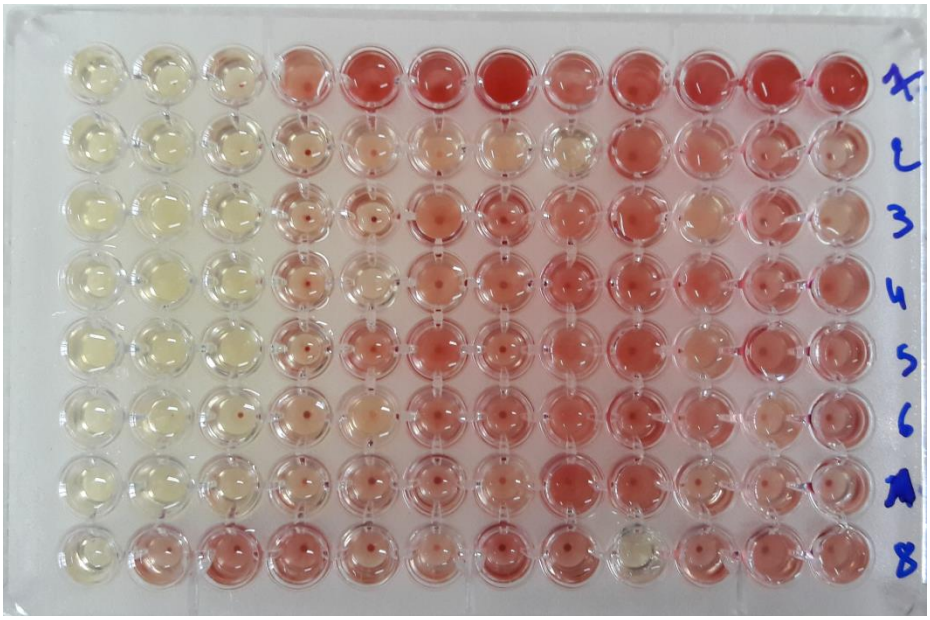



**Figure. V.5:** Effet des extraits sur la croissance des souches bactériennes par l'utilisation de la méthode microdilution des puits

**Tableau V.6**: Valeurs de **CMI** in vitro (mg/ml) de 12 extraits de plantes (macération + soxhlet) contre six souches bactériennes *(Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterobacter feacalis).*

| **CMI** (mg/ml) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Plantes** | **Extraits** | **Gram$^+$** | | | **Gram$^-$** | | |
| | | ***SA*** | ***LM*** | ***EF*** | ***EC*** | ***SSp*** | ***KP*** |
| *Punica g.* | macération | 7.5 | 3.75 | 7.5 | 7.5 | 7.5 | 3.75 |
| | Soxhlet | 0.93 | 3.75 | 7.5 | 3.75 | 15 | 0.93 |
| *Rubia t.* | macération | 7.5 | 60 | 3.75 | 30 | 7.5 | 30 |
| | Soxhlet | 3.75 | 60 | 0.23 | 7.5 | 3.75 | 3.75 |
| *Papaver r.* | macération | 60 | 60 | 0.94 | 60 | 7.5 | 30 |
| | Soxhlet | 7.5 | 60 | 0.23 | 60 | 3.75 | 60 |
| *Hibiscus s.* | macération | 7.5 | 7.5 | 0.23 | 30 | 7.5 | 30 |
| | Soxhlet | 60 | 7.5 | 7.5 | 30 | 60 | 60 |
| *Quercus i.* | macération | 1.87 | 1.87 | 0.11 | 60 | 30 | 7.5 |
| | Soxhlet | 7.5 | 3.75 | 0.47 | 30 | 60 | 30 |
| *Lawsonia i.* | macération | 3.75 | 7.5 | 7.5 | 7.5 | 3.75 | 7.5 |
| | Soxhlet | 0.93 | 3.75 | 3.75 | 7.5 | 0.47 | 1.87 |

Les extraits végétaux bruts doivent être considérés comme potentiellement utiles sur le plan thérapeutique s'ils présentent des valeurs de CMI inférieures à 8 mg/ml, alors que les produits phytochimiques isolés devraient avoir des CMI plus faibles que 1 mg/ml [42, 43].

D'après les résultats du tableau V.5 les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits des plantes aromatiques médicinales étudiées contre les souches bactériennes de Gram+ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* sont avérés très significatives. Les concentrations les plus faibles contre *Staphylococcus aureus* sont relatives, respectivement, aux extraits du soxhlet de *Lawsonia i.* (0.93 ± 0.11 mg/ml), *Punica g.* (0.93 ± 0.08 mg/ml), *Rubia t.* (3.75 ± 0.45 mg/ml), *Papaver r.*, *Quercus i.* (7.5 ± 0,09 mg/ml) et *Hibiscus s.* (60 ± 1,09 mg/ml). Cependant, les extraits macérés présentent les concentrations d'inhibition les plus élevées avec des valeurs allant de 60 mg/ml (*Rubia t.*) à 1.87 mm (*Quercus i.*). Il est à signaler que les deux extraits de *Rubia t.* et de *Papaver r*. ont été les moins efficaces vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* avec des concentrations de 60 mg/ml. L'effet inhibiteur était plus efficace dans le cas des extraits au soxhlet que ceux des

extraits par macération vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis* qui s'est montrée très sensible. Les extraits de *Punica g.* présentent les plus faibles concentrations inhibitrices par rapport aux autres extraits vis-à-vis de la souche *E. Coli* avec une valeur de 3.75 ± 0.66 mg/ml (soxhlet) et 7.5 ± 0.48 mm (macération), suivis de l'extrait de *Lawsonia i.* avec une concentration de 15 mg/ml, *Quercus i*. et les extraits d'*Hibiscus s*. avaient une moyenne des concentrations de 30 ± 1.14 mg/ml. Les extraits de *Papaver r*. ont présenté les plus faibles activités antibactériennes contre la souche *E. coli* avec une concentration de 60 ± 1,43 mg/ml. En outre, un effet inhibiteur très important des extraits exercé contre la souche *Salmonella sp*., cette dernière a connu un plus grand effet d'inhibition lors du traitement par les extraits de *Lawsonia i*. avec des valeurs moyennes de CMI de 0.47 ± 0,03 mg/ml (soxhlet) et 3.75 ± 0,26 mg/ml (macération), ainsi que l'extrait de *Rubia t*. et *Punica g.* avec des valeurs moyennes respectives de 7.5 ± 0,47 mg/ml et 15 ± 0.07 mg/ml (soxhlet), et 7.5 ± 0.58 mg/ml et 7.5 ± 0.5 mg/ml (macération). La souche *Salmonella sp* est moins sensible aux extraits méthanoliques des trois plantes suivantes : *Papaver r., Hibiscus s. et Quercus i*. et dont les concentrations minimales inhibitrices varient entre 7.5 et 60 mg/ml, exception faite sur l'extrait macéré d'*Hibiscus s.* qui présente une valeur moyenne de 7.5± 0.28 mg/ml. Le pouvoir d'inhibition est assez sensible dans les extraits contre la souche *Kliebsella pneumonia*. Cette souche a connu globalement un effet d'inhibition très important sous l'action des extraits au soxhlet des trois plantes suivantes : *Punica g.*, *Lawsonia i.*et *rubia t.* avec des CMI respectives de 0.93 mg/ml, 1.87 ± 0.07 mg/ml et 3.75 ± 0.48 mg/ml, tandis que des valeurs relativement plus élevées en CMI ont été connectées aux extraits par macération : *Punica g.* (3.75 mg/ml), *Lawsonia i.* (7.5 mg/ml) et *Rubia t.* (30 mg/ml). Suivie de *Quercus i.* avec 15 ± 0.26 mg/ml (macération) et 30 ± 1.08 mg/ml (soxhlet). L'effet inhibiteur des extraits de *Papaver r. et Hibiscus s. s'*est montré plus élevé dans le cas du soxhlet (60 mg/ml) que dans le cas de la macération avec une valeur moyenne de CMI de 30 mg/ml.

**Tableau V.7 :** Valeurs de **CMB** in vitro (mg/ml) des extraits des six plantes (macération, soxhlet) contre six souches bactériennes *(Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterobacter feacalis).*

| | | **CMB** (mg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Plantes** | **Extraits** | **Gram$^+$** | | | **Gram$^-$** | | |
| | | *SA* | *LM* | *EF* | *EC* | *SSp* | *KP* |
| *Punica g.* | macération | 8,25 | 5,775 | 11,25 | 9 | 3,6 | 5,25 |
| | Soxhlet | 1,581 | 0,9021 | 13,5 | 6,75 | 21,75 | 7,125 |
| *Rubia t.* | macération | 4,5 | 34,2 | 5,25 | 39 | 7,875 | 90 |
| | Soxhlet | 0,75 | 4,425 | 0,299 | 3,75 | 3,75 | 84 |
| *Papaver r.* | macération | 72 | 36,6 | 1,128 | 24 | 7,125 | 78 |
| | Soxhlet | 9,75 | 75,6 | 0,253 | 18 | 3,375 | 72 |
| *Hibiscus s.* | macération | 6,75 | 12 | 0,23 | 36 | 6,375 | 8,25 |
| | Soxhlet | 30 | 18 | 6,75 | 33 | 48 | 7,5 |
| *Quercus i.* | macération | 0,187 | 1,5 | 0,088 | 69 | 22,5 | 1,683 |
| | Soxhlet | 9,75 | 3 | 0,329 | 36 | 42 | 3 |
| *Lawsonia i.* | macération | 3,375 | 18 | 4,5 | 9,375 | 9,375 | 5,25 |
| | Soxhlet | 0,465 | 2,7489 | 1,875 | 9,75 | 0,7144 | 2,25 |

L'extrait est considéré comme bactéricide lorsque le rapport **CMB/CMI** est ≤ 4, cependant, il est considéré comme bactériostatique lorsque ce ratio est supérieur à 4 [44]. Ainsi, tous nos extraits testés ont montré une activité bactéricide contre les différentes souches étudiées. Ce pouvoir bactéricide des différents extraits (macération et soxhlet) issus de six différentes plantes évoquées ci-dessus contre les six souches bactériennes, justifie en partie l'exploitation de ces plantes en médecine traditionnelle contre certaines pathologies, comme les diarrhées sanglantes, la fièvre typhoïde et les infections cutanées dans lesquelles ces germes pourraient être impliqués [45, 46].

À l'issue de cette étude, on constate que tous les extraits évalués possèdent un pouvoir antibactérien avec toutefois des performances différentes, variant d'un type à un autre et d'une souche à une autre, indiquant leurs larges spectres d'action antibactérienne. Les concentrations minimales inhibitrices pour l'extrait de soxhlet atteignent des valeurs inférieures à celles de l'extrait par macération contre les souches bactériennes étudiées. Cette efficacité antibactérienne est due à la présence d'une teneur en composés phénoliques plus

élevée dans les extraits au soxhlet que ceux macérés (voir chapitre 3). L'effet antibactérien augmente avec la présence de composés phénoliques, ces résultats sont en bon accord avec les travaux rapportés par Bouarab-chibane et al. en 2019 [47], montrant l'effet important de polyphénols sur la limite de croissance de souches bactériennes pathogènes d'origine alimentaire ou de souillure alimentaire.

Dans le cas de l'écorce de grenade, les constituants polyphénols de type punicalagine, acide gallique et punicaline, sont responsables du potentiel antibactérien qui s'accentue avec l'augmentation de la concentration de ces substances dans les extraits. Machadoa et al. 2002 [48] ont rapporté que les composés ellagitannine et punicalagine sont responsable de l'activité antibactérienne de la grenade. En outre, elle peut être un marqueur chimique de choix. La punicalagine présente aussi bien une bonne activité antibactérienne qu'un effet anti-biofilm sur certaines souches, comme le *Staphylococcus aureus* qui affecte la membrane cellulaire, ce qui est prouvé par les fuites de potassium et les changements de microstructure. Cette dernière est très sollicitée dans l'industrie alimentaire en tant que conservateur alternatif ou complémentaire. Selon Rongai et al. 2019 [49], les génotypes à forte teneur en phénols et en punicalagine sont doués d'activité antibactérienne, tandis que les les extraits de très faible teneur ont présenté une activité inhibitrice plus faible. Quant à Rajamanickam et al. 2019 [50], ils ont confirmé la grande efficacité de l'acide gallique contre certaines souches bactériennes (*M. haemolytica, P. multocida*) responsables de maladies respiratoires bovines. Les travaux de Borges et al. 2013 [51] ont montré que la présence d'acide gallique exerce une activité antimicrobienne contre diverses bactéries pathogènes. En raison de la forte polarité chimique, notamment la quantité importante de phénols présents dans l'extrait au soxhlet que celui obtenu par macération, qui correspond à leur activité antibactérienne supérieure. Les propriétés antibactériennes des polyphénols reposent sur la possibilité d'oxyder et/ou d'hydrolyser les parois cellulaires bactériennes et membrane plasmique.

En effet, il a été rapporté que le traitement des bactéries avec des composés phénoliques (métabolites secondaires) permet de diminuer la teneur en lipides, tout en affectant la structure de la membrane cellulaire et enfin inhibant la croissance bactérienne fongique [52]. Ces constituants auraient perturbé ou pénétré les structures lipidiques des cellules en saturant la membrane cellulaire [53]. D'après Liu et al. 2019 [54], le mécanisme antimicrobien des produits polyphénoliques de *Morus notabilis* (mûrier) a agi sur les cellules bactériennes *d'E. coli* et de *S. aureus*, entraînant une altération marquée des structures sous-cellulaires, des membranes et des parois cellulaires endommagées, une répartition inégale du cytoplasme cellulaire ou l'absence de cytoplasme pour certaines cellules qui deviennent vacuoles. Des

modes d'action similaires ont été signalés dans le cas de l'extrait polyphénolique de l'huile d'olive contre *Cronobacter sakazakii* [55].

La présence de concentrations élevées en phénols, flavonoïdes et tanins dans les extraits methanoliques (soxhlet et macéartion) explique le puissant effet antibactérien de *Rubia. tinctorum* (famille des Rubiacées) et qui peut être corrélé à sa richesse en constituant polyphénolique de type antraquinone, utilisée comme anti-inflammatoire, antibactérien et antidiurétique (Swain 1996) [56]. L'extrait au soxhlet de *Rubia tinctorum* a développé des zones d'inhibition plus élevées que celui issu de la macération et les CMI de ce dernier se sont montrées plus faibles au niveau des différentes souches examinées.

Les couleurs rouges caractéristiques des fleurs et des pétales de *Papaver rhoeas* proviennent du pigment anthocyanique qui est utilisé comme antioxydant naturel en phytothérapie et dans l'alimentation (Günaydin et al. 2015) [57]. D'après l'étude récente conduite par Bakour et al. 2019 [58], sur le profil phénolique/flavonoïde du pollen de fleurs, tous les composés identifiés présentent dans leurs structures chimiques un squelette hydroxy-phénolique, y compris les flavon-3-ols (kaempférol-3-O-sucres), flavones (apigénine et dérivés, lutéoline), et lignanes ou tanins. Alors que très récemment dans la partie ovule, Ovidi et al. 2020 et références citées, ont montré la présence des composés suivants : acides gras et leurs dérivés d'esters (acide élaïdique: isomère E de l'acide oléique), acide n-hexadécanoïque: acide palmitique, ester éthylique de l'acide 9,12-octadiénoïque: ester éthylique de l'acide linoléique), ainsi que le composé phénolique simple (2,6-di-*tert*-butylphénol) [59]. En outre, le 2,4-di-t-butylphénol a également été signalé comme agent antifongique contre *Candida albicans* (Belghit et al. 2016) [62]. Par ailleurs, Rota et al. 2008 [63] ont montré que l'activité antibactérienne la plus élevée peut être due à la richesse en groupements hydroxyles phénoliques structurels (fraction phénolique) qui contribuent à l'augmentation de l'effet antimicrobien (Zinoviadou et al. 2009) [64]. Comme il a été rapporté récemment par Takahashi et al. 2020 [65], les effets biologiques sont étroitement liés aux propriétés antioxydantes de certains composants de types : glucides, lipides, protéines et ADN. En se basant sur les données antérieures de la littérature, dans notre cas, les activités antibactériennes ont pu être mises en évidence grâce à la contribution synergique de tous les constituants susmentionnés situés dans les parties des fleurs (pollen, ovule, fleurs). Ainsi, l'activité antibactérienne pourrait être le résultat de l'activité combinée d'un large éventail de composés, y compris les phénoliques, flavonoïdes, et lignanes [58], mais peut être aussi due aux acides gras et leur esters méthylés [59], ainsi qu'à d'autres composés présents dans les fleurs de *Papaver r.*, comme les anthocyanes (cyanidine et

mécocyanine) et les alcaloïdes d'isoquinoléine (50 % de groupes rhoeadine) [60], induisant un effet antibactérien plus important. En se référant à de nombreuses données de la littérature, le mécanisme d'action possible du polyphénol de *Papaver rhoeas* contre les souches étudiées pourrait être corrélé à l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire, et donc à la perturbation de la membrane cellulaire bactérienne, comme la réduction des concentrations intracellulaires d'ATP, la dépolarisation des membranes cellulaires, la fuite de la membrane du cytoplasme, la diminution de la teneur en protéines bactériennes et la fuite du cytoplasme. Comme indiqué précédemment, les propriétés pharmacologiques des extraits de *Papaver rhoeas* comprennent l'apaisement des troubles digestifs liés à l'anxiété, l'action anti-inflammatoire, antitussive, antispasmodique, antigénotoxique, antimutagène et anticancérigène [66], le traitement des maladies infectieuses, contre la toux, la diarrhée et les troubles du sommeil, peut être aussi utilisé comme agent conservateur ou bactéricide pour réduire les problèmes de sécurité alimentaire causés par les souches dans les industries alimentaires.

Comme le montre le tableau V. 4, les six souches bactériennes ont montré une sensibilité significative à l'extrait méthanolique de *H. sabdariffa* et étaient plus élevées que les antibiotiques testés (tableau V. 5). En d'autres termes, l'extrait de méthanol de *Hibiscus sabdariffa* a une puissante activité antibactérienne contre les six bactéries testées. Il a été a déjà signalé que les roses de *H. sabdariffa* ont des propriétés antibactériennes contre différents agents pathogènes d'origine alimentaire, comme le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa et A. baumannii* [67]. Ces puissantes propriétés antibactériennes des roses de *H. sabdariffa* pourraient être attribuées à sa richesse en métabolites secondaires.

Gomez-Aldapa et al. 2018 ont rapporté que *l'Hibiscus s*. Soudanais est constitué d'alcaloïdes, de phénols, de flavonoïdes et de saponines et possède de puissantes propriétés antibactériennes [68] dues aux principaux groupements chimiques constituant ces plantes [69]. Les roses de *H. sabdariffa* possèdent une activité bactéricide efficace contre toutes les souches testées. Ces conclusions sont en accord avec celles trouvées par Liu et al. [70]. D'après des études antérieures, seuls les extraits aqueux d'*Hibiscus s.* ont été utilisés pour désinfecter la laitue romaine, les germes de luzerne contaminés par *E. coli*, *Salmonella*, et *L. monocytogenes* [71] et aussi la laitue iceberg biologique, des épinards contaminés par la salmonelle [72]. L'effet antimicrobien de quatre extraits d'*Hibiscus* a été évalué contre les souches de salmonelles multirésistantes des carottes et tomates et contre 13 différentes

bactéries d'origine alimentaire sur l'avocat [73,74]. Les extraits d'*hibiscus s.* peuvent par conséquent, être un moyen potentiel de contrôler les maladies d'origine alimentaire des bactéries sur les verts feuillus.

Depuis l'antiquité, l'utilisation traditionnelle de l'écorce de chêne dans le domaine de la médecine était bien connue et appliquée par voie topique pour les brûlures et les blessures afin de prévenir les infections, ou par voie orale pour les maladies gastro-intestinales. L'extrait de *Quercus* (en particulier l'extrait d'écorce) contient d'importants composés antimicrobiens tels que l'acide gallique, l'acide ellagique, le véscalagine ou castalagine [75,76]. En raison de son historique d'utilisation d'antibactériens, Deryabin et Tolmacheva [77] ont utilisé l'écorce de *Quercus* contre *Chromobacterium violaceum*. Les résultats ont montré un effet de détection anti-quorum déterminé par la bioactivité de l'extrait. L'activité antimicrobienne est soutenue par divers résultats d'expériences signalés contre les *Streptococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, les extraits de l'écorce de *Quercus* ont inhibé la croissance des souches d'*Acinetobacter baumannii* et la croissance de *Staphyloccus* et a montré une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* [78]. Non seulement l'écorce de chêne mais les feuilles de *Quercu*s ont une activité antibactérienne et antifongique, comme ça été montré par Tahmouzi [79]. L'extrait de glandes de *Quercus* a montré une activité antifongique contre la candidose vaginale et une activité légèrement antibactérienne contre *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Klebsiella la pneumonie* et le *Staphylococcus aureus* [80].

L'activité antibactérienne et antifongique peut être le résultat du type d'extrait, du moment de la récolte, de l'activité du chêne ainsi que la qualité des instruments et les méthodes de mesure. Tayel et al [81] ont montré que l'antifongique activité contre Candida albicans de l'extrait éthanolique de gland de Quercus. Les glandes sont concentrées dans les tanins (ellagitannins) plus que dans les autres parties du chêne et l'activité antibactérienne et antifongique peut être attribuée à ces composés [82]. Il a été démontré que les tanins inhibent la croissance dans une large de bactéries, de champignons et de virus, en inactivant les enzymes microbiennes, en séquestrant les métaux essentiels ions dans les complexes et l'inhibition du transport membranaire [83]. Zhou et al. [84] ont montré que les ions antibactériens de l'extrait de *Quercus* détruisant la cellule de la paroi de la bactérie et inhibant son activité normale la croissance et le métabolisme cellulaire. Khairon et al. [85] ont montré l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Quercus* contre les infections par l'interférence de divers métabolismes et fonction du protéome bactérien. Les tanins agissent également

comme inhibiteurs de biofilm en se liant aux protéines de la matrice [86]. Chusri et al. [87] ont mis en évidence l'activité anti-biofilm sur le SARM due à l'extrait de *Quercus i*. effet sur la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* et l'hydrophobie de la surface cellulaire. Les extraits de chêne sont également utilisés dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique, ou dans l'industrie alimentaire [88]. L'extrait de *Quercus* peut être appliqué comme désinfectant et décontaminant naturel pour le poulet ou pour aider les agriculteurs à éviter les fongicides en raison des risques qu'ils représentent pour l'homme et l'environnement [89]. Plusieurs études ont montré une activité anti-inflammatoire. Castejón Martínez et al. [90] ont décrit que les extraits phénoliques de *Quercus ilex* diminuent l'infiltration des neutrophiles et réduisent les cytokines chez les rats atteints de colite ulcéreuse induite par le TNBS. Chokpaisarn et al. [91] ont décrit l'extrait de *Quercus* comme une amélioration du phénotype inflammatoire des macrophages dérivés de la moelle osseuse induite par des environnements prédiabétiques ou diabétiques, potentiellement en inhibant la voie inflammatoire Set7/NF-κB. Les composés phénoliques (acide ellagique) améliorent l'anti-inflammation grâce à des composés de l'extrait d'écorce de *Quercus* qui ont montré des activités inhibitrices à l'égard des cytokines et les chimiokines induites dans les kératinocites irradiées par les ultraviolets B (UVB) en augmentant la capacité de migration des cellules et l'amélioration de leur régénération lorsqu'elles sont exposées aux UVB, ces composés peuvent être développés pour traiter les maladies inflammatoires chroniques de la peau, comme les maladies atopiques de la peau , la dermatite et le psoriasis [92]. Ainsi, l'effet antidiabétique significatif des composés phénoliques de *Quercus* pourrait être dû à la présence de composés phénoliques, qui pourraient agir de manière synergique ou indépendante pour améliorer l'activité des enzymes glycolytiques.

Pasandi-Pour et al. 2019 ont évalué l'extrait aqueux de *Lawsonia i.* à une concentration de 2,5 % était plus puissant, inhibant la croissance *d'E. coli* et de *S. agalactiae* [93]. L'extrait aqueux de henné des écotypes *Shahdad* et *Bam* n'a empêché la croissance de *Klieabsella pneumonia* qu'à une concentration de 2,5 %, l'inhibition de 7 et 6 mm de diamètre respectivement. Ainsi, les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de feuilles de henné peut être due à la présence de nombreux groupements hydroxyphénoliques, tels que la Lawsone (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) dont la capacité de se combiner avec les protéines et les hydrates de carbone de la paroi cellulaire bactérienne [94]. L'éventail potentiel des effets antimicrobiens de la quinone est large. Les quinones peuvent également rendre les substrats indisponibles pour le micro-organisme [95]. En outre, il a été montré qu'ils inhibent

la croissance cellulaire en culture (Cordoba-Pedregosa et al. 2006). Gull et al. (2013) ont montré que l'utilisation d'extraits de *L. inermis* est d'une grande importance en tant qu'agent antimicrobien de substitution en thérapeutique contre les bactéries Gram positives et négatives. En récoltant du henné (feuilles et graines fraîches) dans différentes régions d'Oman, Habbal et al. (2011) ont montré que les graines fraîches et sèches avaient une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* [96, 97]. Depuis, le henné a montré une forte activité vis-à-vis de bactéries sans aucun effet secondaire ou présentant une résistance bactérienne, il pourrait être considéré comme une découverte importante dans les recherches sur les antibiotiques naturels.

## Conclusion

Depuis longtemps, les plantes aromatiques médicinales ont été utilisées en médecine traditionnelle dans divers pays et par des tribus. L'écorce, les fruits et les feuilles de l'espèce du genre ont été connus par leur large spectre présentant des effets biologiques importants, en tant qu'antioxydant, antidiabétique, anticancéreux, anti-inflammatoire et antibactérien. Les études phytochimiques actuelles de *Punica granatum, Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonia inermis* ont montré que les acides phénoliques (notamment les acides galliques et ellagique et leurs dérivés), flavonoïdes (en particulier le flavan-3-ol), et les tanins sont en quelque sorte omniprésente dans toutes les espèces des plantes étudiées. Ces composés phénoliques, les triterpénoïdes et les flavonoïdes ont un effet positif sur les actions antioxydantes et antibactériennes qui peuvent être considérées comme des candidats prometteurs pour le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique dans le secteur pharmaceutique. Pour cela, des recherches supplémentaires sur d'autres espèces de plantes nécessitent une grande attention de la part des biochimistes pour l'étude de leur profil chimique détaillé et de leur effet sur la santé. Par conséquent, les résultats encourageants peuvent être utilisés comme aliments naturels et/ou interaction entre les aliments et la santé dans le traitement des maladies infectieuses, ainsi que comme agents conservateurs ou bactéricides pour réduire les problèmes de sécurité alimentaire causés par les souches dans les industries alimentaires et les maladies humaines. Par analogie, les plantes étudiées peuvent alors être identifiées comme source potentielle dans le domaine de conservation permettant la lutte et le contrôle des souches bactériennes dans les aliments. Les molécules d'origine végétale peuvent contribuer ainsi comme agents antibactériens à large spectre via des méthodes vertes (non polluantes) et révolutionnaires

## Références

[1] I. F. Benzie; J. J. Strain; "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration"; *Methods Enzymol.* 299, 15-27, **1999**.

[2] M. Oktay; I. Gulcin; O. I. Kufrevioglu; "Determination of in vivo antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts"; *LWT-Food Sci Technol*. 36, 263–271, **2003**.

[3] I. Hmid, D. Elothmani, H. Hanine, A. Oukabli, E. Mehinajic, "Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen Pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Morocco", *Arabian J. Chem.* 10, S2675-2684, **2017**.

[4] A. A. Khalil, M. R. Khan, M. A. Shabbir, K. U. Rahman, "Comparison of antioxidative potential and punicalagin content of pomegranate peels". *J. Anim. Plant Sci.* 27, 522–527, **2017**.

[5] S.R. Kanatt, R. Chander, A. Sharma, "Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products". *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 216-222, **2010**.

[6] F. Doostan, R. Vafafar, P. Zakeri-Milani, A. Pouri, R.A. Afshar, M.M. Abbasi, **"**Effects of Pomegranate *(Punica Granatum L.)* Seed and Peel Methanolic Extracts on Oxidative Stress and Lipid Profile Changes Induced by Methotrexate in Rats**"**. *Adv. Pharm. Bull.* 7 (2) 269-274, **2017**,.

[7] Shishavan, N. G., Abbasi, M. M., Afshar, R. A., Milani, P. Z., Yahyavi, F., Jundishapur **"**The Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Methanolic Extract on Methotrexate Induced Changes in Hepatic Antioxidant Enzymes of Rats**"**. *J. Nat. Pharm. Prod.* 12 (1), e57499, **2017**.

[8] S.S. Nelson; S.A Yadav, "a comparative screening and evaluation of the total phenolics, flavonoids, and antioxidant properties in the seed extracts of *Punica granatum* L., *psidium guajava* L., and *Yitis vinifera* L. ". *Asian J Pharm Clin Res*, 12 (2), 242-247, **2019**.

[9] N. Zeghad, E. Ahmed, A. Belkhiri, Y.V. Heyden, K. Demeyer, "Antioxidant activity of *Vitis vinifera, Punica granatum, Citrus aurantium* and *Opuntia ficus* indica fruits cultivated in Algeria". *Heliyon* 5, e01575, **2019.**

[10] I. Essaidi, A. Snoussi, H. Ben Haj Koubaier, H. Casabianca, N. Bouzouita, "Effect of acid hydrolysis on alizarin content, antioxidant and antimicrobial activities of *Rubia tinctorum* extracts". *Pigment & Resin Technology*, 46 (5), 379-384, **2017.**

[11] M.S. Rabeta, R. NurFaraniza, "Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of Garcinia atrovirdis and Cynometra cauliflora". International *Food Research Journal*, 20 (4), 1691–1696, **2013**.

[12] R. Siva, M.G. Palackan, L. Maimoon, T. Geetha, D. Bhakta, P. Balamurugan, S. Rajanarayanan, "Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes". *Food Science and Biotechnology*, 20 (1), 7–13, **2011**.

[13] Y. Cai, Q. Luob, M. Sunc, H. Corke., "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer", *Life Sciences*, 74 (17), 2157–84, **2004**.

[14] M.D. Priya, E.A. Siril, "Traditional and Modern Use of Indian Madder (*Rubia cordifolia* L.): an Overview". *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 25 (1), 154–164, **2014**.
[15] S. Jeremic´, N. Filipovic´, A. Peulic´, Z. Markovic´. "Thermodynamical aspect of radical scavenging activity of alizarin and alizarin red S. Theoretical comparative study". *Computational and Theoretical Chemistry*, 1047, 15–21, **2014.**
[16] K. Hasplova, A. Hudecova, E. Miadokova, Z. Magdolenova, E. Galova, L. Vaculcikova, F. Gregan, M. Dusinska, "Biological activity of plant extract isolated from Papaver rhoeas on human lymfoblastoid cell line". *Neoplasma*, 58 (5), 386-391, **2011.**
[17] D.A. Kostic, S.S. Mitic, M.N. Mitic, A.R. Zarubica, J.M. Velickovic, A.S. Dordevic, S.S. Randelovic, "Content of trace metals in medicinal plants and their extracts". *J. Med. Plant Res.* 4, 1727-1732, **2010**.
[18] J. Katarzyna, J. Karolina, K. Patrycja, B. Mateusz, G. Izabela, "Mineral Composition and Antioxidant Potential in the Common Poppy (Papaver rhoeas L.) Petal Infusions". *Biol. Trace Elem. Res.* **2020.** https://doi.org/10.1007/s12011-020-02134-7
[19] Dhar P, Kar CS, Ojha D, Pandey SK, Mitra J. Chemistry, "Phytotechnology, pharmacology and nutraceutical functions of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed oil: An overview". *Ind. Crops Prod.* 77, 323–32, **2015** .
[20] I. Da-Costa-Rocha, B. Bonnlaender, H. Sievers, I. Pischel, M. Heinrich, Hibiscus sabdariffa L. "A phytochemical and pharmacological review". *Food Chem.* 165, 424–43. **2014.**
[21] H.E. Tahir; Z. Xiaobo; S. Jiyong; A.A. Mariod; T. Wiliam, "Rapid Determination of Antioxidant Compounds and Antioxidant Activity of Sudanese Karkade (Hibiscus sabdariffa L.) Using Near Infrared Spectroscopy". *Food Anal. Methods* 9, 1228–1236, **2016.**
[22] A. Das, A. Kalita, U. Raychaiudhuri, R. Chakraborty, "Synergistic effect of herbal plant extract (Hibiscus sabdariffa) in maintain the antioxidant activity of decaffeinated green tea from various parts of Assam". *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5009-5016, **2019**.
[23] M.A. Mollah, M.Z. Tareq, K. K. Bashar, A.B.M. Zahidul Hoque, M.M. Karim, M.Z. Al Rafiq. "Antioxidant properties of BJRI vegetable mesta-1 (*Hibiscus sabdariffa* L.) ". *Plant Science Today*, 7 (2), 154-156, **2020** .
[24] S. Jafarian, A. Mortazavi, R.S. Kenari, A.H.E. Rad, "Total Phenolic Content & Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* l.) Calyces Extracts". *J. Appl. Sci. & Agric.*, 9 (9), 165-169, **2014**.
[25] A.N. Ouchemoukh, S. Ouchemoukh, N. Meziant, Y. Idiri, D. Hernanz, C.M. Stinco, J. Luis, "Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica L., Ceratonia siliqua L. and Quercus ilex L.* extracts". *Industrial Crops and Products*, 95, 6–17, **2017** .
[26] H. Meziti, H. Bouriche, S. Kada, I. Demirtas, M. Kizil, A. Senator, "Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex L. and Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7 (4), 260-272, **2019**.
[27] C. Alis¸ O. kan, A.A. Polat, "Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (Ficus carica L:) accessions from the Eastern Mediterranean region of Turkey". *Sci. Hortic.* 128, 473–478, **2011**.

[28] L. Custódio, J. Patarra, F. Albericio, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, A. Romano, "extracts from *Quercus* sp: acorns exhibit in vitro neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity". *Ind. Crops Prod.* 45, 114–120, **2013**.
[29] L. Seczyk, M. Swieca, ´ U. Gawlik-Dziki, "Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta". *Food Chem.* 194, 637–642, **2016**.
[30] S. Shukla, S. Gupta, "Apigenin: A promising molecule for cancer prevention". *Pharm. Res.*, 27, 962–978, **2010**.
[31] A. Hsouna, M. Trigui, G. Culioli, Y. Blache, S. Jaoua, "Antioxidant constituents from Lawsonia inermis leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity". *Food Chem.* 125, 193–200, **2011**.
[32] M. Kumar, M. Chandel, P. Kaur, K. Pandit, V. Kaur, S. Kaur, S. Kaur; "Chemical composition and inhibitory effects of water extract of henna leaves on reactive oxygen species, dna scission and proliferation of cancer cells". EXCLI J. 21 (15), 842-857, **2016**.
[33] M.A. Soobrattee, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma, T. Bahorun, "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions". *Mutat Res.* 579 (1–2), 200-213, **2005**.
[34] A. Pasandi Pour, H. Farahbakhsh, "Lawsonia inermis L. leaves aqueous extract as a natural antioxidant and antibacterial product". *Nat. Prod. Res.* **34 (23)**, 1-5, **2019**.
[35] G. Guha, V. Rajkumar, R.A. Kumar, L. Mathew, "Antioxidant Activity of Lawsonia inermis Extracts Inhibits Chromium(VI)-Induced Cellular and DNA Toxicity". *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2011, 576456, **2011**.
[36] U.A. Ghit, A. Schwiebs, H.H Radeke, S. Avram, I. Zupko, A. Bor, I.Z. Pavel, C.A. Dehelean, C. Oprean, F. Bojin, "A Comprehensive Assessment of Apigenin as an Antiproliferative, Proapoptotic, Antiangiogenic and Immunomodulatory". Phytocompound. Nutrients, 11, 858, **2019**.
[37] H.O. Elansary, A. Szopa, P. Kubica, H. Ekiert, F.A. Al-Mana, M.A. Al-Yafrsi "Antioxidant and Biological Activities of Acacia saligna and *Lawsonia inermis* Natural Populations". *Plants* 9, 908, **2020.**
[38] V.M. Staszewski, A.M.R. Pilosof, R.J. Jagus, "Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins". *Food Chem.* 125, 186–192, **2011.**
[39] M.A. Deseo; A. Elkins, S. Rochfort, B. Kitchen, "Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract". *Food Chemistry*, 314, 126180, **2020.**
[40] A. El Moussaoui; F.Z. Jawhari; A.M. Almehdi; H. Elmsellem; K.F. Benbrahim; D. Bousta; A. Bari; "Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens. L*". *Bioorganic Chemistry* 93, 103337, **2019.**
[41] M. Nardini; I. Garaguso; "Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers". *Food Chemistry* 305, 125437, **2020.**
[42] D.R. Katerere, J.N. Eloff, "Activité anti-bactérienne et anti-oxydante de *Hypoxis hemerocallidea* (Hypoxidaceae): les feuilles peuvent-elles être substituées aux cormes comme stratégie de conservation?". *S. Afr. J. Bot.* 74, 613–616, **2008**.

[43] S.O. Amoo, A.R. Ndhlala, J.F. Finnie, J. Van Staden, "Propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires de *Burchellia bubalina*". *S. Afr. J. Bot.* 75, 60–63**, 2009**.

[44] E.O. Ndogo, N.D.Y. Oscar, N. Louis, N. Alima, M.G. François, N. Barthelemy, "Antibacterial properties of the extracts of Allexis obanensis and Allexis batangae (Violaceae) collected at Kribi (South Cameroon) ". *Journal of Phytopharmacology*, 7 (3), 275-284, **2018**.

[45] A.K. Das, "Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats". *Journal Ethnopharmacology* 68(1-3)**,** 205-208, **1999.**

[46] E.M. Al-Mathal, A.M. Alsalem, "Pomegranate (*Punica granatum*) peel is effective in a murine model of experimental Cryptosporidium parvum". *Experimental Parasitology* 131, 350-357, **2012**.

[47] L. Bouarab-Chibane, V. Forquet, P. Lantéri, Y. Clément, L. Léonard-Akkari, N. Oulahal, P. Degraeve, C. Bordes, "Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models". *Front. Microbial.* **10, 829, 2019**.

[48] T.B. Machadoa, I.C.R. Leala, A.C.F. Amaralb, K.R. N. dos Santosc, M.G. da Silvac, R.M. Kuster, **"**Antimicrobial Ellagitannin of Punica granatum Fruits**"**. *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (5), 606-610, **2002**.

[49] D. Rongai, P. Pulcini, G. Di Lernia, P. Nota, P. Preka, F. Milano, "Punicalagin Content and Antifungal Activity of Different Pomegranate (Punica ganatum L.) Genotypes"**.** *Horticulturae* 5, 52, **2019.**

[50] K. Rajamanickam, J. Yang, M.K. Sakharkar, "Gallic Acid Potentiates the Antimicrobial Activity of Tulathromycin Against Two Key Bovine Respiratory Disease (BRD) Causing-Pathogens"**.** *Front. Pharmacol*.**9, 1486**, **2019.**

[51] A. Borges, C. Ferreira, M.J. Saavedra, M. Simões, "Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria"**.** *Microb. Drug Resist*. 19 (4), 256-65, **2013**.

[52] G.A. Helal, M.M. Sarhan, A.N.K. Abu Shahla, E.K. Abou El-Khair, "Effects of Cymbopogon citratus L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of Aspergillus niger ML2-strain"**.** *J. Basic Microbiol.* 46 (6), 456–469, **2006**.

[53] A. Prashar, P. Hili, R.G. Veness, C.S. Evans, "Antimicrobial action of palmarosa oil (Cymbopogon martini) on Saccharomyces cerevisiae"**.** *Phytochem.* 63 (5), 569–575, **2003**.

[54] C. Liu, Y. Xu, Y. Feng, D. Long, B. Cao, Z. Xiang, A. Zhao, "Ectopic expression of mulberry 527 G-proteins alters drought and salt stress tolerance in tobacco"**.** *Int. J. Mol. Sci.* 20, 89, **2019**.

[55] P. Fei, Y. Jiang, S. Gong, R. Li, Y. Jiang, X. Yuan, "Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of Cronobacter spp. in drinking water and food samples from northeast China". J. Food Prot. 81, 456–460, 2018.

[56] SWAIN, T. "Comparative phytochemistry". New York: Academic Press. p 245, **1996**.

[57] Y.K. Günaydin, Z.D. Dündar, N.B. Akilli, R. Köylü, B. Cander, "Antiepileptic Drug Poisoning: Three-Year Experience"**.** *Toxicol. Rep.* **2,** , **56-62, 2014**

[58] M. Bakour, M.G. Campos, H. Imtara, B. Lyoussi, "Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD"**.** *Journal of Apicultural Research* **59(1)**, **35-41**, **2019**

[59] E. Ovidi, V.L. Masci, D. Zago, A. Tiezzi, "Antiproliferative Properties of Papaver rhoeas Ovule Extracts and Derived Fractions Tested on HL60 Leukemia Human Cells"**.** *Molecules* 25, 1850, **2020.**

[60] İ. Çoban, G.G. Toplan, B. Özbek, Ç.U. Gürer, G. Sarıyar, "Variation of alkaloid contents and antimicrobial activities of *Papaver rhoeas* L. growing in Turkey and northern Cyprus"**.** *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 1894-1898, **2017.**

[61] M.C. Agoramoorthy, V. Venkatesalu; M.J. Hsu, "antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from india g. "**.** *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 739-742, **2007**.

[62] **S. Belghit, E.H. Driche, C. Bijani**, **A. Zitouni, N. Sabaou**, **B. Badji**, **F. Mathieu**, **"**Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi**"**. *J. Mycologie Médicale* 26 (2), 160-169, **2016**.

[63] M.C. Rota, A. Herrera, R.M. Martínez, J.A. Sotomayor, M.J. Jordán, **"**Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils**"**. *Food Control* 19 (7), 681-687, **2008**.

[64] **K.G. Zinoviadou, K.P. Koutsoumanis, C.G. Biliaderis**, **"**Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef**"**. *Meat Science* 82 (3), 338-345, **2009**.

[65] **J.A. Takahashi, F.A.G.G. Rezende**, **M.A.F. Moura**, **L. Ciribelli, B. Dominguete**, **D. Sande**, **"**Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development**"**. *Food Research International* 129, 108868, **2020.**

[66] J. Katarzyna, J. Karolina, K. Patrycja, "Mineral Composition and Antioxidant Potential in the Common Poppy (*Papaver rhoeas* L.) Petal Infusions"**.** *Biol. Trace Elem. Res*. **2020** https://doi.org/10.1007/s12011-020-02134-7

[67] **E.M. Abdallah ; "**Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii***"**. *J. Acute Disease* 5 (6**)**, 512-516**, 2016**.

[68] C. A. Gomez-Aldapa, M. R. Torres-Vitela, M. A. Amaya-Acosta, E. Rangel-Vargas, A. Villaruel-Lopez, J. Castro-Rosas. "Behavior of thirteen foodborne bacteria on whole Hass avocado and potential of roselle calyx extracts as alternative disinfectant agents of avocado"**.** *J. Food Saf.* **37 (4), e12351, 2017**.

[69] V. Edwards-Jones, **"**Alternative antimicrobial approaches to fighting multidrug-resistant infections, Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**"**. Elsevier Inc., Amsterdam , pp. 1-9. **2013**

[70] K.S. Liu, S.M. Tsao, M.C. Yin; "In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid"**.** *Phytother. Res.* 19 (11), 942-945, **2005**.

[71] D. Jaroni, S. Ravishankar. "Bactericidal effects of roselle (Hibiscus sabdariffa) against foodborne pathogens in vitro and on romaine lettuce and alfalfa sprouts"**.** *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* 4, 33–40, **2012**.

[72] K.L. Moore, J.D. Patel, D. Jaroni, M. Friedman, S. Ravishankar. "Antimicrobial activity of apple, hibiscus, olive, and hydrogen peroxide formulations against Salmonella enterica on organic leafy greens"**.** *J. Food Prot.* 74, 1676–1683, **2011**.

[73] E.J. Gutierrez-Alcantara, C.A. Gomez-Aldapa, A.D. Roman-Guti Errez, E. Rangel-Vargas, L.G. Gonzalez-Olivares, J. Castro-Rosas, "Antimicrobial activity of roselle Hibiscus sabdariffa calyx extracts on culture media and carrots against multidrug-resistant Salmonella strains isolated from raw carrots"**.** *J. Food Saf.* **36 (4), 450-458, 2016.**

[74] E.J. Gutiérrez-Alcántara, E. Rangel-Vargas, C.A. Gómez-Aldapa, R.N. Falfan-Cortes, M. L. Rodríguez-Marín, A. Godínez-Oviedo, H. Cortes-López, J. Castro-Rosas, "Antibacterial effect of ´ roselle extracts (*Hibiscus sabadariffa*), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant Salmonella strains isolated from tomatoes"**.** *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 177–184, **2016**.

[75] E. Sorrentino, M. Succi, L. Tipaldi, G. Pannella, L. Maiuro, M. Sturchio, R. Coppola, P. Tremonte, "Antimicrobial activity of gallic acid against food-related pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles"**.** *Int. J. Food Microbiol.* 266 (2), 183-189, **2017**.

[76] R.W. Hemingway, P.E. Laks, "Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance"**.** 1st ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; Volume 59, **1992**.

[77] D.G. Deryabin, A.A. Tolmacheva, "Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus* cortex (Oak Bark) extract"**.** *Molecules* 20, 17093–17108, **2015**.

[78] M. Dettweiler, J. Lyles, K. Nelson, B. Dale, R. Reddinger, D. Zurawski, C. Quave, "American civil war plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and quorum sensing by multidrug-resistant bacteria"**.** *Sci. Rep.* 9 (1), 7692, **2019**.

[79] S. Tahmouzi, "Optimization of polysaccharides from zagros oak leaf using RSM: Antioxidant and antimicrobial activities"**.** *Carbohydr. Polym.* 106, 238–246, **2014**.

[80] Z. Moshfeghy, K. Asadi, M. Akbarzadeh, A. Zare, T. Poordast, M. Emamghoreishi, F. Najib, M. Sayadi, "Quercus brantii Lindl. vaginal douche versus clotrimazole on vaginal candidiasis"**.** *J. Pharmacopunct.* 21, 185–194, **2018**.

[81] A.A. Tayel, W.F. El-Tras, O.A. Abdel-Monem, S.M. El-Sabbagh, A.S. Alsohim, E.M. El-Refai, "Production of anticandidal cotton textiles treated with oak gall extract"**.** *Rev. Argent. Microbiol.* 45, 271–276, **2013**.

[82] S. Chusri, P. Na-Phatthalung, S. Voravuthikunchai, "Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus Aureus"**.** *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 511–517, **2012**.

[83] K.T. Chung, T.Y. Wong, C.I. Wei, Y.W. Huang, Y. Lin, "Tannins and human health: A review"**.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 421–464, **1998**.

[84] D. Zhou, Z.H. Liu, D.M. WangD.W. Li, L.N. Yang, W. Wang, "Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of valonia and shell from Quercus variabilis blume (Fagaceae) against *Salmonella* Paratyphi a and *Staphylococcus Aureus*"**.** *BMC Complement. Altern. Med*. 19 (1), 271, **2019**

[85] R, Khairon, N.M. Zin, M.A. Rahman, D.F. Basri, "Comparative proteomic analysis of differential proteins in response to aqueous extract of Quercus infectoria gall in methicillin-resistant staphylococcus aureus"**.** *Int. J. Proteomics* 2016, 4029172, **2016**.

[86] H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, K. Iwatsuki, "Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*"**.** *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 487–491, **2001**.

[87] S. Chusri, P. Na-Phatthalung, S. Voravuthikunchai, "Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus Aureus"**.** *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 511–517, **2012**.
[88] S. Sati, N. Sati, O.P. Sati, D. Biswas, B.S. Chauhan, "Analysis and antimicrobial activity of volatile constituents from *Quercus leucotrichophora* (Fagaceae) bark"**.** *Nat. Prod. Res.* 26, 869–872, **2011**.
[89]V.O. Dania, O.O.; Fadina, M. Ayodele, P.L. Kumar, "Efficacy of Oryza sativa husk and Quercus phillyraeoides extracts for the in Vitro and in Vivo control of fungal rot disease of white yam (Dioscorea Rotundata Poir) "**.** *Springer Plus* 3, 711, **2014**.
[90] L.C. Martínez, M. Rosillo, I. Villegas, M. Sánchez-Hidalgo, L. Hadidi, F. Zaidi, C. Lastra, "*Quercus ilex* extract ameliorates acute TNBS-induced colitis in rats"**.** *Planta Med.* 85 (81), 670-677, **2019**.
[91] J. ChokpaisarnN. Urao, S. Voravuthikunchai, T. Koh, "*Quercus infectoria* inhibits Set7/NF-KB inflammatory pathway in macrophages exposed to a diabetic environment"**.** *Cytokine* 94, 29-36, **2017**.
[92] J.L. Rios, R. Giner, M. Marin, M. Recio, "A pharmacological update of ellagic acid"**.** *Planta Med.* 84 (15), 1068-1093, **2018**.
[93] A.P. Pour, H. Farahbakhsh, "*Lawsonia inermis* L. leaves aqueous extract as a natural antioxidant and antibacterial product"**.** *Natural Product Research* **34 (23), 3399-3403, 2019**.
[94] K.K. Al-Rubiay, N.N. Jaber, L.K. Alrubaiy. "Antimicrobial efficacy of henna extracts"**.** *Oman Med J.* 23 (4) , 253–256, **2008**.
[95] O.A. Habbal, A.A. Al-Jabri, A. El-Hag Z.H. Al-Mahrooqi, N.A. Al-Hashmi, "In-vitro antimicrobial activity of Lawsonia inermis Linn (henna). A pilot study on the Omani henna"**.** *Saudi Med. J.* 26 (1), 69–72, **2005**.
[96] M.C. Cordoba-Pedregosa, J.M. Villalba, D. Gonzalez-Aragon, R.I. Bello, F.J. Alcain, "Cellular density and cell type are the key factors in growth inhibition induced by 2,5bis [1-aziridinyl]-1,4 benzoquinone (DZQ) "**.** *Anticancer Res.* 26 (5A), 3535–3540, **2006**.
[97] I. Gull, M. Sohail, M. Aslam, M. Athar, "Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of lawsonia inermis extracts against clinical isolates of pathogenic bacteria"**.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 12 (1), 36, **2013**.

# Chapitre 6: Valorisation des extraits de six plantes : détermination de leurs pouvoirs inhibiteurs de corrosion vis-à-vis de l'acier doux en milieu acide et respectueux de l'environnement

Dans le but d'évaluer l'effet inhibiteur de l'extrait méthanolique (soxhlet) de six plantes (*Punica granatum, Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonie inermis)* contre la corrosion de l'acier doux en milieu acide chlorhydrique HCl 1M, des essais électrochimiques ont été réalisés suivant les mêmes démarches évoquées dans le chapitre 2. Après stabilisation du potentiel libre de corrosion pendant 30 min, les diagrammes d'impédance ont été enregistrés à température ambiante, puis nous avons procédé au tracé des courbes de polarisation. Le balayage du potentiel a été effectué de façon continue de -800 mV jusqu'à -200 mV vs Ag/AgCl avec une vitesse de balayage suffisamment faible de l'ordre de 1 mV/s permettant d'assurer que le système étudié est quasi-stationnaire.

La vitesse de corrosion des différents extraits étudiés a été évaluée en utilisant la méthode gravimétrique qui dépend du facteur température. Ainsi, les paramètres cinétiques et thermodynamiques liés au processus d'inhibition de la corrosion ont été déterminés permettant à la fois de prévoir le comportement inhibiteur de ces composés de point de vue mécanisme d'action, et de suggérer le type d'interaction qui a eu lieu entre les molécules inhibitrices et la surface du métal. L'extraction des paramètres électrochimiques relatifs aux courbes de polarisation a été réalisée en adoptant la méthode de Tafel tout en se servant du programme EC-Lab. Le traitement des résultats de la spectroscopie d'impédance présentés dans le plan de Nyquist et de Bode a été effectué en utilisant le logiciel ZView.

## *I. **Effet de la concentration en inhibiteurs***

### *I. 1. Méthode de perte de masse*

La mesure gravimétrique a été utilisée comme première approche afin d'étudier l'effet inhibiteur de la corrosion des métaux en milieu acide. Cette dernière est caractérisée par sa simplicité et facilité d'utilisation et ne nécessitant pas beaucoup d'équipements. Le blanc a été préparé en faisant immerger l'acier doux pendant 6h à température ambiante (298K) et dans une solution d'acide chlorhydrique HCl 1M. Quant à chaque type d'inhibiteur, il a été préparé de la manière suivante : chacun des extraits méthanoliques (des six plantes évoquées ci-dessus) a été d'abord solubilisé dans HCl 1M à température ambiante (298K), dilué à quatre

concentrations différentes (1, 0.75, 0.5, et 0.25 g/L), puis additionné à l'acier en présence d'une concentration bien définie de l'extrait méthanolique faisant l'objet d'étude, et enfin immergé durant un temps de 6h. L'inhibiteur (acier + extrait) a été retiré, rincé soigneusement avec de l'eau bidistillée, nettoyé par ultrasons dans de l'acétone et enfin séché. Des expériences de gravimétrie ont été réalisées en triple sur chaque cas permettant de déterminer la valeur moyenne de l'efficacité inhibitrice calculée à partir de la relation (1) suivante :

$$\eta_W\% = \left(\frac{W - Wcorr}{W}\right) * 100 \qquad (1)$$

$\eta_W\%$ représente l'efficacité de l'inhibition, W et Wcorr représentent respectivement la vitesse de corrosion de l'acier après immersion, en absence ou en présence de l'inhibiteur.

Les résultats des vitesses de corrosion ainsi que le pourcentage de l'efficacité inhibitrice des différentes concentrations des extraits étudiés sont illustrés dans le tableau VI.1.

**Tableau VI.1.** Vitesses de corrosion et efficacités inhibitrices correspondant aux différentes concentrations des inhibiteurs au soxhlet pour la corrosion de l'acier dans HCl 1M à 298 °K.

| Milieu | *Conc* ($g.L^{-1}$) | $W_{corr}$ (mg. $cm^{-2}$. $h^{-1}$) | $\eta_W$ % |
|---|---|---|---|
| HCl 1M | ** | 0,8637 | * |
| *Punica g.* | 1 | 0,0877 | **94,8** |
| | 0,75 | 0,2225 | **91,4** |
| | 0,5 | 0,3211 | **89,6** |
| | 0,25 | 0,56 | **86,3** |
| *Rubia t.* | 1 | 0,0915 | **92,9** |
| | 0,75 | 0,2125 | **87,5** |
| | 0,5 | 0,3311 | **82,6** |
| | 0,25 | 0,6038 | **76,8** |
| *Papaver r.* | 1 | 0,0923 | **92,9** |
| | 0,75 | 0,1986 | **89,5** |
| | 0,5 | 0,3835 | **86,3** |
| | 0,25 | 0,8139 | **78,6** |
| *Hibiscus s.* | 1 | 0,0663 | **92,32** |
| | 0,75 | 0,1224 | **85,8** |
| | 0,5 | 0,1423 | **83,5** |
| | 0,25 | 0,2140 | **75,2** |
| *Quercus i.* | 1 | 0,1227 | **90,5** |
| | 0,75 | 0,2011 | **88,2** |
| | 0,5 | 0,3311 | **82,6** |
| | 0,25 | 0,9131 | **67,4** |
| *Lawsonia i.* | 1 | 0,1104 | **91,5** |
| | 0,75 | 0,1221 | **90,6** |
| | 0,5 | 0,1800 | **85** |
| | 0,25 | 0,2333 | **80,5** |

D'après les résultats du tableau VI.1, nous remarquons que la vitesse de corrosion a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration des extraits **au soxhlet** étudiés, indiquant que l'ajout de ces derniers ayant pour effet le retardement du processus de corrosion de l'acier. Ainsi, l'efficacité inhibitrice atteint des valeurs maximales de **94,8**% dans le cas de l'extrait de *Punica g.* et 93% dans le cas des deux autres relatifs à *Rubia t.* et *Papaver r.***,** suivie des deux extraits d'*Hibiscus s.* et de *Lawsonia i.*, avec des valeurs respectives de **92,3**%

et de 91,5%, et enfin, la valeur la plus faible de 90,5% a été attribuée à l'extrait de *Quercus i.* dont la concentration optimale est de 1 $g.L^{-1}$.

En se référant aux différents tracés de la figure 1, les six types d'extraits de concentrations variables (1, 0.75, 0.5, et 0.25 g/L) inhibent d'une manière globale la corrosion de l'acier doux. L'efficacité d'inhibition la plus importante a été corrélée à l'extrait le plus concentré qui diminue en fonction du degré de dilution.

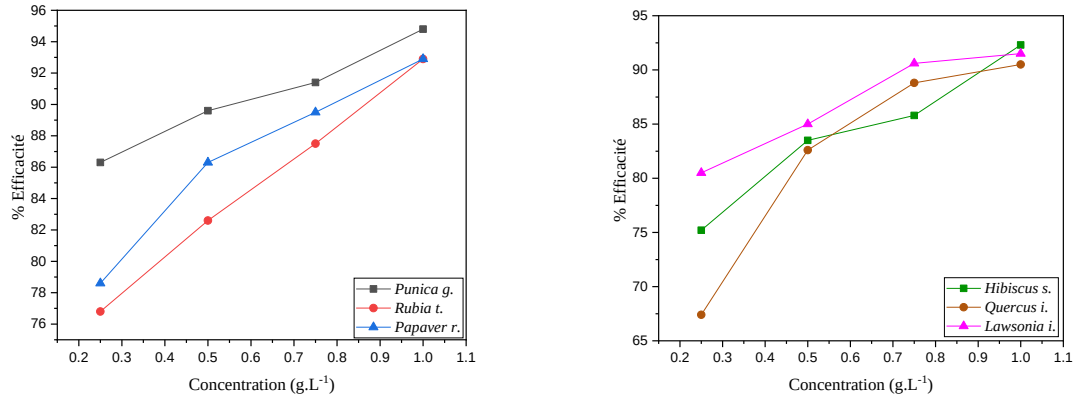



**Figure. VI.1.** Variation de l'efficacité d'inhibition (en milieu HCl 1M) sur la surface d'acier doux avec différentes concentrations des extraits au soxhlet (0.25, 0.5, 0.75 et 1 g/L).

Les résultats obtenus dans la figureV.1 révèlent que la perte en masse du métal et la vitesse de corrosion ($W_{corr}$) a progressivement diminué avec l'augmentation de la concentration des extraits, comme indiqué dans le tableau VI.1., et ce après 6 heures d'immersion dans l'acier à une température de 298K.

La dissolution de l'acier doux en milieu acide a été démontrée sous forme d'une réaction électrochimique par Benabdellah et al (2010) [1] et ce depuis bien une décennie. Ceci est justifié par les deux réactions suivantes qui ont eu lieu: oxydation (1) et réduction (2). Toutes ces réactions, y compris la grande solubilité des produits de corrosion, résultent de la perte de masse de l'acier.

$$Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^{-} \qquad \text{réaction d'Oxydation (1)}$$

$$2H^{+} + 2e^{-} \rightarrow H2 \qquad \text{réaction de Réduction (2)}$$

Il est à noter que les différents extraits peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs efficaces de la corrosion de l'acier doux dans le milieu HCl 1M. Ces propriétés d'inhibitrices sont dues à la richesse des six extraits de plantes en polyphénols, flavonoïdes et tanins (voir chapitre 3)

présentant des hétéroatomes (e- ‘‘n’’) conjugués avec les orbitales de type ‘‘π’’, responsables de la réduction du taux de corrosion en exerçant un blocage des sites actifs. Ces résultats ont en bon accord avec de nombreuses études récentes rapportées par la littérature [2-4].

### *I.2. **Courbes de polarisation***

Les courbes de polarisation de l'interface métal-solution présentent une caractéristique fondamentale de la cinétique électrochimique, mais ne rendent compte que de l'étape la plus lente du processus global à l'interface électrochimique (transport de matière, adsorption des espèces sur l'électrode …). Le dispositif utilisé pour le tracé des courbes de polarisation repose sur une cellule à trois électrodes, celle de Ag/AgCl est utilisée comme électrode de référence, puis une autre électrode de travail constituée d'un échantillon d'acier doux, et enfin, le fil de platine a été utilisé comme électrode auxiliaire. Pour déterminer les courbes de polarisation, différents potentiels ont été appliqués à l'électrode de travail grâce à l'électrode de platine (contre électrode), par le biais d'un protocole de balayage imposant l'incrément.

Les segments linéaires de Tafel des courbes anodiques et cathodiques ont été extrapolés pour obtenir les densités de courant de corrosion ($i_{corr}$) et le potentiel de corrosion ($E_{corr}$).

La figure VI. 2., présente les courbes de polarisation potentiodynamique de l'acier doux dans une solution acidique (HCl 1M), en absence et en présence des différentes concentrations des extraits des six plantes (0,25 à 1 $g.l^{-1}$) à la température de 298K. L'acier doux a été exposé à des solutions d'essais pendant 30 min en disposition de l'électrode pour l'étude.

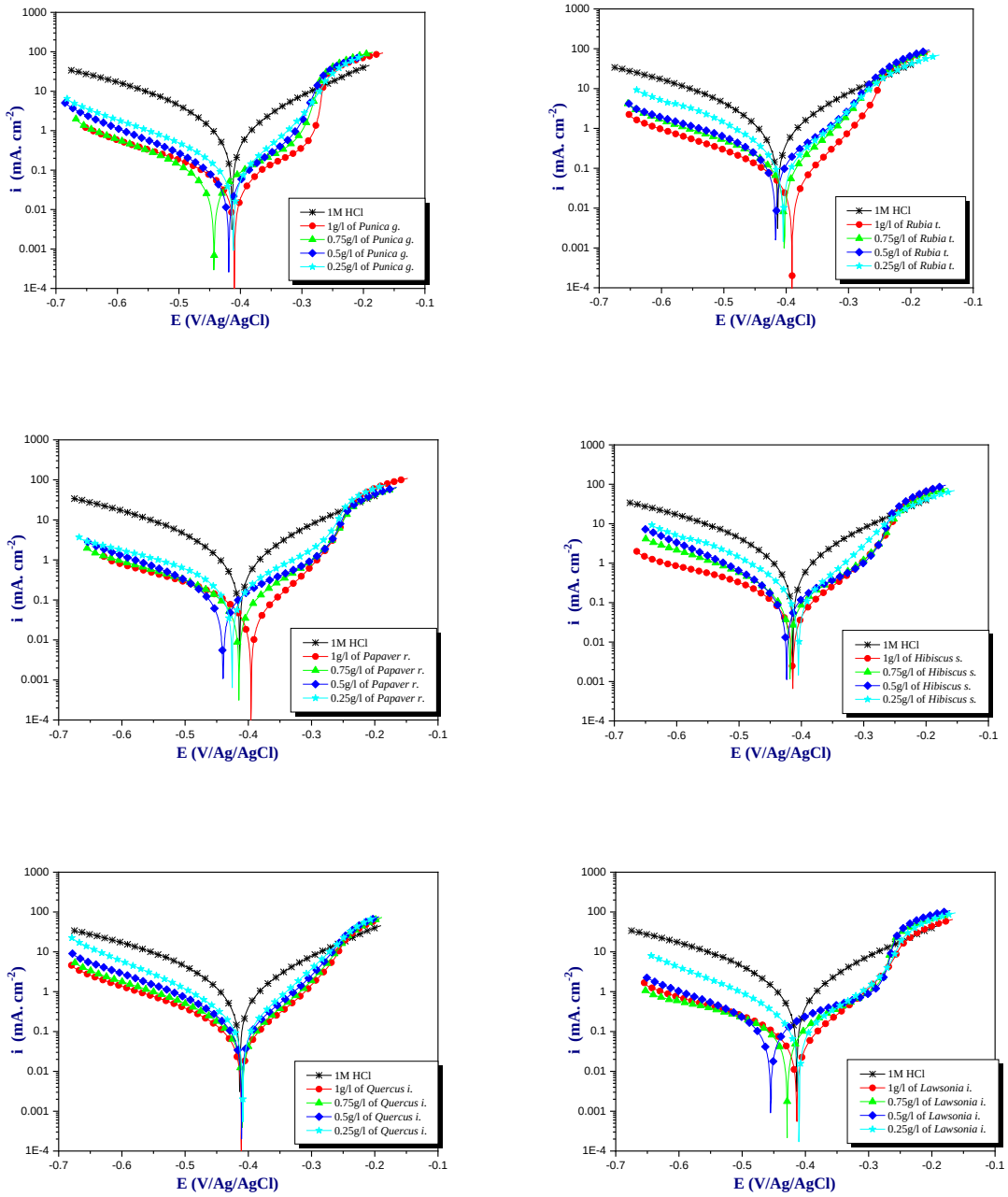



**Figure.VI.2**. Courbes de polarisation de l'acier dans HCl 1M sans et avec addition de différentes concentrations des inhibiteurs au soxhlet de *Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonie i.*

D'après la Figure VI.2., le courant de corrosion ($i_{corr}$) diminue avec l'augmentation de la concentration des différents extraits dans le milieu. Des changements significatifs dans les pentes de Tafel cathodique et anodique (aussi bien dans le blanc qu'en présence des extraits) ont été remarqués. On a également comparé les différentes concentrations de l'inhibiteur. Ces

résultats indiquent que les extraits des plantes étudiées ont ralenti les réactions anodiques et cathodiques.

En se référant à la Figure VI.2 relative au blanc et aux extraits au soxhlet, le potentiel de corrosion se déplaçait vers une valeur négative plus élevée et la courbe cathodique décalait à une densité de courant plus faible. Ceci est dû à l'adsorption des extraits inhibiteurs au niveau de la surface de corrosion de la cathode active et à la réduction de la vitesse de corrosion. Il est à noter que par rapport à βc, lorsque la concentration de l'inhibiteur augmente, la branche d'anode est décalée vers un courant corrosif plus faible. Cela signifie que la réaction d'inhibition au niveau de la cathode est prédominante.

L'analyse de la courbe de polarisation a montré qu'en présence de différents inhibiteurs, la région anodique ne présente pas un comportement de Tafel. Cependant, la région cathodique présente une large gamme linéaire, indiquant que la loi de Tafel est bien présente dans le champ de la cathode. Un bon contrôle indique que ces composés naturels réduisent l'anode, dissolvent et inhibent ainsi la réaction de réduction de l'hydrogène, ceci est en faveur d'une réaction contrôlée par une cinétique d'activation pure [5-8].

Pour tirer profit des résultats relatifs à la courbe de polarisation, la méthode d'extrapolation directe de Tafel a été adoptée. Cette dernière nous a permis d'extraire les paramètres électrochimiques afin d'obtenir des informations sur la cinétique du processus de corrosion, comme la densité du courant de corrosion $i_{corr}$, le potentiel de corrosion $E_{corr}$, les pentes d'anode et de cathode, et la résistance de polarisation.

*I.2.1. Paramètres électrochimiques issus des méthodes de Tafel*

Les données électrochimiques issues de la méthode de Tafel comme, le potentiel de corrosion ($E_{corr}$), la densité de courant de corrosion ($i_{corr}$) et les pentes de Tafel cathodiques et anodiques (ßc et ßa) qui régissent la corrosion et l'efficacité inhibitrice sont illustrés dans le tableau VI.2 suivant.

**Tableau VI.2**: Paramètres électrochimiques issus des courbes de polarisation

| *Milieu* | *Conc* ($g.l^{-1}$) | $-E_{corr}$ (*mV/Ag/AgCl*) | $i_{corr}$ ($\mu A.\ cm^{-2}$) | $-\beta_c$ ($mV.\ dec^{-1}$) | $\eta_{PDP}$ % |
|---|---|---|---|---|---|
| HCl 1M | ** | 413 | 944 | 139 | ** |
| *Punica g.* | 1 | 410 | 36 | 120 | **96,2** |
| | 0,75 | 442 | 49 | 127 | **93,5** |
| | 0,5 | 420 | 65 | 128 | **93,1** |
| | 0,25 | 413 | 99 | 123 | **89,5** |
| *Rubia t.* | 1 | 390 | 47 | 129 | **95,0** |
| | 0,75 | 404 | 98 | 127 | **89,6** |
| | 0,5 | 416 | 145 | 130 | **84,6** |
| | 0,25 | 404 | 217 | 119 | **77,0** |
| *Papaver r.* | 1 | 395 | 45 | 121 | **95,2** |
| | 0,75 | 415 | 70 | 123 | **92,5** |
| | 0,5 | 439 | 102 | 124 | **89,1** |
| | 0,25 | 427 | 158 | 128 | **82,2** |
| *Hibiscus s.* | 1 | 414 | 69 | 122 | **92,7** |
| | 0,75 | 418 | 125 | 121 | **86,7** |
| | 0,5 | 424 | 150 | 120 | **84,1** |
| | 0,25 | 403 | 218 | 120 | **76.8** |
| *Quercus i.* | 1 | 410 | 76 | 124 | **91,9** |
| | 0,75 | 410 | 101 | 127 | **89,3** |
| | 0,5 | 411 | 141 | 123 | **85,0** |
| | 0,25 | 409 | 257 | 137 | **71,7** |
| *Lawsonia i.* | 1 | 414 | 53 | 122 | **94,4** |
| | 0,75 | 428 | 63 | 123 | **93,3** |
| | 0,5 | 456 | 109 | 128 | **88,4** |
| | 0,25 | 409 | 163 | 120 | **82,7** |

*Conc: concentration;* $-E_{corr}$ *:* potentiel de corrosion. *;* $i_{corr}$ *:* densité de courant de corrosion*;* $-\beta_c$ *: pente cathodique.;* $\eta_{PDP}$ *:efficacité;*

Il ressort de ces résultats que la valeur du courant de corrosion ($i_{corr}$) diminue fortement avec l'augmentation de la concentration des extraits. Cependant, l'efficacité d'inhibition ηpp (%) augmente lorsque la concentration d'inhibiteur augmente. L'efficacité la plus importante a été révélée dans le cas de l'extrait de *Punica g.* avec une valeur de **96.2**%, suivie de celles des trois extraits suivants : *Papaver r.* (95.2%) avec une concentration optimale de $1g.l^{-1}$, *Rubia t.* (95%) et *Lawsonia i.* (94.4%). Des valeurs relativement faibles ont été enregistrées dans le cas

des extraits d'*Hibiscus s*. et *Quercus i.*, avec des valeurs respectives de 92.7 et 91.9%. La valeur de l'efficacité inhibitrice obtenue à partir de la courbe de polarisation a été confrontée à celle de $W_{corr}$ (vitesse de corrosion de l'acier après immersion et en présence de l'inhibiteur) mesurée à partir de la perte de masse, et se sont montrées concordantes. Ceci indique que les extraits couvrent la majeure partie de la surface lisse de l'acier. En outre, le potentiel de corrosion obtenu dans la solution non inhibée, le potentiel de corrosion en présence de l'extrait est inférieur à 85 mV. Ce résultat renseigne sur la présence des inhibiteurs de type mixtes. De plus, la courbe cathodique de Tafel présente des lignes parallèles, indiquant que la réaction de l'hydrogène est contrôlée par un mécanisme d'activation pur, et l'ajout d'inhibiteurs n'affecte pas le mécanisme de réduction de l'hydrogène, mais provoque un blocage au niveau de la surface métallique [9].

Le mécanisme de libération de protons qui est une réaction cathodique permet de réduire les cations hydrogène en $H_2$. Il est connu que cette réaction nécessite le passage par deux étapes consécutives, la première concerne le mécanisme réactionnel spécifique à la décharge (ou réaction de Volmer), et le second est purement chimique ou électrochimique, comme justifié par les réactions suivantes.

$$H_{ads}^{+} + M + e^{-} \longrightarrow MH_{ads} \text{ (Réaction de Volmer)}$$

Il existe différentes opinions sur la deuxième étape, soit purement chimique:

$$2\,MH_{ads} \longrightarrow H_2 + 2M \quad \text{(Réaction de Tafel)}$$

ou suit un mécanisme électrochimique :

$$MH_{ads} + H^{+} + e^{-} \longrightarrow H_2 + M \text{ (Réaction d'Heyrovsky)}$$

Dans notre cas, la courbe cathodique est représentée par la droite de Tafel indiquant la réaction de réduction de l'hydrogène sur la surface de l'acier, et donc la réaction est basée sur un mécanisme d'activation pur. L'ajout des extraits méthanoliques dans un environnement corrosif entraînera un léger changement au niveau de la pente de la ligne de Tafel (ßc) (tableau VI.2). Ce résultat nous amène à suggérer que le mécanisme de réduction des protons (étape la plus lente) n'est pas modifié par l'ajout des extraits, et donc, ce dernier suit le modèle de Heyrovsky (basé sur la valeur de ßc).

Les résultats rapportés (tableau VI.2) indiquent que l'inhibiteur élimine la dissolution du fer, alors que la variation de la pente cathodique de Tafel suggère la suppression de la réaction

d'évolution de l'hydrogène en présence des extraits. Par ailleurs, la densité du courant de corrosion a été sensiblement réduite lors du passage du blanc en milieu HCl 1M (944 $\mu A.cm^{-2}$) envers les extraits de *Punica g. (*36 $\mu A.cm^{-2}$*), Papaver r.* (45 $\mu A.cm^{-2}$), *Rubia t.* (47 $\mu A.cm^{-2}$) et *Lawsonia i.* (53 $\mu A.cm^{-2}$ ). Des valeurs relativement élevées ont été révélées dans le cas des deux extraits *Hibiscus s.* et *Quercus i.,* avec des valeurs respectives de 69 et 76 $\mu A.cm^{-2}$. Il est à signaler aussi que l'efficacité de l'inhibition de la corrosion est augmentée et dépend de l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Ceci est prouvé lors de l'étude de l'augmentation de la couverture de la surface par des molécules présentes dans les extraits inhibiteurs, formant un film protecteur d'absorption stable et durable au niveau de la surface métallique, réduisant ainsi la vitesse de corrosion.

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types d'inhibiteurs naturels de la corrosion [10] lors de l'ajout de l'extrait des feuilles de *Ficus tikoua*. Ce dernier a diminué la densité du courant de corrosion ($i_{corr}$) qui est due à l'adsorption de l'inhibiteur au niveau de la surface du métal en milieu acide. L'efficacité maximale de la corrosion a été obtenue avec une concentration de 0.2 $g.l^{-1}$. Ce résultat était en bon accord avec la mesure de la perte de masse [10].

Les résultats ainsi obtenus ont permis d'enregistrer de meilleures performances de nos extraits, probablement liées à leurs richesses par les constituants de types : polyphénols, flavonoïdes, tanins et alcaloïdes. Il a été rapporté récemment (en 2019) que la présence des hétéroatomes azotés, oxygénés, soufrés ainsi que des systèmes aromatiques conjugués sont responsables des phénomènes d'adsorption [11-13]. L'inhibition de la corrosion est causée aussi par le déplacement des molécules d'eau qui inhibent l'absorption des substances, ce qui provoque l'adsorption spécifique d'inhibiteurs [14]. Belakhdar et al. (2020) ont rapporté une activité inhibitrice efficace dans le cas des extraits de *Rosmarinus* [15]. Hanini et al ont évalué l'influence de différents extraits polyphénoliques de *Taxus baccata* sur le processus de corrosion et de leur effet comme additifs dans l'électrodéposition. Ces composés phytochimiques abondants et très actifs peuvent être considérés comme une source importante d'inhibiteurs naturels [16].

Cependant, cette technique électrochimique stationnaire reste encore insuffisante dans la caractérisation des mécanismes complexes, présentant à la fois des étapes de réaction différentes et des caractéristiques cinétiques différentes (qui interviennent lors de l'inhibition

de la corrosion). C'est pourquoi l'utilisation de la technique transitoire est de plus en plus sollicitée, et qui fera l'objet de notre étude dans le paragraphe suivant.

### *I. 3. **La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)***

La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) a été aussi réalisée, ayant l'avantage d'éviter de grave détériorations au niveau de la surface de l'acier exposée au milieu acide corrosif, et de confirmer d'une part les résultats déjà obtenus par les mesures précédentes en recueillant plus d'informations sur le mécanisme d'inhibition, et d'autre part, d'évaluer les propriétés diélectriques du film formé sur la surface de l'acier, et enfin, permet de suivre l'évolution de divers paramètres du spectre. Les diagrammes de Nyquist et Bode obtenus à la température de 298 °K, en absence et en présence de différentes concentrations des extraits étudiés sont illustrés sur la figure VI.3. La résistance de transfert de charge a été calculée sur la base de la différence d'impédance dans la gamme de fréquences sélectionnées entre 100 KHz et 10 mHz, qui est excitée de manière sinusoïdale avec une amplitude de 10 mV afin de s'assurer de la linéarité électrochimique du champ magnétique (Tsuru et Haruyama [17]).

#### *I.3.1. Diagrammes d'impédance dans le plan de Nyquist et de Bode*

La corrosion de l'acier doux dans un environnement corrosif en présence des inhibiteurs naturels à des concentrations de 0.25, 0.5, 0.75 et 1 $g.l^{-1}$ a été étudiée à une température de 298 °K. Les calculs de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été effectués en utilisant les signaux sinusoïdaux de l'amplitude crête à crête de 10 mV dans la gamme de fréquences de 100 KHz à 10 mHz du potentiel de corrosion. Les données d'impédance ont été ajustées aux circuits électriques équivalents (CEE) appropriés en utilisant le logiciel versa studio.

Les tracés (diagrammes) de Nyquist et Bode de l'acier doux en milieu corrosif (HCl 1 M) et lors de l'ajout des inhibiteurs de différentes concentrations (extraits de **:** *Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*), sont montrés dans la **figure** VI.3.

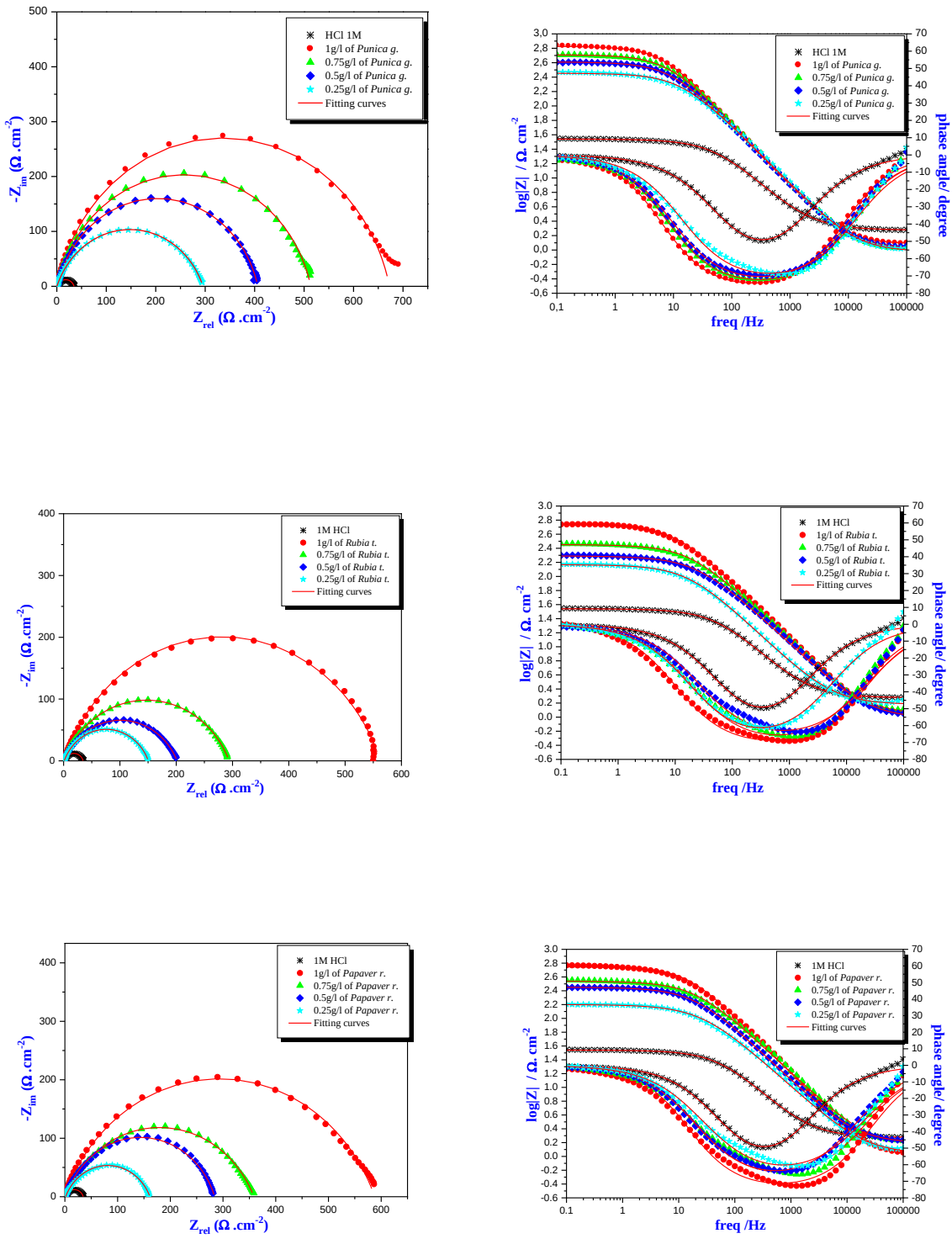



**Figure VI.3.1.** Diagrammes de Nyquist et Bode de l'interface acier HCl 1M sans et avec addition des inhbiteurs *Punica g.*, *Rubia t.*, *Papaver r.* à différentes concentrations à 25°C.

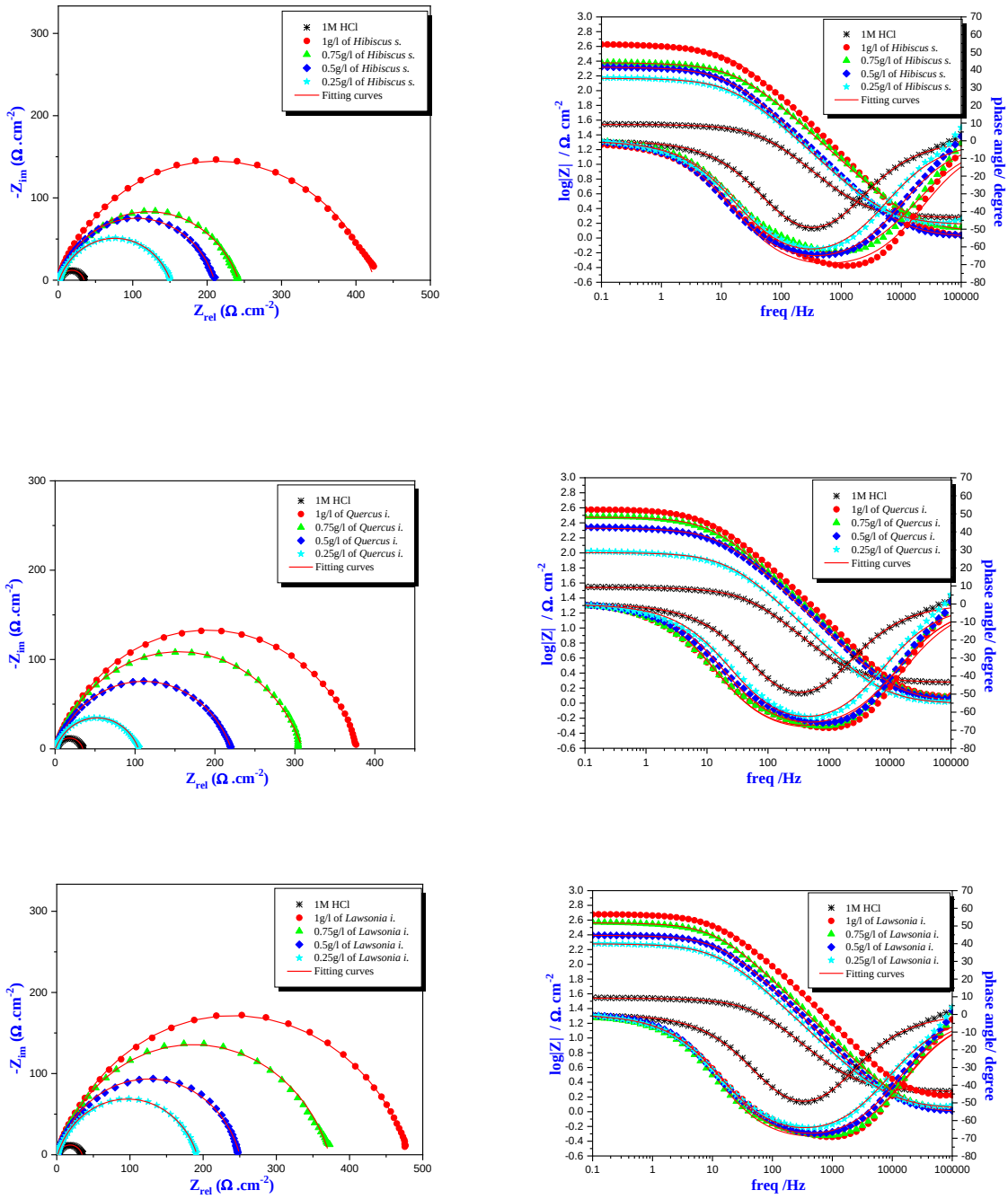



**Figure VI.3.2.** Diagrammes de Nyquist et Bode de l'interface acier HCl 1M sans et avec addition des inhbiteurs *Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.* à différentes concentrations à 25°C.

D'après les diagrammes des **figures** VI.3.1 et VI.3.2, on note que la taille des demi-cercles augmente avec l'augmentation de la concentration des inhibiteurs, ceci est justifié par la formation d'un film au niveau de la surface de l'acier qui est du à la contribution des inhibiteurs, et qui est plus important (avec des demi-cercles plus larges) lorsque la

concentration est élevée (disponibilité des molécules d'inhibiteurs sur la surface de l'acier)., Lorsque les demi-cercles ne sont pas parfaits ce qui signifie qu'en raison de l'inégalité de la surface de l'électrode**,** absence de dispersion de la fréquence d'impédance à l'interface (Quraishi et al 2014 [18]). Cette hétérogénéité pourrait être due à la rugosité, impuretés, dislocations, adsorption d'inhibiteurs et enfin à la formation de couches poreuses (Zheng et al., 2014 [19]). Ce phénomène peut s'expliquer à la fois par la présence de la charge électronégative des hétéroatomes (oxygènes phénoliques) contenus dans les extraits et la charge électropositive sur la surface de l'acier [20]. Les résultats de la solution du blanc ont montré que le plus petit demi-cercle est comparé aux résultats de différentes concentrations d'inhibiteurs. Cela indique qu'il y a une grande résistance à la charge car la concentration en étant augmentée, ce qui prouve que les extraits méthanoliques des différentes plantes naturelles inhibent la corrosion de l'acier lorsqu'ils sont ajoutés à des milieux corrosifs.

Le circuit électrique équivalent a été utilisé pour ajuster les données expérimentales (impédance) sur les extraits. Les inhibiteurs de corrosion sont représentés dans la figure ci-dessus V.3. Élément $R_1$ correspondent à la résistance de la solution (Rs), tandis que l'élément R2 correspond au transfert de charge ($R_p$) en interface de phase et est inversement proportionnelle à la vitesse de corrosion et à la surface soumise à la corrosion. Les éléments CPE C1 et C3 caractérisent une dépression de la capacité de double couche liée à la capacité de la surface du matériau de rugosité de surface complexe, avec des taux de réaction inhomogènes sur la surface et de distribution de courant non uniforme.

### *V.1.3.2. **Paramètres d'impédance électrochimique***

Les valeurs des paramètres électrochimiques issus de l'ajustement paramétrique des diagrammes d'impédance relatifs aux différents inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*) ainsi que l'efficacité d'inhibition (η %) de la corrosion de l'acier en présence de différentes concentrations des six extraits (milieu HCl 1M) ont été obtenus par la méthode stationnaire d'impédance et sont résumés dans le tableau VI.3. l'efficacité d'inhibition de la corrosion de l'acier a été calculée à partir de $R_p$ en se basant sur l'équation suivante :

$$\eta\,(\%) = \frac{Rp - Rp(inb)}{Rp} * 100 \qquad (2)$$

où $R_p$ et $R_p$(inh) : représentent les résistances au transfert de charge de l'acier sans et avec inhibiteurs après immersion.

**Tableau VI.3**: Paramètres électrochimiques issus des diagrammes d'impédance relatifs à l'acier doux dans HCl 1M puis en présence des inhibiteurs testés (*Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*)

| *Inhibiteurs* | *Conc* ($g.l^{-1}$) | $R_s$ ($\Omega.cm^2$) | $R_p$ ($\Omega.cm^2$) | *CPE* | | $C_{dl}$ ($\mu F.\ cm^{-2}$) | $\Theta$ | $\eta_{imp}$ % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $Q$ ($\mu F.\ S^{n-1}$) | $n_{dl}$ | | | |
| HCl 1M | ** | 1,7 | 33 | 312,7 | 0,784 | 89,1 | ** | ** |
| *Punica g.* | 1 | 0,3 | 672,3 | 63,1 | 0,862 | 38,1 | 0,951 | **95,1** |
| | 0,75 | 0,7 | 512,7 | 69,5 | 0,854 | 39,3 | 0,935 | **93,5** |
| | 0,5 | 1,4 | 405 | 78,2 | 0,852 | 43,0 | 0,918 | **91,8** |
| | 0,25 | 0,2 | 295,3 | 115,9 | 0,7792 | 44,5 | 0,888 | **88,8** |
| *Rubia t.* | 1 | 1,5 | 560,5 | 72,5 | 0,791 | 31,2 | 0,941 | **94,1** |
| | 0,75 | 0,4 | 293,6 | 103,9 | 0,751 | 32,8 | 0,888 | **88,8** |
| | 0,5 | 0,6 | 200,9 | 130,1 | 0,738 | 35,8 | 0,836 | **83,6** |
| | 0,25 | 1,1 | 149,3 | 197,2 | 0,763 | 66,1 | 0,779 | **77,9** |
| *Papaver r.* | 1 | 1,6 | 589,4 | 61,9 | 0,764 | 22,3 | 0,944 | **94,4** |
| | 0,75 | 0,8 | 357,8 | 82,9 | 0,745 | 24,9 | 0,908 | **90,8** |
| | 0,5 | 2,1 | 281,9 | 79,1 | 0,795 | 29,7 | 0,883 | **88,3** |
| | 0,25 | 1,4 | 159,9 | 141,1 | 0,750 | 39,9 | 0,794 | **79,4** |
| *Hibiscus s.* | 1 | 0,5 | 426,2 | 84,8 | 0,760 | 29,8 | 0,922 | **92,2** |
| | 0,75 | 1,5 | 240,7 | 106,5 | 0,771 | 35,9 | 0,863 | **86,3** |
| | 0,5 | 1,1 | 208,6 | 143 | 0,797 | 58,6 | 0,842 | **84,2** |
| | 0,25 | 1,1 | 149,3 | 197,2 | 0,763 | 66,1 | 0,779 | **77,9** |
| *Quercus i.* | 1 | 0,6 | 380,1 | 91,9 | 0,777 | 35,2 | 0,913 | **91,3** |
| | 0,75 | 0,7 | 308,5 | 110 | 0,782 | 42,9 | 0,893 | **89,3** |
| | 0,5 | 0,6 | 219,7 | 131,5 | 0,768 | 45,1 | 0,849 | **84,9** |
| | 0,25 | 0,4 | 104,1 | 241,6 | 0,748 | 70,0 | 0,683 | **68,3** |
| *Lawsonia i.* | 1 | 1 | 480,4 | 61,7 | 0,789 | 24,2 | 0,931 | **93,1** |
| | 0,75 | 0,8 | 371,6 | 87,5 | 0,803 | 37,9 | 0,911 | **91,1** |
| | 0,5 | 1,4 | 248,4 | 102,5 | 0,821 | 46,2 | 0,867 | **86,7** |
| | 0,25 | 1,2 | 190,3 | 155,3 | 0,796 | 63,2 | 0,826 | **82,6** |

Conc: concentration; $R_s$ : résistance de la solution. ; $R_p$ : résistance potentiel. ; Q : element phase canstant ; $n_{dl}$ : facteur d'etherogenite $C_{dl}$ : capacité double couche ; $\Theta$ : taux de recouverement ; $\eta_{imp}$ : efficacité;

D'après les résultats du tableau VI.3, au fur et à mesure que la concentration de l'extrait inhibiteur augmente, la valeur de $R_p$ devient de plus en plus importante, donnant lieu à une efficacité inhibitrice ($\eta_{imp}$) plus élevée dans le cas de *Punica g.*, pouvant atteindre la valeur de 95,1% à la concentration de 1 g/l au lieu de 88,8% dans une concentration de 0,25 g/l. D'autres valeurs relativement élevées et presque similaires ont été enregistrées dans le cas des

extraits de *Papaver r.* (94,4%) et de *Rubia t.* (94,1%). Des valeurs intermédiaires ont été affichées dans le cas des deux extraits de *Lawsonia i.* (93,1%) et *Hibiscus s.* (92,2%). Il est à signaler que l'efficacité inhibitrice la plus faible est attribuée à l'extrait de *Quercus i.* avec une valeur de 91,3%.

Avant ajout de l'extrait (*ie* blanc), la capacité de double couche ($C_{dl}$) est de 89,1 µF.cm$^{-2}$, cette dernière a diminué progressivement des extraits les moins concentrés jusqu'au plus concentrés, atteignant les valeurs respectives de 38.1, 35.26, 31.2, 29.8, 24.2 et 22,3 µF.cm$^{-2}$ correspondantes aux concentrations les plus optimales (1g/l) de *Punica g., Quercus i., Rubia t., Hibiscus s., Lawsonia i.* et *Papaver r.* Cette réduction est liée à l'adsorption sur la surface de l'acier des molécules organiques contenues dans les différents extraits étudiés [21]. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par El Hamdani et al. en 2015 [22]. D'après l'expression de la capacité double couche exprimée par le modèle d'Helmotz [22], plus l'inhibiteur est adsorbé, plus l'épaisseur du dépôt organique est augmentée, et plus la réduction de la capacité double couche est importante :

$$C_{dl} = \frac{\varepsilon^{\circ}\varepsilon}{e} S \qquad (3)$$

avec : $\varepsilon^{0}$ : permittivité du milieu, $\varepsilon$: constante diélectrique constante, **e**: épaisseur du dépôt et **S**: surface de l'électrode.

### *I.3.3. Comparaison de l'efficacité inhibitrice (η %) par méthodes : gravimétrique, polarisation et impédance*

La figure VI.4 suivante, illustre la variation de l'efficacité inhibitrice ($\eta$ %) de six extraits (en milieu HCl 1M) de concentration 1, 0,75 ; 0,5 et 0,25 g.L$^{-1}$, déterminée selon les trois méthodes suivantes : gravimétrique, courbe de polarisation et spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). Un bon accord entre la valeur $\eta$ (%) déterminée par la méthode gravimétrique et la valeur $\eta$ (%) obtenue par mesure électrochimique. L'efficacité d'inhibition déterminée par la courbe de polarisation (mesure instantanée) s'est montrée supérieure à celles déterminées par les deux autres méthodes (gravimétrie et mesure électrochimique) et ce dans le cas de tous les extraits, atteignant la valeur maximale de 96,4% dans le cas de l'extrait de *Punica g*. Elle est suivie par celle issue de la technique d'impédance (exception faite sur l'*Hibiscus*). Les valeurs les plus faibles ont été corrélées à la méthode gravimétrique. La différence notée peut être attribuée au temps d'immersion plus court ne dépassant pas les 2 heures lors de l'étude électrochimique reflétant ainsi que le comportement à la corrosion se trouve au stade initial. Cependant, lorsqu'on applique un temps d'immersion prolongé de 6

heures, un film protecteur plus épais se forme dans les deux premiers (courbe de polarisation et **spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS))** justifiant la différence entre les valeurs obtenues.

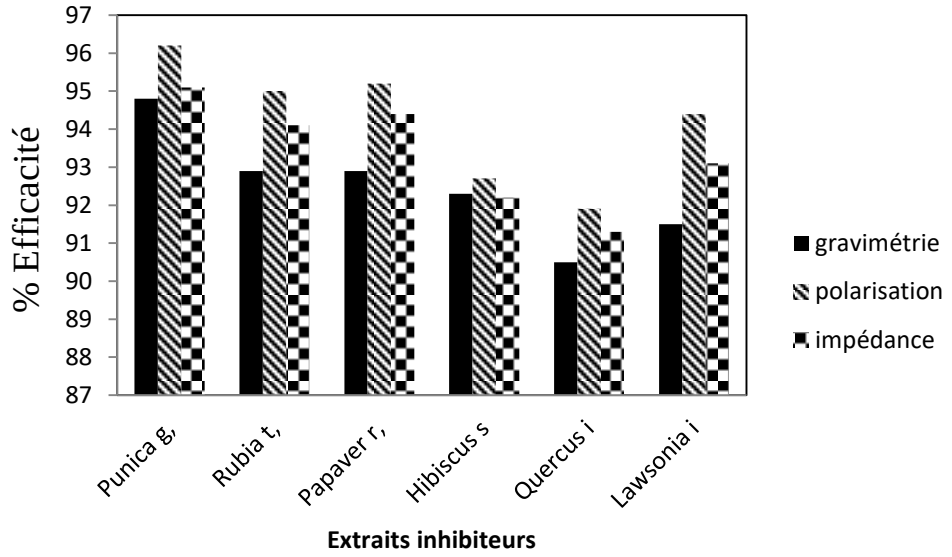



**Figure VI. 4.** Comparaison de l'efficacité inhibitrice ($\eta$ %) de six extraits à différentes concentrations (HCl 1M) selon les trois méthodes : gravimétrie, polarisation et impédance.

L'analyse du spectre d'impédance peut associer la grandeur physique représentative à chaque étape observable sur le graphique de Nyquist et/ou de Bode. Ceci peut être réalisé en proposant un circuit électrique équivalent (CEE) composé de nombreux éléments simples permettant de modéliser le spectre. Les éléments les plus couramment utilisés sont:

- ✓ résistance d'impédance $R_p$, modélisée par sa partie réelle (indépendante de la pulsation) ;
- ✓ capacité d'impédance : $ZC = -j / C\omega$ ;
- ✓ inductance d'impédance : $ZI = jL\omega$.

L'interprétation du diagramme par le circuit électrique équivalent doit remplir deux conditions fondamentales: tous les composants du circuit doivent avoir des significations physiques précises liées aux caractéristiques physiques du système et que le spectre analogique du circuit électrique équivalent doit être aussi fidèle que possible au spectre expérimental et l'erreur ne doit pas être systématisée comme une fréquence.

Des études antérieures sur le mécanisme d'inhibition par mesure d'impédance électrochimique [23-25] semblent prouver que cette technique est particulièrement adaptée pour déterminer le

mode d'action des inhibiteurs, tout en évaluant les propriétés diélectriques du film formé et permet le traçage en fonction de nombreux paramètres. Cela permet d'expliquer les processus chimiques ou électrochimiques qui se produisent à travers le film formé.

Dans notre cas, à partir du diagramme d'impédance, nous pouvons accéder à la résistance de transfert de charge ($R_p$) et à la capacité de double couche ($C_{dl}$), de sorte que la vitesse de corrosion dans les conditions de fonctionnement utilisées peut être dérivée. Comme il a été suggéré par Tsuruu et Haruyama [17], le $R_p$ peut être calculé par la différence entre les impédances de haute et basse fréquence localisées sur l'axe des réels, et $C_{dl}$ peut être déterminé par la fréquence à laquelle la partie imaginaire de l'impédance est la plus grande (-Z''max). La valeur $C_{dl}$ est calculée à l'aide de la formule suivante (4):

$$f(-Z'' \max) = \frac{1}{2\pi \mathrm{CdlRt}} \qquad (4)$$

Le circuit électrique équivalent utilisé pour ce système a été décrit par Liao et al. en 2017 [26] et illustré dans la Figure VI.5 ci-dessous:

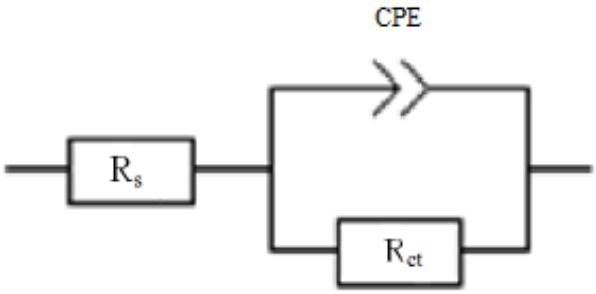



**Figure. VI. 5.** Circuit électrique équivalent obtenu pour modéliser les boucles de Nyquist (comportement de l'acier doux en milieu HCl 1M).

*I.2. Paramètres thermodynamiques d'adsorption*

Les résultats expérimentaux obtenus par la méthode d'impédance ont été testés sur quatre types d'isothermes d'adsorption suivants : **Langmuir, Freundlich, Frumkin** et **Timken** afin d'avoir des informations sur le devenir du processus d'adsorption des extraits testés au niveau de la surface de l'acier doux [27]. Les équations linéaires décrivant ces isothermes sont représentées par les relations suivantes de (5) à (8):

Isotherme de **Langmuir**: $$\frac{C_{inh}}{\theta} = \frac{1}{K} + C_{inh} \qquad (5)$$

Isotherme de **Freundlich** : $$\ln\theta = \ln K + \frac{1}{n} \ln C_{inh} \qquad (6)$$

Isotherme de **Frumkin** : $$\ln\left(\frac{C_{inh}(1-\theta)}{\theta}\right)=-\ln K-2a\theta \qquad (7)$$

Isotherme de **Timken**: $$\theta=\frac{-1}{2a}\ln(K)-\frac{1}{2a}\ln(C_{inh}) \qquad (8)$$

où

**θ** : représente le degré de couverture de la surface, $C_{inh}$ : concentration d'inhibiteurs, **K** : constante d'équilibre du processus d'adsorption/désorption, **n** : constantes de Freundlich indiquant la capacité d'adsorption et l'intensité d'adsorption, **a**: interactions latérales moléculaires : une valeur de **a** > 0 indique une attraction, tandis qu'une valeur de **a** <0 signifie une répulsion. Il tient compte de l'hétérogénéité de la surface.

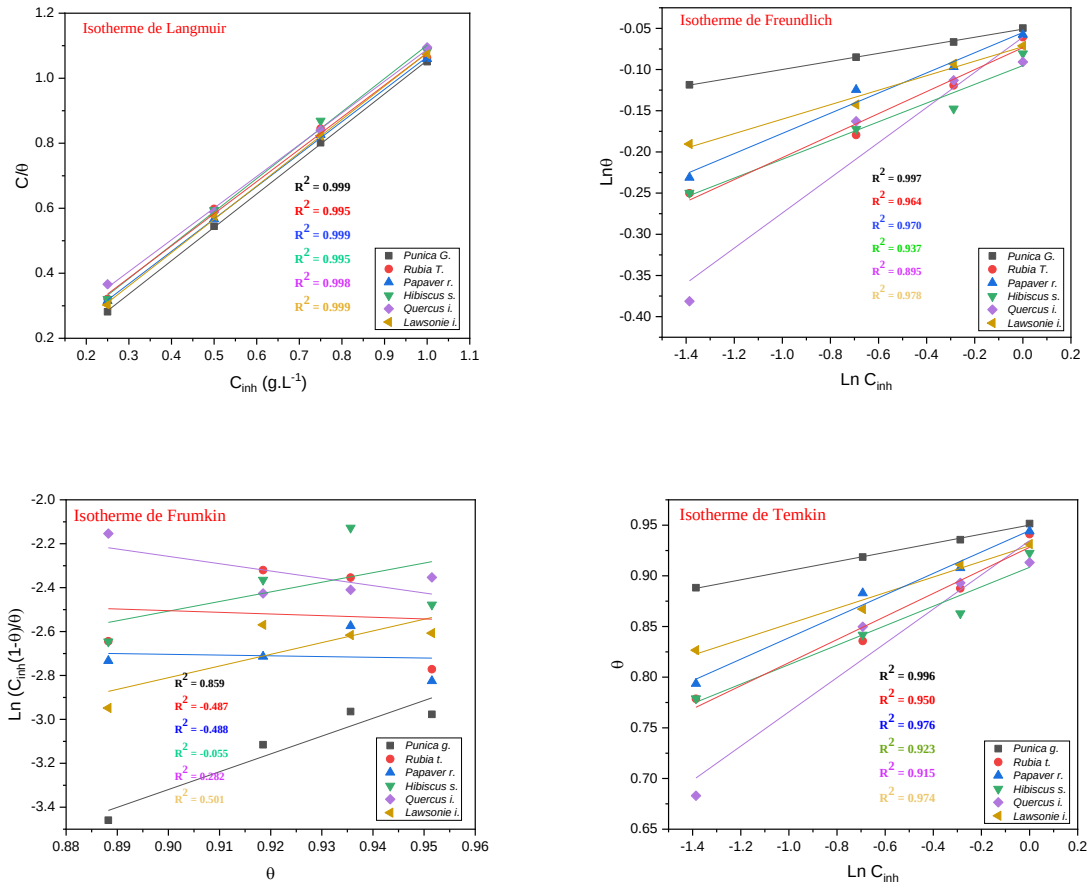



**Figure VI .6** Modèles des isothermes (**Langmuir, Freundlich, Frumkin** et **Temkin**) utilisés pour décrire l'adsorption des inhibiteurs (extraits de : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) sur la surface de l'acier doux.

Au cours de cette étude, la valeur de θ a été représentée graphiquement en fonction de l'isotherme d'adsorption appropriée.

D'après les résultats des différents isothermes (Figure VI.6), seul le modèle de Langmuir ($C/\theta = f(C_{inh})$) qui a montré une relation linéaire lorsque la concentration du dépôt change (augmente), indiquant que le phénomène d'adsorption des inhibiteurs testés suit la loi de cet isotherme dont les pentes obtenues sont au voisinage de 1.

Quant à l'isotherme de Freundlich, le paramètre 1/n est supérieur à un, renseignant sur la difficulté de l'inhibiteur à s'adsorber sur la surface du métal. Cependant, le coefficient de régression obtenu à partir de l'isotherme de Temkin est très inférieur à 1 par rapport au modèle de l'isotherme de Langmuir. De plus, le paramètre (a) présente une valeur négative indiquant l'existence d'une interaction répulsive au niveau de la couche adsorbée. On peut donc avancer que l'adsorption des six extraits testés sur la surface de l'acier en milieu acide chlorhydrique est conforme à l'isotherme d'adsorption de Langmuir et obéit à la loi de ce dernier.

Les différentes données extrapolées des graphes d'isothermes d'adsorption sont illustrées dans le tableau VI.4., comme les valeurs du coefficient de corrélation $R^2$, les pentes et les valeurs des constantes d'équilibre ($K_{ads}$) qui sont liées à **énergie libre standard d'adsorption ($\Delta G^0_{ads}$). Les** constantes d'équilibre ont été calculées en se basant sur **l'équation suivante** (9)**:**

$$\Delta G°_{ads} = -RT\,Ln\,(C_S K_{ads}) \qquad (9)$$

où

$K$ : constante d'équilibre; Cs: concentration de l'eau en solution en $mg.L^{-1} = 10^6$; ΔG°ads : énergie libre standard; R: constante des gaz parfaits (8.314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$); et T: température en degré Kelvin.

**Tableau VI.4**: Constantes d'adsorption et énergies libres standards d'adsorption ($\Delta G^0_{ads}$) après ajout de 1 $g.l^{-1}$ de chacun des six extraits (inhibiteurs).

| *Inhibiteurs* | $R^2$ | Pente | $K_{ads}$ (L/mol) | $\Delta G^0_{ads}$ (kJ/mol) |
|---|---|---|---|---|
| *Punica g.* | 0,999 | 1,02 | 35,51 | -25,98 |
| *Rubia t.* | 0,995 | 0,99 | 11,24 | -23,12 |
| *Papaver r.* | 0,999 | 0,99 | 14,59 | -23,77 |
| *Hibiscus r.* | 0,995 | 1,02 | 13,16 | -23,51 |
| *Quercus i.* | 0,998 | 0,97 | 8,87 | -22,54 |
| *Lawsonia i.* | 0,999 | 1,02 | 18,56 | -24,37 |

*$R^2$ : coefficient de corrélation; P : pente. ; $K_{ads}$* constante d'équilibre*; $\Delta G^0_{ads}$ : energie libre standard.;*

D'après les résultats du tableau VI .4 relatifs à l'isotherme d'adsorption de Langmuir, tous les extraits testés présentent des coefficients de corrélation $R^2$ très proches de l'unité oscillant entre 0,995 et 0,999, justifiant ainsi la très bonne corrélation de nos résultats (99,5 à 99,9%). Ceci stipule que la surface de l'adsorbant (acier doux) est constituée d'un certain nombre de

sites actifs, dont un seul responsables de l'adsorption des molécules contenues dans les extraits testés et permet d'écarter la présence d'interaction latérale entre les molécules [28,29].

Généralement, le type d'adsorption dépend de la valeur de $\Delta G^0_{ads}$ trouvée. Ainsi, une valeur négative de l'enthalpie libre ($\Delta G^0_{ads}$) renseigne sur la spontanéité de l'adsorption des extraits en contact avec la surface de l'acier. Lorsque l'énergie libre (magnitude) de $\Delta G^0_{ads}$ est d'environ -20KJ/mol ou présentant une valeur légèrement négative, cela indique que l'attraction est d'ordre électrostatique, produite par la charge positive des inhibiteurs et la charge négative de la surface de l'acier doux, donnant lieu à un phénomène de physisorption. Quant à la valeur de -40KJ/mol, elle est liée à un processus d'adsorption impliquant le partage des charges entre les inhibiteurs et les orbitales ''**d**'' des éléments de surface, conférant une chimisorption [30,31].

Dans le cas de tous les inhibiteurs testés après ajout de 1 $g.l^{-1}$ de chaque extrait (tableau V.4), les valeurs de $\Delta G^0_{ads}$ varient entre -22,54 (*Quercus i.*) et -25,98 KJ/mol (*Punica g.*).

Des valeurs relativement similaires ont été enregistrées dans le cas des trois extraits suivants : -23,77 KJ/mol (*Papaver r.*), -23,51 KJ/mol (*Hibiscus s.*), 23,12 KJ/mol (*Rubia t.*). Enfin, les deux valeurs d'énergie libre d'adsorption suivantes (-22,54 et -24,37 Kj/mol) ont été connectées respectivement aux deux extraits de *Quercus i.* et *Lawsonie i.*

Les valeurs en énergie libre obtenus sont comprises entre -22,54 et -25,98 KJ/mol, indiquant que la fixation des molécules contenues dans les extraits sur la surface de l'acier doux se fait généralement via les interactions d'ordre électrostatiques, formant ainsi des couches adhésives, protectrices et insolubles (en milieu HCl). Ainsi, le phénomène de physisorption des molécules contenues dans les extraits par rapport à la surface de l'acier doux est plus prédominant que celui de la chimisorption (Marsoul et al. 2020 et références citées [32]).

### *3. Effet de la température*

#### *3.1 Température*

Généralement, la température est connue par son importante influence sur le comportement des inhibiteurs en milieu corrosif. Afin de déterminer son effet sur la capacité inhibitrice des extraits étudiés, nous avons élargi notre étude sur un intervalle de température allant de 303 à 333 °K en utilisant la méthode de perte de masse (acier en milieu HCl 1M associé à chacune des concentrations optimales des différents extraits (1 $g.l^{-1}$).

Les valeurs des vitesses de corrosion calculées ainsi que les efficacités inhibitrices sont rassemblées dans le tableau VI.5 donné ci-après.

**Tableau VI.5**: Effet de la température sur l'évolution de la vitesse de corrosion et du pouvoir inhibiteur.

| *Inhibiteurs* | *Conc (g/l)* | Température (°K) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *303* | | *313* | | *323* | | *333* | |
| | | $V_{corr}$(mg /cm$^2$.h) | *Ƞ %* | $V_{corr}$(mg /cm$^2$.h) | *Ƞ %* | $V_{corr}$(mg /cm$^2$.h) | *Ƞ %* | $V_{corr}$(mg /cm$^2$.h) | *Ƞ %* |
| HCl 1M | ** | 0,8638 | * | 1,1526 | * | 1,4678 | * | 1,9102 | * |
| *Punica g.* | 1 | 0,0473 | 94,5 | 0,0980 | 91,4 | 0,1886 | 87,1 | 0,3028 | 84,1 |
| *Rubia t.* | 1 | 0,0588 | 93,2 | 0,1077 | 90,6 | 0,1909 | 86,9 | 0,2993 | 84,3 |
| *Papaver r.* | 1 | 0,0607 | 92,9 | 0,1006 | 91,2 | 0,1657 | 88,7 | 0,3915 | 79,5 |
| *Hibiscus r.* | 1 | 0,0829 | 90,4 | 0,1400 | 87,8 | 0,2433 | 83,4 | 0,5473 | 71,3 |
| *Quercus i.* | 1 | 0,0774 | 91 | 0,1435 | 87,5 | 0,2367 | 83,8 | 0,3467 | 81,8 |
| *Lawsonia i.* | 1 | 0,0849 | 90,1 | 0,1486 | 87,1 | 0,2604 | 82,2 | 0,3914 | 79,5 |

La variation des vitesses de corrosion en fonction de la température est illustrée dans la figure VI.7 suivante.

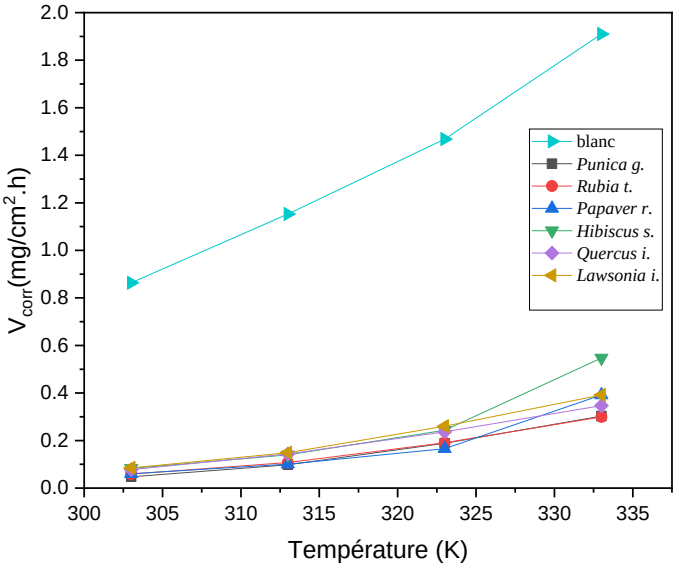



**Figure VI.7**. Effet de la température sur la vitesse de corrosion des six extraits inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) par utilisation de la méthode gravimétrique.

La vitesse de corrosion augmente avec l'élévation de la température d'essai, provoquant une modification de l'efficacité des inhibiteurs.

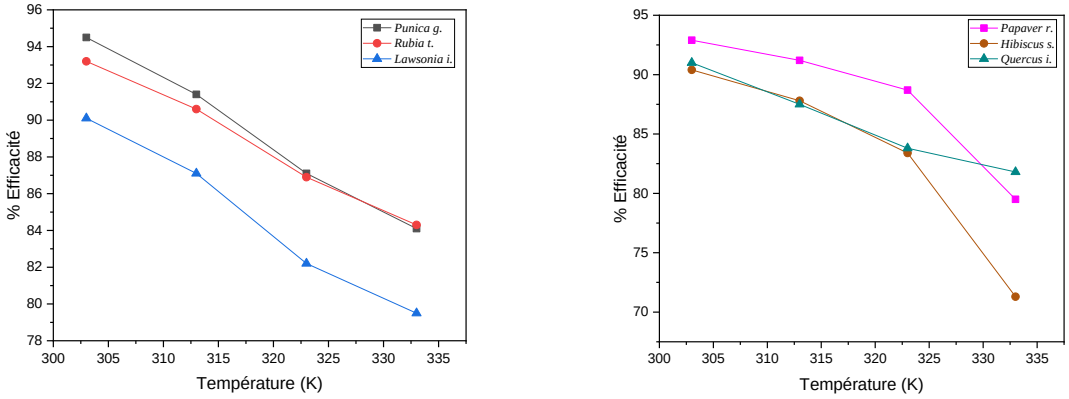



**Figure VI.8.** Effet de la température sur l'efficacité inhibitrice des extraits (inhibiteurs) (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*).

L'effet de température sur l'efficacité des inhibiteurs naturels, en particulier dans les milieux acides ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, particulièrement dans le processus de décapage et de détartrage à haute température, afin d'éliminer les produits de corrosifs issus des dispositifs métalliques en utilisant des inhibiteurs dont le rôle est la protection des les métaux contre la corrosion acide [31].

Alvarez et al. en 2018 [31], ont testé l'extrait de *Rollinia* comme inhibiteur de corrosion vert (respectueux de l'environnement) de l'acier (en milieu HCl 1M) à la température de 303 à 333 K. En 2019, Hanin et al. [16] ont étudié l'effet de la température sur l'efficacité inhibitrice de différents extraits de *Taxus baccata* (constituants polyphénoliques) contre la corrosion de l'acier en milieu acide (HCl 1M) et à la température comprise entre 293et 313 °K afin de le protéger. Une étude récente a été conduite par Belakhdar et al. en 2020 [15] sur l'extrait de *Rosmarinus officinalis*, mais appliquée cette fois-ci à l'acier XC48 dans le même milieu (HCl 1 M), tout en utilisant la techniques de polarisation potentiodynamique sur un intervalle de température de 303 à 323 °K. Toutes ces études ont rapporté que la capacité protectrice de l'inhibiteur ainsi que l'effet protecteur ont été réduits sous l'effet de l'élévation de la température.

*3.2 Droites d'Arrhenius et énergie d'activation (Ea), enthalpie (*ΔH*) et entropie d'activation (*ΔS*)*

En 1965, Radovici a proposé la classification des inhibiteurs en se basant sur la comparaison de leur énergie d'activation (présence ($E^i_a$) ou absence ($E_a$)) [33], trois cas ont été distingués :

1. Inhibiteur $E^i_a > E_a$ : il est adsorbé sur la matrice par liaison électrostatique (liaisons faibles), lorsque la température augmente ce type de liaisons est sensible à à son élévation et ne peut résister efficacement à la corrosion.
2. Inhibiteur $E^i_a < E_a$ : leur pouvoir protecteur est accentué avec l'augmentation de la température. Ainsi, les molécules organiques inhibitrices s'adsorbent (chimisorption) à la surface du métal par de fortes liaisons. Gomma en 1998 rappelle que ce type d'inhibiteur est le plus efficace [34]. Putilova et al. en 1960, ont considéré que l'augmentation de la capacité de protection avec l'augmentation de la température est due au changement induit dans les propriétés d'adsorption: basse température, inhibiteur est physiquement adsorbé, tandis qu'à haute température, l'adsorption chimique est favorisée [35].
3. Dans le cas ou $E^i_a = E_a$ : cette catégorie ne montre pas l'évolution du pouvoir de protection avec la température; d'ailleurs peu de composés appartiennent à cette dernière catégorie.

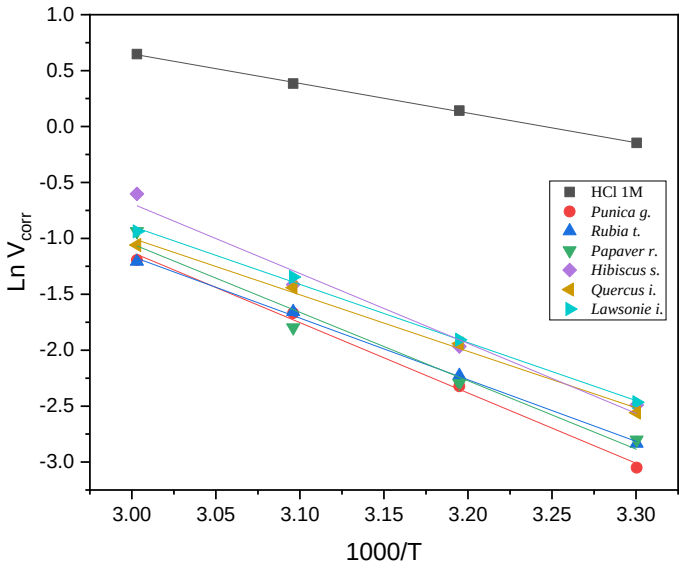



**Figure VI. 9.** Droites d'Arrhenius de l'acier doux en milieu HCl 1M sans et avec addition des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.* à différentes concentrations).

Dans cette étude, une dépendance de type Arrhenius a été observée entre les vitesses instantanées de corrosion et la température utilisée permettant de calculer l'énergie d'activation.

$$Vcorr = k \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \qquad (10)$$

où :

$E_a$: énergie d'activation, R: constante du gaz parfait, k: facteur pré-exponentiel, T: température absolue, et $V_{corr}$: vitesse de corrosion liée directement à la perte de masse.

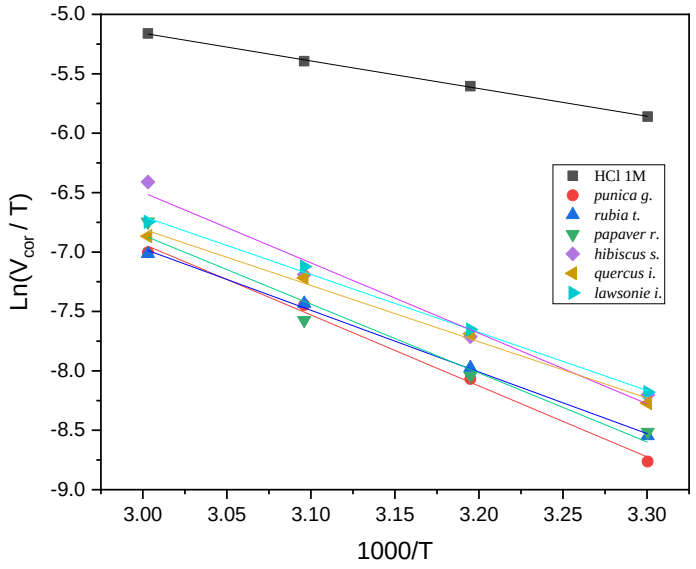



**Figure VI. 10.** Variation de ln ($V_{corr}/T$) en fonction de l'inverse de la température en absence et en présence des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) de la concentration optimale 1g.$L^{-1}$.

L'exploitation de l'équation d'Arrhenius suivante (11) permet de déterminer l'enthalpie et l'entropie d'activation, et dont les résultats sont consignés dans le tableau V.6 donné ci-après.

$$Vcorr = \frac{RT}{Nh}\exp\left(\frac{\Delta S°}{R}\right)\exp\left(-\frac{\Delta H°}{RT}\right) \qquad (11)$$

avec :

h: constante de Planck, N: nombre d'Avogadro, ΔH°: enthalpie d'activation et ΔS°: entropie d'activation.

**Tableau VI.6.** Paramètres d'activation ($E_a$, $\Delta H^*$, $\Delta S^*$) du processus de corrosion de l'acier en milieu acide (HCl 1M) sans et avec inhibiteurs de concentration 1 $g.l^{-1}$ (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*).

| *Inhibiteurs* | *Conc ($g.l^{-1}$)* | $E_a$ (KJ/mol) | $\Delta H^*$ (KJ/mol) | $\Delta S^*$ (J/mol.K) |
|---|---|---|---|---|
| HCl 1M | ** | 22,01 | 19,38 | 139 |
| *Punica g.* | 1 | 52,32 | 49,68 | -118,22 |
| *Rubia t.* | 1 | 40,67 | 43,19 | -138,01 |
| *Papaver r.* | 1 | 71,89 | 48,26 | -121,86 |
| *Hibiscus r.* | 1 | 73,49 | 49,35 | -115,60 |
| *Quercus i.* | 1 | 42,05 | 39,41 | -147,98 |
| *Lawsonia i.* | 1 | 43,25 | 40,61 | -143,50 |

Les valeurs des énergies d'activation ($E_a$) correspondent à 22,01 KJ/mol dans le cas du blanc (acier + HCl 1M) et aux valeurs respectives suivantes dans le cas des extraits des plantes de concentration 1$g.l^{-1}$ : 52,32; 40,67; 71,89; 73,49; 42,05 et 43,25 KJ/mol (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*). Nous remarquons que l'énergie d'activation des solutions inhibées augmente par rapport à celle de la solution du blanc (acier + HCl 1M), la valeur la plus élevée s'explique par l'interaction entre les extraits et la surface de l'acier doux. L'énergie d'activation se trouve augmentée lors de l'ajout de l'inhibiteur, révélant ainsi une modification au niveau du mécanisme de traitement de la corrosion en présence de l'inhibiteur adsorbé. L'augmentation de la valeur de l'énergie d'activation ($E_a$) en présence de différents extraits des plantes testées est un phénomène typique de l'adsorption physique de ces inhibiteurs au niveau de la surface de l'acier.

Khadom et al. en 2018 [37] ont découvert que l'adsorption de molécules de l'extrait des feuilles de *Xanthium* arrêterait une partie des réactions d'anode et de cathode sur la surface de l'électrode, et arrêterait les réactions d'anode et de cathode parallèles sur la surface de l'électrode, ainsi que des réactions parallèles qui se produisaient dans la partie couverte, mais la vitesse de cette dernière est nettement plus lente que celle dérivant de la surface métallique la plus exposée. Récemment en 2020, Ituen et al. [36] ont attribué la réduction de l'énergie d'activation $E_a$ au transfert de la réaction de corrosion de la surface métallique exposée à la surface métallique non exposée, ce phénomène a été élucidé en utilisant l'extrait mésocarpe d'oignon.

L'étude de l'effet de température nous aidé dans le calcul des paramètres thermodynamiques suivants : ΔH* et ΔS* mentionnés dans le tableau V. 6. Les valeurs positives de l'enthalpie libre (ΔH*) indiquent que la dissolution de l'acier doux est affectée par un processus endothermique, conférant une dissolution lente à température ambiante et en présence des d'inhibiteurs de corrosion. Lorsqu'on augmente davantage la température, les valeurs de ΔH* augmentent aussi, confirmant ainsi la nature endothermique de la dissolution de l'acier, cependant l'efficacité d'inhibition diminue et c'est valable pour tous les extraits.

Quant aux valeurs d'entropie d'activation (ΔS*) obtenues, à température ambiante elles sont négatives, et deviennent de plus en plus positives au fur et à mesure que la température augmente. Il est à noter qu'en absence d'inhibiteur, ΔS* présente une valeur largement positif et a tendance à devenir négatif une fois la concentration de l'inhibiteur augmente. L'entropie d'activation négative indique qu'à températures plus basses et à concentrations plus élevées, la majeure partie de la surface de l'acier est recouverte d'un film du aux extraits, réduisant ainsi le phénomène de dissolution du métal (désordre). Ceci peut être évité par la couche barrière formée entre l'interface de la solution métallique.

*4. Effet du temps d'immersion*

Compte tenu de l'importance du paramètre temps, nous avons mené notre étude en faisant varier le temps d'immersion des inhibiteurs testés de 30 min jusqu'à 12 h, tout en respectant le pas suivant : 1/2, 1, 2, 4, 6 et 12 h. Le choix de la concentration de $1 g.l^{-1}$ des différents extraits testés (inhibiteurs : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*) a été justifié par la présence d'une efficacité maximale à la dite concentration. Ceci nous a permis de tracer la courbe de la résistance au transfert de charges ($R_p$) en fonction du temps d'immersion (figure VI.11) permettant d'extraire des données utiles.

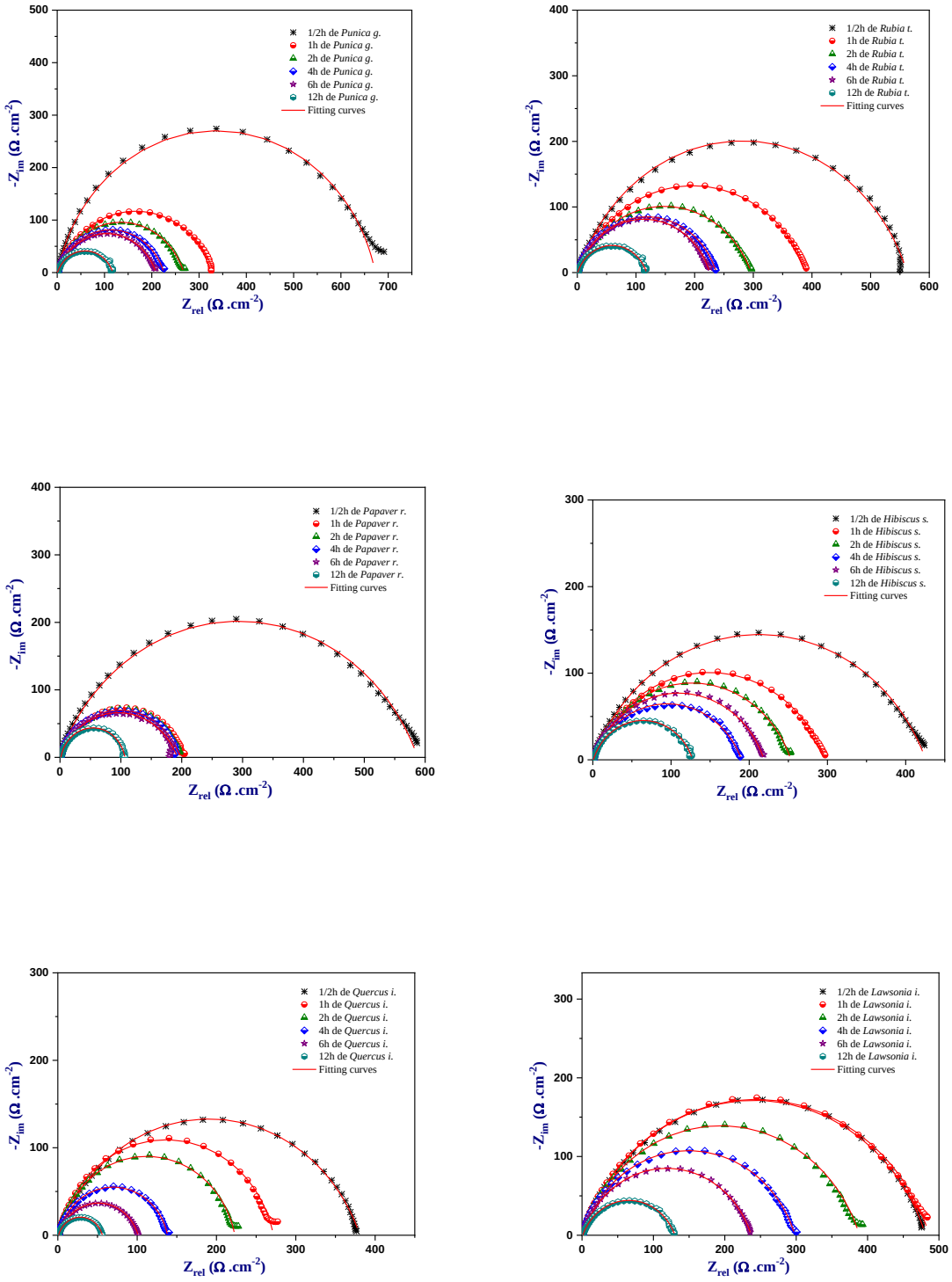



**Figure VI.11** Spectres d'impédance expérimentale ajustés dans le plan de Nyquist relatif à l'acier, et après immersion en milieu HCl 1M en présence de chacun des inhibiteurs de concentration 1 $g.l^{-1}$ (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.* ).

D'après la figure VI.11, en présence des inhibiteurs, la résistance au transfert de charge de l'acier $R_p$ reste toujours importante malgré l'augmentation de la durée du temps d'immersion,

par contre la Rp diminue dans le milieu corrosif (HCl 1M). Dans les mêmes conditions, la capacité de double couche ($C_{dl}$) de l'acier augmente en absence d'inhibiteurs, mais diminue une fois ces derniers sont présents.

Le changement de $R_p$ est probablement dû au déplacement des molécules d'eau par phénomène d'adsorption d'anions acides à la surface de l'acier, ce qui modifie leur charge et par la suite facilite le mécanisme d'adsorption des molécules organiques (sous forme cationique) au niveau de la surface métallique, réduisant ainsi la vitesse de réaction de dissolution.

**Tableau VI.7.** Effet du temps d'immersion sur les paramètres électrochimiques et l'efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier en milieu acide (HCl 1M), sans et avec addition des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*)

| ***Milieu*** | ***t*** ***(h)*** | $R_s$ ***(Ω cm²)*** | $R_p$ ***(Ω cm²)*** | ***Q*** ***(µF S$^{n-1}$)*** | $n_{dl}$ | $C_{dl}$ ***(µF cm$^{-2}$)*** | $\eta_{imp}$ ***%*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **HCl 1M** | 1/2 | 1,7 | 33,0 | 312,7 | 0,784 | 89,1 | ** |
| | 1 | 1,6 | 26,4 | 364,9 | 0,810 | 122,7 | ** |
| | 2 | 1,5 | 23,0 | 433,0 | 0,835 | 174,3 | ** |
| | 4 | 1,5 | 21,4 | 627,0 | 0,834 | 267,0 | ** |
| | 6 | 1,0 | 19,4 | 963,8 | 0,796 | 349,4 | ** |
| | 12 | 1,2 | 10,4 | 949,2 | 0,764 | 419,5 | ** |
| ***Punica g.*** | 1/2 | 0,3 | 672,3 | 63,1 | 0,862 | 38,1 | ***95,1*** |
| | 1 | 0,6 | 330,6 | 109,6 | 0,784 | 44,0 | ***92,0*** |
| | 2 | 0,9 | 266,7 | 112,1 | 0,794 | 45,2 | ***91,3*** |
| | 4 | 0,6 | 224,9 | 126,7 | 0,798 | 51,5 | ***90,4*** |
| | 6 | 0,2 | 208,2 | 148,3 | 0,789 | 58,5 | ***90,6*** |
| | 12 | 0,6 | 114,0 | 202,0 | 0,784 | 71,4 | ***90,8*** |
| ***Rubia t.*** | 1/2 | 1,5 | 560,5 | 72,5 | 0,791 | 31,2 | ***94,1*** |
| | 1 | 0,3 | 392,6 | 80,2 | 0,755 | 26,2 | ***93,3*** |
| | 2 | 0,6 | 295,8 | 102,0 | 0,760 | 33,7 | ***92,2*** |
| | 4 | 0,5 | 236,5 | 105,7 | 0,794 | 40,7 | ***90,9*** |
| | 6 | 0,6 | 224,9 | 126,7 | 0,798 | 51,5 | ***91,3*** |
| | 12 | 0,5 | 117,5 | 206,5 | 0,779 | 71,9 | ***91,1*** |

**Tableau VI.7. (Suite)**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Papaver r.*** | 1/2 | 1,6 | 589,4 | 61,9 | 0,764 | 22,3 | ***94,4*** |
| | 1 | 0,9 | 204,7 | 99,5 | 0,786 | 34,5 | ***87,1*** |
| | 2 | 0,4 | 198,2 | 92,4 | 0,790 | 32,0 | ***88,4*** |
| | 4 | 0,4 | 192,1 | 85,0 | 0,806 | 31,6 | ***88,8*** |
| | 6 | 0,1 | 185,6 | 92,0 | 0,798 | 32,9 | ***89,5*** |
| | 12 | 1,3 | 104,0 | 128,1 | 0,874 | 68,7 | ***90,0*** |
| ***Hibiscus s.*** | 1/2 | 0,5 | 426,2 | 84,8 | 0,760 | 29,8 | **92,2** |
| | 1 | 0,4 | 297,4 | 109,2 | 0,759 | 36,8 | ***91,1*** |
| | 2 | 0,7 | 252,5 | 100,3 | 0,780 | 35,3 | ***90,8*** |
| | 4 | 0,4 | 189,8 | 139,3 | 0,761 | 44,7 | ***88,7*** |
| | 6 | 0,4 | 218,4 | 129,3 | 0,783 | 48,1 | ***91,1*** |
| | 12 | 0,7 | 126,8 | 172.0 | 0,791 | 62,8 | ***91,7*** |
| ***Quercus i.*** | 1/2 | 0.6 | 380,1 | 91.9 | 0,777 | 35,26 | **91,3** |
| | 1 | 1,0 | 270,8 | 118.0 | 0,863 | 68,3 | ***90,2*** |
| | 2 | 1,1 | 222,0 | 121.8 | 0,870 | 71,0 | ***89,6*** |
| | 4 | 1,0 | 137,2 | 134.8 | 0,861 | 70,9 | ***84,4*** |
| | 6 | 1,4 | 99,7 | 184.6 | 0,809 | 71,9 | ***80,5*** |
| | 12 | 0,9 | 55,2 | 217.8 | 0,819 | 82,0 | ***81,0*** |
| ***Lawsonia i.*** | 1/2 | 1 | 480,4 | 61,7 | 0,789 | 24,2 | **93,1** |
| | 1 | 0,1 | 486,9 | 79.0 | 0,785 | 32,5 | ***94,6*** |
| | 2 | 0,2 | 388,6 | 77.6 | 0,791 | 30,9 | ***94,1*** |
| | 4 | 0,1 | 298,3 | 84.1 | 0,795 | 32,6 | ***92,8*** |
| | 6 | 0,3 | 236,6 | 105.9 | 0,794 | 40,7 | ***91,8*** |
| | 12 | 1,2 | 127,7 | 209.5 | 0,775 | 73,39 | ***91,8*** |

t : temps d'immersion; $\mathbf{R_s}$ : résistance de la solution; $\mathbf{R_p}$ : résistance de polarisation Q : element phase canstant ; $n_{dl}$ : facteur d'etherogenite $\mathbf{C_{dl}}$: Capacité double couche ; $\boldsymbol{\eta_{imp}}$ : efficacité

D'après les données du tableau VI.7, et après examen des efficacités maximales des six extraits individuellement (concentration optimale $1g.l^{-1}$) qui ont été testés durant une période de 30 min, les résultats enregistrés varient respectivement entre 95.1, 94.4, 94.1, 93.1, 92.2 et 91.3% (*Punica g.*, *Papaver r.*, *Rubia t.*, *Lawsonia i.*, *Hibiscus s.* et *Quercus i.*). Après une période de 12h, aucun changement important n'a été observé pour tous les extraits, les efficacités inhibitrices atteignent des valeurs maximales au voisinage de 90%, exception faite

sur l'extrait de *Quercus i* . dont l'efficacité diminue après 12h de 91.3% à 81%. Et dans le voisinage de cette période il était observé que dans tous les extraits atteignent une stabilité. Ce comportement pourrait être probablement dû à la formation d'oxydes à la surface de l'acier exerçant une réactivité passive, finissant par réduire le taux de corrosion. La réduction de la vitesse de corrosion peut être probablement due à la formation d'une couche protectrice sur la surface de l'acier, parce qu'à ce stade, on soupçonne que les molécules inhibitrices se trouvent dans leur limite d'action dans le processus d'inhibition. Les différents extraits possèdent des molécules ayant des cycles aromatiques de haute densité électronique, accompagnés des hétéroatomes ''N et O'' agissant comme centres actifs, dans le processus d'inhibition. La présence d'autres composés aromatiques supplémentaires dans certains extraits augmentent l'activité via des réactions de physisorption, conférant une efficacité inhibitrice élevée.

L'efficacité inhibitrice reste maximale sans aucun changement significatif au cours de différents temps d'immersion étudiés 1/2 jusqu'à 12h. Cela peut être attribué au taux d'action élevé qui a lieu entre les inhibiteurs de corrosion et l'acier respectivement. Ceci peut être probablement dû au un nombre maximum de molécules inhibitrices (contenues dans les inhibiteurs) qui sont actives et plus disponibles pour pouvoir inhiber la corrosion du métal (acier) ou le dissoudre.

*5. Mécanisme d'inhibition de la corrosion*

Les études susmentionnées ont montré que les extraits de *Punica g., rubia t., papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.* présentent un effet d'inhibition qui pourrait résulter de la formation de complexes.

Dans le but d'avoir des informations sur la possibilité d'apparition d'une réaction de complexation, les mesures par spectrophotométrie UV-visible ont été illustrés dans la figure VI.12 montrant les différents spectres UV-visible des six extraits ainsi que leurs spectres UV correspondant aux produits solides générés (film) au niveau de la surface de l'acier doux (HCl 1 M) à des concentrations de $1g.l^{-1}$ d'extrait, et après 7 jours d'immersion dans la solution acide à la température de 298 °K.

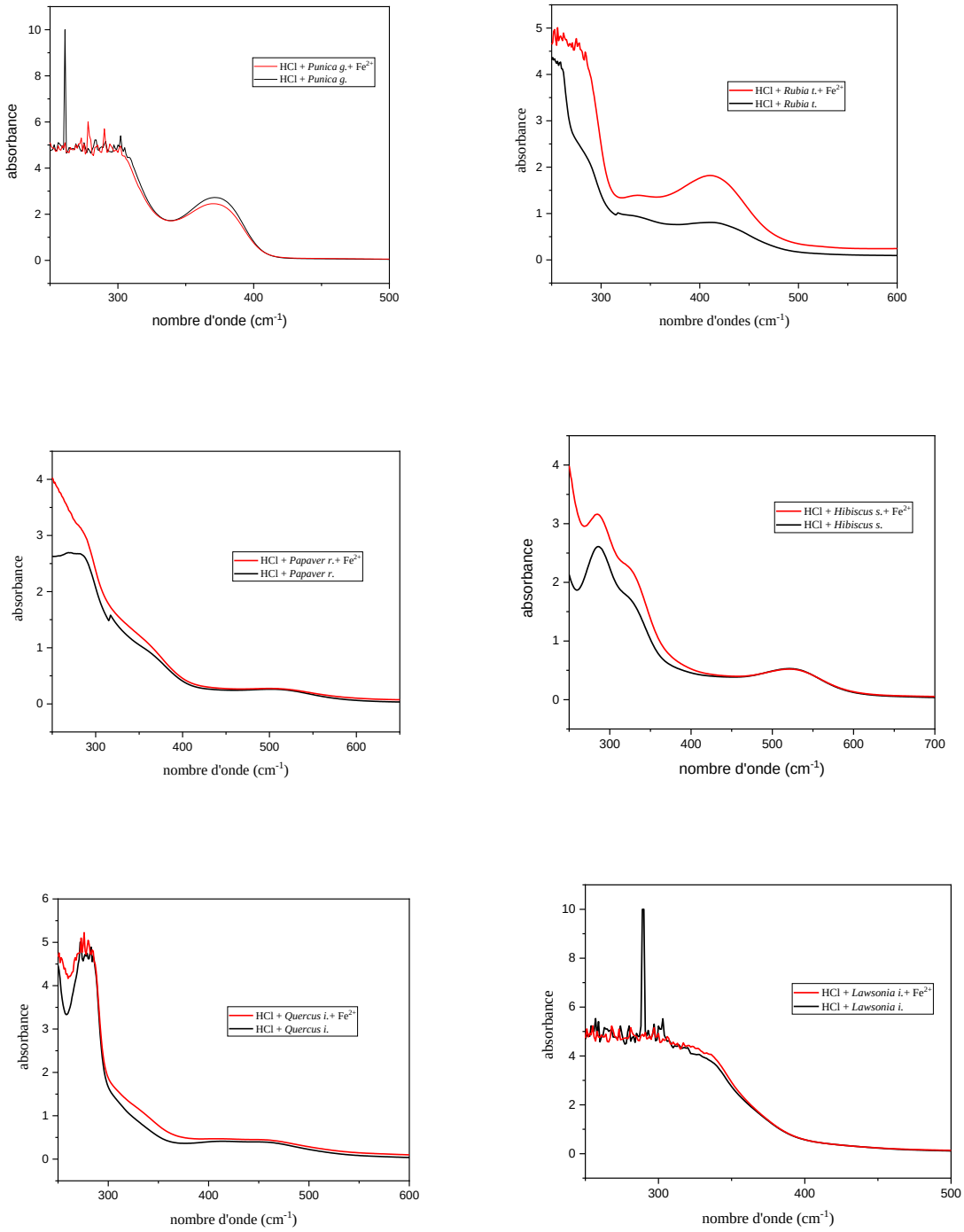



**Figure VI. 12**. Spectres UV-visible de HCl 1M avec 1 g.l$^{-1}$ d'extrait des plantes *Punica g. rubia t. papaver r. Hibiscus s. Quercus i. et Lawsonia i*., avant et après immersion en acier doux pendant 7jours à 298 °K.

Des mesures par spectrophotométrie UV-visible ont été effectuées dès qu'un changement dans la position du maximum de pics et dans la valeur de l'absorbance, indiquant la formation d'un complexe entre deux espèces en solution [38]. La figure VI.12 montre que les spectres

d'absorption en UV-visible ont été mesurés dans le cas de l'acier seul en présence d'une solution de HCl 1 M, et lors de l'ajout de 1g.$l^{-1}$ de l'extrait des six plantes séparément, avant et après immersion des échantillons d'acier doux pendant 7 jours à 298 °K.

Dans le cas de *Punica g*. et lors de l'immersion d'acier doux dans HCl 1M, un spectre UV à deux bandes a été obtenu, dont l'une présente un pic intense à environ 275 nm et l'autre de faible intensité à environ 375 nm. Quant à l'extrait de *Rubia t.,* la bande la plus intense apparait à 275 nm accompagnée d'une bande de faible intensité à 420 nm. Une seule bande a été observée dans la région UV pour *Papaver r.* à environ 290 nm et pour *Quercus i.* et *Lawsonia i.* vers 275 nm. Dans le cas de l'*Hibiscus s.*, un spectre à trois bandes été observé, une faible intensité dans la région du visible à 520 nm et deux autres dans la région UV à 325 et 275 nm. En revanche, dans le spectre de la solution résultant après 7 jours d'immersion d'acier doux (HCl 1M) avec un inhibiteur ajouté, il est observé deux différences dans comparaison avec le spectre pour le HCl 1M contenant l'inhibiteur mais en absence d'ions $Fe^{2+}$, à savoir, après l'immersion des échantillons d'acier : l'intensité des bandes augmentes et un autre fait digne de mention est qu'une légère modification de l'intensité de la bande à 275 nm est également perceptible.

Les deux types de transitions $\pi \rightarrow \pi *$ et $n \rightarrow \pi *$ dues à la présence des groupements C=C et C=O, pourraient expliquer l'apparition des bandes à 275 nm, respectivement, alors que la nouvelle bande pourrait être justifiée par la formation d'un complexe de Fer, comme il a été rapporté par Ehrt et al. Concernant les bandes de transfert de charge de $Fe^{2+}$ avec un maximum à 220 nm [39]. Ici, la formation de nouveaux produits après immersion de l'acier. Les différences entre les spectres sont clairement observées dans la figure VI.12 et sont indicatives de la formation d'un complexe entre les constituants chimiques de chaque extrait de plante et des ions ferreux ($Fe^{2+}$) libérés lors de la réaction de corrosion.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, six extraits méthanoliques ont été obtenus à partir de *Punica g. Rubia t. Papaver r. Hibiscus s. Quercus i. et Lawsonia i.* par extraction au soxhlet. La performance d'inhibition de la corrosion des différentes plantes sur l'acier au carbone dans l'acide chlorhydrique (HCl 1M) a été étudiée en effectuant des mesures électrochimiques.

Les résultats ont montré que les six extraits présentent une excellente inhibition de la corrosion avec une efficacité supérieure à 90% pour l'acier au carbone en milieu acide chlorhydrique. Les expériences de polarisation potentiodynamique ont montré que tous les extraits étudiés agissent comme inhibiteurs de type mixte. Tous les extraits ont montré une bonne inhibition de la corrosion et une adsorption physique spontanée sur la surface de l'acier, conformément l'isotherme de Langmuir. Les différents inhibiteurs de corrosion forment une couche d'adsorption dense à la surface de l'acier permettant de jouer un rôle très important dans l'inhibition de la corrosion de l'acier en milieu acide chlorhydrique. Tous les résultats obtenus à partir des différentes méthodes électrochimiques ont été confrontés à celle de perte de masse et se trouvent en bon accord.

## Références

**[**1**]** M. Benabdellah; K.F. Khaled; B. Hammouti, Kinetic investigation of C38 steel corrosion in concentrated perchloric acid solutions, *Mater. Chem. Phys.*, 120 (1), 61-64, **2010**.

**[**2] H. Derfouf ; Y. Harek ; L. Larabi ; W.J. Basirun; M. Ladan, Corrosion inhibition activity of carbon steel in a 1.0 M hydrochloric acid medium using Hammada scoparia extract: gravimetric and electrochemical study, *J. Adhes. Sci. Technol.* 33, 808-833, **2019**.

[3] S.C. Udensi; O.E. Ekpe; L.A. Nnanna, Newbouldia laevis Leaves Extract as Tenable Eco-Friendly Corrosion Inhibitor for Aluminium Alloy AA7075-T7351 in 1 M HCl Corrosive Environment: Gravimetric, Electrochimical and Thermodynamic Studies. Chemistry Africa 3, 303–316, **2020**.

[4] A. I. Onen; S. Bulama; A.M. Kolo; E.E. Ebenso; D.A. Apagu, Gravimetric and electrochemical studies of *Balanitea egyptiaca* L. ethanolic leaves extract as corrosion inhibitor for duplex stainless steel (dss) in 1.0M HCl solution, *Trends Food Sci Technol*. 4, 773-777, **2019**.

[5] R. Alford; H.M. Simpson; J. Duberman; G.C. Hill; M. Ogawa; C. Regino; H. Kobayashi; P.L. Choy, Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular imaging: Literature Review, *Mol. Imaging* 6, 341-354, **2009**.

[6]S.K. Mohanty; A. Khuntia; B. Sandhyarani; Yashaswini; B. Likitha; C.I. Muzammil; Sneha, Harshitha; P.S. Shine, design, molecular docking, synthesis, & anti-cancer evaluation of novel xanthene derivatives, *World Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences* 7, 922-930, **2018**.

[7] N. Arrousse, El. Mabrouk, B. Hammouti, F. El hajjaji, Z. Rais, M. Taleb, New strategy of synthesis, characterization, theoretical study and inhibition effect on mild steel corrosion in acidic solution, *Mediter. J. Chem.* 10, 477-491, **2020**.

[8] N. Arrousse, El. Mabrouk, B. Hammouti, F. El hajjaji, Z. Rais, M. Taleb, Synthesis, characterization, anti-corrosion behavior and theoretical study of the new organic dye: 3-oxo-3Hspiro[isobenzofuran-1,9´-xanthene]-3´,6´-diyl bis(3-methylbenzenesulfonate), *Int. J. Corros. Scale Inhib.* 9, 661–687, **2020**.

[9] S. Jayakumar, T.Nandakumar, M. Vadivel, C. Thinaharan, R.P. George ; J. Philip, Inhibition de la corrosion de l'acier doux dans 1 M HCl à l'aide d'extrait de *Tamarindus indica* : études électrochimiques, de surface et spectroscopiques. *J. Adhes. Sci. Technol.* 34, 713-743 **2020**.

[10] Q. Wang; B. Tan; H. Bao; Y. Xie; Y. Mou; P. Li; D. Chen; Y. Shi; X. Li; W. Yang, Evaluation of Ficus tikoua leaves extract as an eco-friendly corrosion inhibitor for carbon steel in HCl media. *Bioelectrochemistry* 128**,** 49-55, **2019**.

[11] A. Abdulmajid; T.S. Hamidon; A.A. Rahim; M.H. Hussin, Tamarind shell tannin extracts as green corrosion inhibitors of mild steel in hydrochloric acid medium, *Mater. Res. Express*., 6, 106579, **2019**.

[12] Z. Sanaei; M. Ramezanzadeh; G. Bahlakeh; B. Ramezanzadeh, Use of *Rosa canina* fruit extract as a green corrosion inhibitor for mild steel in 1 M HCl solution: A complementary experimental, molecular dynamics and quantum mechanics investigation**,** *Journal Industrial Engineering Chemistry***,** 69, 18-31, **2019**.

[13] V.N. Jéssica; S.C. Fugivara; M. Taryba; E.R.P. Pinto; M.F. Montemor; A.V. Benedetti, Tannin: A natural corrosion inhibitor for aluminum alloys, *Progress in Organic Coatings* 135, 368-381, **2019**.

[14] K.R.G. Bacca, N.F. Lopes, J.B. Marcolino, F.S. Grasel , E.M. da Costa, Performance of Quebracho extract as eco-friendly corrosion inhibitor for SAE 1010 steel in the oil field environment, *Materials and Corrosion*, 71,155-165, **2020**.

[15] A. Belakhdar, H. Ferkous, S. Djellali, R. Sahraoui, H. Lahbib, Y. BenAmor, A. Erto, M. Balsamo, Y. Benguerba, Computational and experimental studies on the efficiency of Rosmarinus officinalis polyphenols as green corrosion inhibitors for XC48 steel in acidic medium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2020** https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125458

[16] K. Hanini, B. Merzoug, S. Boudiba, I. Selatnia, H. Laouer, S. Akkal, Influence of different polyphenol extracts of Taxus baccata on the corrosion process and their effect as additives in electrodeposition. *Sustainable Chemistry and Pharma* 14, 100189, **2019**.

[17] T. Tsuru, S. Haruyama, B. Gijutsu, Corrosion Inhibition of Iron by Amphoteric Surfactants in 2M HCl. *Journal Japan Society Corrosion Engineering*, 27, 573-581, **1978.**

[18] M.A. Quraishi, 2-Amino-3, 5-dicarbonitrile-6-thio-pyridines: new and effective corrosion inhibitors for mild steel in 1 M HCl. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 2851–2859, **2014**.

[19] X. Zheng, S. Zhang, M. Gong, W. Li, Experimental and theoretical study on the corrosion inhibition of mild steel by 1-octyl-3-methylimidazolium L-prolinate in sulfuric acid solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 16349–16358 **2014**.

[20] A. El-Askalany, S. Mostafa, K. Shalabi, A. Eid, S. Shaaban, Novel tetrazole-based symmetrical diselenides as corrosion inhibitors for N80 carbon steel in 1 M HCl solutions: experimental and theoretical studies. *J. Mol. Liq.* 223, 497–508, **2016**.

[21] L. Kadiri, M. Galai, M. Ouakki, Y. Essaadaoui, A. Ouass, M. Cherkaoui, E.H. Rifi, A. Lebkiri, Coriandrum sativum. L. seeds extract as a novel green corrosion inhibitor for mild steel in 1.0 m hydrochloric and 0.5 m sulfuric solutions, *Anal. Bioanal. Chem.* 10, 249–268, **2018**.

[22] N. El Hamdani, R. Fdil, M. Tourabi, C. Jama, F Bentiss, Alkaloids extract of Retama monosperma (L.) Boiss. seeds used as novel eco-friendly inhibitor for carbon steel corrosion in 1 M HCl solution: electrochemical and surface studies. *Appl. Surf. Sci.* 357, 1294–1305, **2015**.

[23] L.F. Glaydson, aa. Mendonc¸ N. Stefane Costaa, N. Valder, b Freire, N.S. Paulo Cascianoa, Adriana N. Correiaa, Pedro de Lima-Netoa, Understanding the corrosion inhibition of carbon steel and copper in sulphuric acid medium by amino acids using electrochemical techniques allied to molecular modelling methods. *Corrosion Science* 115 41-55, **2017**.

[24] E. Ech-chihbi, A. Nahlé, R. Salim, H. Oudda, F. El Hajjaji, F. El Kalai, · A. El Aatiaoui, M. Taleb, An Investigation into Quantum Chemistry and Experimental Evaluation of

Imidazopyridine Derivatives as Corrosion Inhibitors for C-Steel in Acidic Media, *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion* 5, 24, **2019**.

[25] N. Arrousse, R. Salim, Y. Kaddouri, Abdelkader zarrouk, D. Zahri, F. El Hajjaji, R. Touzani, M. Taleb, S. Jodeh, The inhibition behavior of Two pyrimidine-pyrazole derivatives against corrosion in hydrochloric solution: Experimental, surface analysis and in silico approach studies. *Arabian Journal Chemistry* (**2020**) https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.030

[26] L.L. Liao, S. Mo, H.Q. Luo, N.B. Li, Longan seed and peel as environmentally friendly corrosion inhibitor for mild steel in acid solution: experimental and theoretical studies, *J. Colloid Interface Sci.*, 499, 110, **2017**.

[27] R. Hsissou; O. Dagdag; D. About; F. Benhiba; M. Berradi; M. El Bouchti; A. Berisha; N. Hajjaji; A. Elharfi, Novel derivative epoxy resin TGETET as a corrosion inhibition of E24 carbon steel in 1.0 M HCl solution. Experimental and computational (DFT and MD simulations) methods, *Journal of Molecular Liquids* 284, 182-192, **2019**.

[28] A.J. Abdul Nasser ; M.A. Sathiq, Comparative study of N-[(4-methoxyphenyl) (morpholin-4-yl)methyl]acetamide (MMPA) and N-[morpholin-4yl(phenyl)methyl]acetamide (MPA) as corrosion inhibitors for mild steel in sulfuric acid solution**.** *Arabian Journal Chemistry* 10, S261-S273, **2017**.

[29] A. Espinoza-Vázquez; F.J. Rodríguez-Gómeza; G.E. Negrón-Silvab; R. González-Olverab; D. Ángeles-Beltránb; M. Palomar-Pardavéc; A. Miralriode; M. Castrod, Fluconazole and fragments as corrosion inhibitors of API 5L X52 steel immersed in 1M HCl, *Corrosion Science* 174, 108853, **2020.**

[30] S. John, A. Joseph, Electro analytical, surface morphological and theoretical studies on the corrosion inhibition behavior of different 1,2,4-triazole precursors on mild steel in 1M hydrochloric acid, *Mater. Chem. Phys.* 133, 1083–1091, **2012**.

[31] P. E. Alvarez, M.V. Fiori-Bimbi, A. Neske, S.A. Brandan, C.A. Gervasi, Rollinia occidentalis extract as green corrosion ´ inhibitor for carbon steel in HCl solution, *Journal Industrial Engineering Chemistry* 58, 92-99, **2018**.

**[32]** A. Marsoul, M. Ijjaali, F. Elhajjaji, M. Taleb, R. Salim, A. Boukir. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum* L): Evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 M HCl. *Materials Today Proceeding* 27, 3193-3198. **2020**.

[33] O. Radovici, Proc.7th European Symposium on Corrosion Inhibitors, *Ann. Univ. Ferrara, , Italy*, p330, **1990**.

[34] G.K Gomma, Influence of copper cation on inhibition of corrosion for steel in presence of benzotriazole in sulfuric acid, Mat. Chem. Phys., 55, 131 (**1998**).

[35] L.N. Putilova, S.A. Balezin, V.P. Barranik, Metallic corrosion inhibitors, Pergamon Press, New-York, (**1960**) p.196.

[36] E. Ituen; A. Singh; L. Yuanhua, Inhibitive effect of onion mesocarp extract-nickel nanoparticles composite on simultaneous hydrogen production and pipework corrosion in 1 M HCl, Journal international de l'énergie hydrogène, 45, 10814-10825, **2020**.
[37] A.A. Khadom, N.A. Abd, N.A. Ahmed, Xanthium strumarium leaves extracts as a friendly corrosion inhibitor of low carbon steel in hydrochloric acid: Kinetics and mathematical studies, *South African Journal of Chemical Engineering*, 25, 13-21, **2018**.
[38] Y. Abboud, A. Abourriche, T. Saffaj, M. Berrada, M. Charrouf, A. Bennamara, N. Himidi, H. Hannache, 2,3-Quinoxalinedionea novel corrosion inhibitor for mild steel in1 M HCl, *Mater Chem. Phys.* 105, 1–5, **2007**.
[39] D. Ehrt, D. Möncke, Charge transfer absorption of $Fe^{3+}$ and $Fe^{2+}$ complexes and UV radiation induced defects in different glasses, Conference: 6th ESG, June 2-6, 2002, Montpellier, France.

# Conclusion générale

* . Au cours de ce travail, nous avons effectué et comparé en premier lieu les rendements des extraits aux solvants de six types de plantes aromatiques et médicinales (*Punica g.*, *Rubia t.*, *Papaver r.*, *Hibiscus s.*, *Quercus i.* et *Lawsonia i.*), selon deux procédures (soxhlet et macération). La méthode au soxhlet s'est avérée plus efficace que celle de macération moyennant le solvant méthanol.

. Le screening phytochimique a montré la présence des constituants suivants (polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols et polyterpènes) dans tous les six extraits des plantes. Exception faite sur le *Quercus i.* et *Lawsonia i.*, les saponosides se sont montrés absents chez les autres extraits, quant aux alcaloïdes ils ne sont présents que chez *Rubia t.* et *Papaver r.*

. Le taux le plus élevé en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux a été enregistré dans les extraits méthanoliques issus du soxhlet, suivis de ceux extraits par mélange ternaire de solvants, puis ceux dérivant de l'acétate d'éthyle, et enfin les extraits acétoniques.

* . L'analyse structurale par spectrophotométrie UV-vis des extraits méthanoliques (soxhlet, macération) ont révélé la présence d'une variété de polyphénols appartenant à différentes familles qui varient selon la nature de la plante étudiée. Ainsi, les extraits de *Punica* sont constitués de deux types de chromophore ellagyle *i.e.* acide ellagique (2 unités d'acide gallique condensées) et gallagyle *i.e.* punicaline et punicalagine sous forme d'aglycone (génine) et/ou hétéroside (gallotanins hydrolysables). Quant aux extraits de *Rubia* reconnus dans le domaine de pigmentation par leur chromophore anthraquinonoique, ils sont formés par l'alizarine (génine) et l'acide rubérythrique (hétéroside). Concernant les extraits de *Papaver* reconnus par leur pouvoir alcaloïde, ils se sont montrés riches en berbérine. Les extraits d'*Hibiscus* ont manifesté la présence d'anthocyaniques de type delphinidine-3-sambudioside (hétéroside) et cyanidine-3-O-sambudioside (hétéroside). Quant aux es extraits de *Quercus*, ils se sont avérés riches en catéchine et épigallocatéchine. Enfin, les extraits de *Lawsonia* (généralement utilisés en teinturerie) se sont révélés plus riches et plus diversifiés en polyphénols, dont le premier chromophore est naphtoquinonique élucidant la lawsone et le second flavonoïdique relatif à la lutéoline, ainsi qu'un troisième chromophore relatif à la chlorophylle (a) et (b) dont le premier est plus important.

## Conclusion générale

Il est à noter que les pics UV les plus intenses (effet hyperchrome) correspondent aux différents extraits issus de la procédure au soxhlet justifiant son importance et son efficacité par rapport à l'autre méthode.

. L'analyse par spectroscopie IRTF a confirmé les résultats obtenus par UV-vis en justifiant la présence des fonctions O-H phénoliques et ceux des carbohydrates (oses), carbonyles conjuguées avec le cycle aromatique des phénols (cétones, acides…), $C_{ar}$-O phénoliques, C-O des carbohydrates (empreinte digitale des sucres 1200-1000 $cm^{-1}$) informant sur le caractère polaire des hétérosides (ou moins polaire : génine), et enfin, les fragments hydrocarbonés (aromatiques et groupements alkyles). La méthode de déconvolution en IR a été aussi utilisée afin de montrer avec certitude l'apparition de certaines bandes chevauchées, permettant l'exactitude de la caractérisation structurale des constituants. Elle a permis aussi de discriminer entre la présence ou l'absence des anomères (α) et (β) des oses dans le cas des constituants punicaline et punicalagine contenus dans les extraits de *Punica*.

* La valorisation des différents extraits obtenus a été effectuée en explorant trois pistes : recherche des activités antioxydantes, évaluation des propriétés biologiques principalement antibactériennes, et enfin recherche du pouvoir inhibiteur naturel contre l'acier doux dans des conditions respectueuses de l'environnement (chimie verte).

. Les pouvoirs antioxydants ont été conduits sur tous les extraits (soxhlet et macération) en recherchant leurs activités antiradicalaires (CI50) par piégeage du radical libre via la méthode du $DPPH^{\cdot}$ tout en déterminant leurs concentrations efficaces (CE50) par test du pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

Les différents extraits méthanoliques (soxhlet) ont révélé l'activité antioxydante la plus importante. Celui de *Quercus* présente la capacité antioxydante totale (CAT) la plus importante, suivi de *Punica, Rubia, Papaver, Lawsonia* et dont l'*Hibiscus* présente la CAT la plus faible. Le test $DPPH^{\cdot}$ a montré que tous les extraits présentent des réponses inhibitrices en piégeant les radicaux libres ($DPPH^{\cdot}$), présentant ainsi des pouvoirs antiradicalaires plus importants que certains composés de référence (BHT, Vitamine E) mais légèrement inférieurs à celui de l'acide ascorbique (0.42 mg/mL), exception faite sur l'*Hibiscus* (0.35 mg/mL, soxhlet). Ils peuvent être classés ainsi selon leur ordre croissant de CI50 : *Hibiscus* < *Lawsonia* < *Punica* < *Rubia* < *Quercus* < *Papaver*. Les concentrations efficaces CE50 trouvées sont moins importantes que celles des standards (acide ascorbique, BHT) et beaucoup plus significative que celle de la vitamine E.

## Conclusion générale

. L'évaluation des activités antibactériennes *in vitro* des extraits (soxhlet et macération) des six plantes a révélé une activité antimicrobienne variable contre l'ensemble des souches bactériennes utilisées (3 à Gram-positif et 3 à Gram-négatif). Les CMI et les CMB sont sensibles à la fois à la nature des bactéries testées et au type d'extrait naturel utilisé (macéré ou soxhlet).

Les CMI des extraits au soxhlet de *Rubia* et *Papaver* sont de 0.23 mg/ml (bactéries $Gram^+$ : *Enterococcus f.*), ainsi que celui d'*Hibiscus* macéré.

Dans le cas des bactéries $Gram^-$ (*Klebsiella p.*). Seul l'extrait au soxhlet de *Punica* qui présente la CMI la plus intéressante de 0.93 mg/mL, suivie de 3.75 mg/mL contre *Escherichia c.*. Cette dernière valeur a été enregistrée aussi dans les extraits au soxhlet de *Rubia* (*Salmonella s., Klebsiella p.*) et *Papaver* (*Salmonella s.*), ainsi que l'extrait macéré de *Lawsonia* (*Salmonella s.*).

Concernant les CMB trouvées, les meilleurs résultats contre les bactéries $Gram^+$ sont corrélés à l'extrait macéré avec 0.187 mg/mL pour le *Quercus* (*Staphylococcus a.*) et 0.23 mg/mL pour l'*Hibiscus* (*Enterococcus f.*), suivi de ceux issus du soxhlet de *Papaver* avec 0.25 mg/mL (*Enterococcus f.*) et de *Rubia* avec 0,299 mg/mL. Quant aux bactéries $Gram^-$, les meilleurs valeurs de CMB ont été révélées sur *Listeria m*. et corrélées aux extraits de *Punica* (soxhlet) avec 0,9021 mg/mL, suivies de *Quercus* (macéré) avec 1,5 mg/mL.

. Les extraits méthanoliques (soxhlet) des six plantes ont été évalués pour leur pouvoir anticorrosif naturel au niveau de la surface de l'acier doux en milieu acide HCl 1M. De nombreuses variables ont été considérées: concentration, température et temps d'immersion. D'autres paramètres comme la perte de masse, la polarisation potentiodynamique, et la spectroscopie d'impédance électrochimique ont été utilisés afin d'approfondir l'effet des propriétés d'inhibition de la corrosion sur le devenir du matériau et l'efficacité des inhibiteurs naturels utilisés. Un phénomène d'adsorption ''physisorption'' a eu lieu à la surface du métal dû aux groupements polaires ainsi qu'aux électrons n ou π localisés dans les molécules inhibitrices (interactions), ceci a été confirmé par l'isotherme d'adsorption de Langmuir ($R^2$ > 0.99). Tous ces extraits au soxhlet évoqués ont montré des efficacités d'inhibition de corrosion très importantes (> 90%) à la concentration optimale de $1g.L^{-1}$, et respectueuses de l'environnement (chimie verte).

## Résumé

L'objectif principal de la présente étude est de valoriser les extraits (soxhlet, macération) de six plantes aromatiques et médicinales (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibsicus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*) moyennant quatre types de solvants. L'évaluation a concerné leurs criblages, leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux, leurs pouvoirs antioxydants, leurs activités antibactériennes et leurs effets sur l'acier doux en milieu acide en tant qu'inhibiteurs de corrosion respectueux de l'environnement. Les rendements d'extraction ont été plus élevés dans le cas du méthanol, suivis du mélange ternaire de solvants, puis l'acétate d'éthyle, et enfin l'acétone. Les extraits au soxhlet sont meilleurs que ceux macérés. Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminées par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu, celles des flavonoïdes totaux ont été dosées en utilisant $AlCl_3$ mesurée à $\lambda$=510 nm. Les taux les plus élevés ont été corrélés aux extraits méthanoliques. L'analyse par UV-vis des extraits méthanoliques (soxhlet, macération) ont révélé la présence d'une variété de chromophores polyphénoliques variant selon la nature de la plante ciblée (ellagyle, gallagyle, anthraquinone, naphtoquinone, flavonoïde, anthocyanes, berbérine, chlorophylle). L'analyse par spectroscopie IR a confirmé les résultats de l'UV par la présence des O-H phénoliques et oses, C=O (cétone, acide…), $C_{ar}$-O, C-O des carbohydrates, squelettes hydrocarbonés (aromatiques et alkyles). Les activités antioxydantes ont été évaluées à la fois par la recherche des activités antiradicalaires (CI50) via le test DPPH. et la détermination des concentrations efficaces (CE50) par test FRAP. Les résultats obtenus sont plus importants que ceux des références (BHT, Vitamine E) et peuvent être classés selon l'ordre croissant de CI50 : *Hibiscus* (0.35 mg/mL) < *Lawsonia* < *Punica* < *Rubia* < *Quercus* < *Papaver*.
Les CE50 sont moins importantes que celles des standards (a. ascorbique, BHT) mais plus significatives que celle de la vitamine E. Les résultats des activités antibactériennes se sont montrés variables contre les souches bactériennes utilisées (3 à $Gram^+$ et 3 à $Gram^-$). Les CMI et les CMB sont sensibles à la fois à la nature des bactéries testées et au type d'extrait utilisé (macéré ou soxhlet). Les CMI les plus remarquables sont de 0.23 mg/mL et sont corrélées aux extraits de *Rubia, Papaver* et *Hibiscus* contre l'*Enterococcus f.* ($Gram^+$), celle de 0.93 mg/mL est reliable au *Punica* contre le *Klebsiella p.* ($Gram^-$). Les meilleures CMB ont été attribuées au *Quercus* (0.187mg/mL), suivi d'*Hibiscus, Papaver* et *Rubia* (0,299 mg/mL). Les résultats des tests de corrosion sur l'acier doux en milieu HCl 1M (perte de masse, polarisation potentiodynamique et impédance électrochimique) avec les extraits méthanoliques (soxhlet) comme inhibiteurs ont montré que ces derniers sont de type mixte, et leur résistance au transfert de charge augmente en fonction du taux de l'inhibiteur, cependant la capacité de double couche diminue (diagramme Nyquist). Le phénomène d'adsorption est de type physisorption'', confirmé par l'isotherme d'adsorption de Langmuir ($R_2$ > 0.99). Tous les extraits testés ont montré des efficacités d'inhibition de corrosion très importantes (> 90%) à la concentration optimale de 1g.$L^{-1}$, et sont considérés comme écologique (respectueux de l'environnement).
Enfin, le choix de la procédure d'extraction s'est porté sur celle du soxhlet en présence du méthanol comme solvant, montrant une fiabilité et efficacité pour ces types d'extraits. Ainsi, les polyphénols identifiés (issus des plantes étudiées) pourraient être explorés en tant qu'antibactériens naturels ou comme source d'antioxydants naturels en agroalimentaire et/ou comme inhibiteurs écologiques de corrosion mais très efficaces.



**Mots clés** : Substances naturelles (6 plantes), soxhlet et macération, polyphénols et flavonoïdes, spectroscopie IRTF et UV-vis, activité antioxydante DPPH et FRAP, activité antibactérienne, inhibiteur corrosion écologique

## Abstract

The main objective of the present study is to valorize the extracts (Soxhlet, maceration) of six aromatic and medicinal plants (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibsicus s., Quercus i. and Lawsonia i.*) using four types of solvents. The evaluation concerned their screening, total polyphenol and flavonoid contents, antioxidant powers, antibacterial activities and effects on mild steel in acidic environments as environmentally friendly corrosion inhibitors. Extraction yields were highest for methanol, followed by the ternary solvent mixture, then ethyl acetate, and finally acetone. Soxhlet extracts are better than macerated extracts. Total polyphenol contents were determined by colorimetric determination of Folin-Ciocalteu, while total flavonoids were determined using $AlCl_3$ measured at $\lambda$=510 nm. The highest levels were correlated with methanolic extracts. UV-vis analysis of methanolic extracts (Soxhlet, maceration) revealed the presence of a variety of polyphenolic chromophores varying according to the nature of the target plant (ellagyl, gallagyl, anthraquinone, naphthoquinone, flavonoid, anthocyanins, berberine, chlorophyll). The analysis by IR spectroscopy confirmed the UV results by the presence of phenolic O-H and oses, C=O (ketone, acid...), Car-O, C-O of carbohydrates, hydrocarbon skeletons (aromatic and alkyl). Antioxidant activities were evaluated both by the search for antiradical activities (IC50) via the DPPH test and the determination of effective concentrations (EC50) by FRAP test. The results obtained are more important than those of the references (BHT, Vitamin E) and can be classified according to the increasing order of IC50: *Hibiscus* (0.35 mg/mL) < *Lawsonia* < *Punica* < *Rubia* < *Quercus* < *Papaver*. The EC50s are lower than those of the standards (a. ascorbic, BHT) but more significant than those of vitamin E. The results of antibacterial activities were variable against the bacterial strains used (3 to Gram+ and 3 to Gram-). MICs and MBCs are sensitive both to the nature of the bacteria tested and to the type of extract used (macerated or Soxhlet). The most remarkable MICs are 0.23 mg/mL and are correlated with *Rubia*, *Papaver* and *Hibiscus* extract against *Enterococcus f.* (Gram+), the 0.93 mg/mL MIC is reliable for *Punica* against *Klebsiella p.* (Gram-). The best BMCs were attributed to *Quercus* (0.187mg/mL), followed by *Hibiscus*, *Papaver* and *Rubia* (0.299 mg/mL). The results of corrosion tests on mild steel in 1M HCl medium (mass loss, potentiodynamic polarization and electrochemical impedance) with methanolic extracts (Soxhlet) as inhibitors showed that the latter are of mixed type, and their resistance to charge transfer increases with the level of the inhibitor, however the double layer capacity decreases (Nyquist diagram). The adsorption phenomenon is of the physisorption type", confirmed by the Langmuir adsorption isotherm ($R_2$ > 0.99). All the extracts tested showed very high corrosion inhibition efficiencies (>90%) at the optimal concentration of 1g.$L^{-1}$, and are considered to be environmentally friendly.

Finally, the choice of extraction procedure was based on the Soxhlet extraction procedure in the presence of methanol as solvent, showing reliability and efficiency for these types of extracts.

Thus, the identified polyphenols (from the plants studied) could be explored as natural antibacterial or as a source of natural antioxidants in food processing and/or as ecological corrosion inhibitors but very effective.

**Keywords**: Natural substances (6 plants), Soxhlet and maceration, polyphenols and flavonoids, FTIR and UV-vis spectroscopy, antioxidant activity DPPH and FRAP, antibacterial activity, ecological corrosion inhibitor.

# Dédicace

Je dédie ce projet :

Dans l’âme et à la mémoire de mon père disparu trop tôt,

A ma chère mère,

A mes frères et mes sœurs

Qui n’ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m’épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A tous ceux que j’aime et ceux qui m’aiment.

# Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu réaliser cette thèse.

Tout d'abord, je voudrais remercier mes directeurs de thèse, le professeur Mustapha IJJAALI et le professeur Abdellatif BOUKIR, de m'avoir permis réaliser ce travail sous leur direction, avec toute son aide. Leur gentillesse, leur accompagnement tout au long de ces années de thèse. Pour ses sages conseils et leur soutien continu et pour avoir cru en moi, même dans les moments les plus difficiles. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour exprimer ma gratitude pour tous ses précieux conseils et encouragements. Je suis ravi d'avoir travaillé avec eux car, en plus de leur soutien scientifique, ils ont toujours été là pour me soutenir et me conseiller pendant l'élaboration de cette thèse.

Je tiens à remercier professeur Touria ZAIR d'avoir accepté de présider le jury de thèse et pour sa participation scientifique et le temps qu'il a consacré à mes recherches.

Messieurs, Pr. Abderrahmane ROMANE, Pr. Jamal BRIGUI, Pr Said CHAKROUNE, Pr. Mustapha TALEB et Madame Pr. Amina BOUCETA m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse, ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Leurs remarques m'ont permis de considérer mon travail sous un autre angle. Je les remercie pour tout cela.

Je remercie également le professeur Mustapha TALEB de la Faculté des Sciences de Fès, et le professeur Bahia BENNANI de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour leur exprimer ma gratitude pour le temps précieux qu'ils m'ont réservé pour effectuer des études et des analyses. Mes remerciements s'adressent également aux doctorants des deux laboratoires. Mon passage a parié que vous avez été, avant tout, une grande expérience sur le plan humain. Je vous remercie pour votre amabilité et votre gentillesse innée.

Il est impossible d'oublier d'adresser mes remerciements les plus sincères et ma gratitude à Mme Julija GUSCA, professeur à l'Université technique de Riga en Lettonie, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de l'Institut environnemental de Riga pendant ma période de stage dans le cadre d'Erasmus plus.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes collègues doctorants des laboratoires FST et FSDM pour toutes nos discussions et conseils qui m'ont accompagné tout au long de mes études.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai partagé mes études et en

particulier ces années de travail de thèse.
Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre au soutien de cette thèse de doctorat et que je n'ai pas pu nommer.
A vous tous, un grand merci.

# Sommaire

Introduction générale ……1
Chapitre I : Revue bibliographique ……...5
A- Taxonomie (description botanique) …… 6
I.1. Punica granatum (grenade)…….…..…….. 8
I.2. Rubia tinctorum (la garance) et ses fruits ……...……9
I.3. Papaver rhoeas (coquelicot)……...……. 9
I.4. Hibiscus sabdariffa ……...……...10
I.5. Quercus ilex (chêne vert) ……..11
I.6. Lawsonia inermis (Henné) ……12
B- Polyphénols : Biosynthèse de flavonoïdes, structure-activité ……12
I.1. Biosynthèse des polyphénols (flavonoïdes) ……...13
I.1.1 Flavonoïdes et principales classes de composés phénoliques ……15
I.2. Relation structure- activité des polyphénols ……18
C- Composés phénoliques des six plantes ……...19
I.1. Composés phénoliques de Punica granatum et techniques analytiques appropriées ….20
I.2. Composés phénoliques de Rubia tinctorum ……..21
I.3. Composés phénoliques de Papaver rhoeas ……24
I.4. Composés phénoliques de l'Hibiscus sabdariffa …….……..26
I.5. Composés phénoliques de Quercus ilex ……...27
I.6. Composés phénoliques de Lawsonia inermis ……28
D- Généralités sur les méthodes d'extraction et de caractérisation des mélanges naturels ….30
1.1 Identification par UV des constituants de mélange naturel ……...31
E- Activités antioxydantes ……...34
I.1. Stress oxydant et antioxydants ……..34
I.1.1 Radicaux libres ……34
1.1.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO) ……34
1.1.1.2 Radicaux dérivés d'azote (ERN) ……..34
F- Polyohénols en tant que substitut des antibiotiques ……...38
I.1. Polyphénols en tant que substitut aux antibiotiques ……38
I.2. Antibiotiques ……39
1. 3. Résistance aux antibiotiques ……39
J- Pouvoir anticorrosif des mélanges naturels ……..40
I.1. Activité anticorrosive ……40
I.1.1 Nature électrochimique de la corrosion en milieu aqueux ……...41
1.1.2 Lutte contre la corrosion ……..41
1.1.3 Protection par inhibiteurs de corrosion ……41
1.1.4 Comportement des inhibiteurs en milieux acides ……44
1.1.5 Mécanisme d'adsorption des molécules inhibitrices à la surface du métal …….44
Références ……...45
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes
I. Matériel ……65
I.1. Matériel végétal ……..65
I.2. Produits chimiques et solvants ……... 67
I.3. Souches bactériennes ……..68
II. Méthodes ……68
II.1. Méthodologie ……68
II.2. Préparation des extraits bruts ……69
II.3. Screening phytochimique……...70
II.3.1. Révélation des polyphénols ……70

II.3.2. Révélation des flavonoïdes ……70
II.3.3. Révélation des saponines……70
II.3.4. Révélation des stérols et des polyterpènes……...71
II.3.5. Révélation des alcaloïdes ……71
II.4. Dosage des composés phénoliques ……..……71
II.4.1 Détermination du contenu phénolique total ……71
II.4.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes ……72
II.5. Techniques spectroscopiques d'identification des extraits de plantes ……..73
II.5.1. Caractérisation par spectrophotométrie ultra-violet et visible des constituants contenus dans les extraits étudiés. ……74
II.5.2. Investigation structurale par spectroscopie infrarouge (IRTF) des groupements fonctionnels contenus dans les extraits étudiés ……74
II.6. Activités antioxydantes……...74
II.6.1. Capacité antioxydante totale (CAT)……74
II.6.2. Piégeage du radical 2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) ……..75
II.6.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) ……76
II.7. Activités antibactériennes ……...77
II.7.1 Souche bactérienne et préparation de l'inoculum ……77
II.7.2. Méthode de diffusion de disque ……..77
II.7.3. Antibiogramme ……77
II.7.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)……...78
II.8. Pouvoir inhibiteur de corrosion ……..78
II.8.1. Conditions expérimentales ……...78
II.8.1.1. Echantillons utilisés……... 78
II.8.1.2 Préparation des échantillons et du milieu corrosif ……79
II.8.2. Techniques expérimentales d'évaluation de la corrosion……..79
II.8.2.1. Mesures gravimétriques ……79
II.8.2.2. Mesures électrochimiques……..79
II.8.2.2.1. Méthodes stationnaires ……...80
II.8.2.2.1.1. Tracé des courbes de polarisation ……...80
II.8.2.2.1.2. Méthode de polarisation de Tafel …… 82
II.8.2.2.2. Méthode transitoire: spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)….83
II.8.2.2.3. Exploitation des résultats par l'utilisation des circuits électriques équivalents (CEE)……85
II.8.2.2.4. Application de la spectroscopie d'impédance électrochimique EIS dans l'étude des inhibiteurs de corrosion ……85
Références ……...87
Chapitre 3 : Rendements en extraction, screening phytochimique, détermination des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes ……..90
I. Extractions et Rendements obtenus ……..90
II. Screening phytochimique ……91
III. Analyse quantitative ……..94
III.1. Détermination de la teneur totale en polyphénols ……94
III.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes …… 99
Références ……103
Chapitre 4. Caractérisation spectrophotometrique UV-vis et spectrométrie IRTF ……107
I. Caractérisation structurale par spectrophotométrie UV-vis des chromophores contenus dans les extraits de plantes (macération, soxhlet) ……..107
I.1. Punica granatum ……107

1.1.1 Effet bathochrome, hypsochrome et hyperchrome des extraits au soxhlet et macération ……..110
I.2. Rubia tinctorum ……..112
I.3. Papaver rhoeas ……113
I.4. Hibiscus sabdariffa ……..115
I.5. Quercus ilex ……117
I.6. Lawsonia inermis. ……118
II. Caractérisation structurale par spectroscopie IRTF des groupements fonctionnels contenus dans les extraits de plantes (macération, soxhlet) ……..122
II.1. Analyse par spectroscopie IRTF des extraits de Punica granatum ……123
I.4.1.1. Déconvolution des spectres IRTF des extraits de Punica g. ……..128
I.4.2.. Superposition et analyse par spectroscopie IRTF ……130
Références ……..134
Chapitre 5 : Evaluation d'activités antioxydantes et détermination des propriétés biologiques……142
I. Activités antioxydantes ……..142
I.1. Capacité antioxydante totale (CAT) ……...142
I.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) ……144
I.3. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) ……146
II Activités antibactériennes ……..153
II.1. Méthode de diffusion ……153
II.2. Antibiogramme ……156
II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) ……157
Conclusion ……167
Références ……168
Chapitre 6: Valorisation des extraits de six plantes : détermination de leurs pouvoirs inhibiteurs de corrosion vis-à-vis de l'acier doux en milieu acide et respectueux de l'environnement …… 177
I. Effet de la concentration en inhibiteurs ……177
I. 1. Méthode de perte de masse ……177
I.2. Courbes de polarisation ……...181
I.2.1. Paramètres électrochimiques issus des méthodes de Tafel ……183
I. 3. La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) ……...187
I.3.1. Diagrammes d'impédance dans le plan de Nyquist et de Bode ……187
1.3.2. Paramètres d'impédance électrochimique ……190
I.3.3. Comparaison de l'efficacité inhibitrice (η %) par méthodes : gravimétrique, polarisation et impédance ……..192
I.2. Paramètres thermodynamiques d'adsorption ……194
II. Effet de la température ……198
II.1 Température ……..198
II.1.2 .Droites d'Arrhenius et énergie d'activation (Ea), enthalpie ($\Delta H^*$) et entropie d'activation ($\Delta S^*$) ……200
III. Effet du temps d'immersion…… ..204
IV. Mécanisme d'inhibition de la corrosion…… 209
Conclusion ……212
Références ……213
Conclusion générale ……..217

# Liste des Figures

**Figure I.1** : Arbre (a) et fruits (b) de *Punica granatum* (grenade).
**Figure I.2** : Feuilles et Racines de *Rubia tinctorum* (la garance).
**Figure I.3** : Fleurs de Papaver rhoeas
**Figure I.4**: Fleurs *Hibiscus sabdariffa*
**Figure I.5**: Arbre de Quercus ilex
Figure **I.6** : Arbre et feuilles de *Lawsonia inermis* L. (Henné)
**Figure I.7** : Voie biosynthétique des flavonoïdes (Remsey 1996).
**Figure I.8** : Groupements responsables de l'activité antioxydante chez les flavon-3-ols
**Figure I.9** : Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libre [53]
**Figure I.10** : Structures chimiques des principaux composés phénoliques trouvés chez la composition de *Papaver rhoeas.*
**Figure I.11** : Structures chimiques des principaux composés phénoliques constituants d'*Hibiscus sabdariffa*.
**Figure I.12** : Structures chimiques des principaux composés phénoliques constituants de *Quercus ilex.*
**Figure I.13** : Structures chimiques des principaux constituants de *Lawsonia i.*.
Figure II.1: Démarche expérimentale d'extraction (macération, soxhlet) et d'évaluation des extraits au solvant de six différentes plantes étudiées.
Figure II.2: Diagramme schématique d'un appareil d'extraction soxhlet.
**Figure II.3 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme étalon (272 nm).
**Figure II.4:** Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée comme étalon (256 et 372 nm).
Figure II.5: Réaction de réduction du radical $DPPH^{\cdot}$ (couleur violet) avec l'antioxydant présent dans l'extrait favorisant la formation du DPPH (couleur jaune)
Figure II.6: Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) : Réaction de réduction entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et l'antioxydant (AH) présent dans l'extrait.
**Figure II.7:** Courbe de polarisation en échelle linéaire (cinétiquement contrôlée par un processus de transfert de charges). Les courbes de polarisation partielles anodique et cathodique sont représentées en pointillés.
**Figure II.8**: Diagramme schématique de la courbe de polarisation (en coordonnées semi-logarithmiques) et des droites de Tafel.
**Figure II.9:** Représentation des spectres d'impédance dans le plan de Nyquistet de Bode avec : HF: Haute Fréquence; BF: Basse Fréquence
**Figure II.10:** Dépression α observée au niveau du repère du spectre: (a) Cas idéal, en théorie pour une surface uniformément accessible, (b) Spectre obtenu dans la plupart des cas pratiques.
**Figure.III.1** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé comme étalon (272 nm).
**Figure.III.2** : Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisée comme étalon (256 et 372 nm).
**Figure IV. 1** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Punica g.:* extrait de soxhlet (haut), extrait macéré (bas).
**Figure IV. 2** Structures chimiques trouvées dans l'extrait par macération de *Punica g*.
**Figure IV. 3** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Punica g.*
**Figure IV. 4** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Rubia t.* (soxhlet, macération).
**Figure IV. 5** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Rubia t.*
**Figure IV.6** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Rubia t.*
**Figure IV. 7** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Papaver r.* (soxhlet, macération).

**Figure IV. 8** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Papaver r.*
**Figure IV. 9** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Papaver r.*
**Figure IV. 10** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Hibiscus s.* (soxhlet, macération).
**Figure IV. 11** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération d'*Hibiscus s.*
**Figure IV. 12** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet d'*Hibiscus s.*
**Figure IV. 13** : Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Quercus i.* (soxhlet, macération).
**Figure IV. 14** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Quercus i.*
**Figure IV. 15** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Quercus i.*
**Figure IV. 16** Superposition des spectres UV-vis des deux extraits de *Lawsonia i.* (soxhlet, macération).
**Figure IV.17** Structures chimiques trouvées dans l'extrait de macération de *Lawsonia i.*
**Figure IV. 18** Structures chimiques trouvées dans l'extrait au soxhlet de *Lawsonia i.*
**Figure IV. 19** Spectres IRTF des deux extraits d'écorce de grenade (*Punica g.*): soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV. 20** Spectres IRTF des deux extraits de *Rubia t.*: soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV. 21** Spectres IRTF des deux extraits de *Papavers r.* : soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV. 22** Spectres IRTF des deux extraits de *Hibiscus s.*: soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV. 23**. Spectres IRTF des deux extraits de *Quercus i.* : soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV.24** Spectres IRTF des deux extraits de *Lawsonia i.* : soxhlet (haut) et macération (bas).
**Figure IV.25** Spectres IRTF d'extraits d'écorce de grenade (*Punica granatum*) après déconvolution: (**b**) macération et (**a**) soxhlet
**Figure IV 26** : Superposition des spectres IRTF (1800-700 $cm^{-1}$) des extraits au **s**oxhlet de six plantes: (de haut en bas : *Punica g., Rubia t., Papavers r., Hibiscus s., Quercus i., Lawsonia i.*).
**Figure IV. 27** : Superposition des spectres IRTF des extraits macérés de six plantes : (de haut en bas : *Punica g., Rubia t., Papavers r., Hibiscus s., Quercus i., Lawsonia i.*).
**Figure V.1**. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pris comme référence pour la détermination de la capacité antioxydante totale (absorbance déterminée à 695 nm).
**Figure V.2.** Réaction entre les extraits riches en polyphénols (antioxydants) et le radical 2,2-diphénylpicryl-hydrazyl ($DPPH^{\cdot}$)
**Figure V.3**. Variation de la coloration du $DPPH^{\cdot}$ dans différentes concentrations des extraits des plantes.
**Figure V.4.** Test **FRAP** : Evolution du pouvoir réducteur (FRAP) en fonction des concentrations des extraits méthanoliques issus des six plantes suivantes : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*
**Figure V.4** Effet des extraits méthanoliques sur la croissance des souches *Staphylococcus aurus* (**5**), *Salmonella sp* (**S**) et *Entrobacter feacalis* (**2**) par l'utilisation de la méthode de diffusion des disques
**Figure. V.5:** Effet des extraits sur la croissance des souches bactériennes par l'utilisation de la méthode microdilution des puits
**Figure. VI.1.** Variation de l'efficacité d'inhibition (en milieu HCl 1M) sur la surface d'acier doux avec différentes concentrations des extraits au soxhlet (0.25, 0.5, 0.75 et 1 g/L).

**Figure.VI.2**. Courbes de polarisation de l'acier dans HCl 1M sans et avec addition de différentes concentrations des inhibiteurs au soxhlet de *Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonie i.*

**Figure VI.3.1.** Diagrammes de Nyquist et Bode de l'interface acier HCl 1M sans et avec addition des inhbiteurs *Punica g., Rubia t., Papaver r.* à différentes concentrations à 25°C.

**Figure VI.3.2.** Diagrammes de Nyquist et Bode de l'interface acier HCl 1M sans et avec addition des inhbiteurs *Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.* à différentes concentrations à 25°C.

**Figure VI. 4.** Comparaison de l'efficacité inhibitrice ($\eta$ %) de six extraits à différentes concentrations (HCl 1M) selon les trois méthodes : gravimétrie, polarisation et impédance.

**Figure. VI. 5.** Circuit électrique équivalent obtenu pour modéliser les boucles de Nyquist (comportement de l'acier doux en milieu HCl 1M).

**Figure VI .6** Modèles des isothermes (**Langmuir, Freundlich, Frumkin** et **Temkin**) utilisés pour décrire l'adsorption des inhibiteurs (extraits de : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) sur la surface de l'acier doux.

**Figure VI.7**. Effet de la température sur la vitesse de corrosion des six extraits inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) par utilisation de la méthode gravimétrique.

**Figure VI.8.** Effet de la température sur l'efficacité inhibitrice des extraits (inhibiteurs) (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*).

Figure VI. 9. Droites d'Arrhenius de l'acier doux en milieu HCl 1M sans et avec addition des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.* à différentes concentrations).

**Figure VI. 10.** Variation de ln ($V_{corr}/T$) en fonction de l'inverse de la température en absence et en présence des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*) de la concentration optimale $1 g.L^{-1}$.

**Figure VI.11** Spectres d'impédance expérimentale ajustés dans le plan de Nyquist relatif à l'acier, et après immersion en milieu HCl 1M en présence de chacun des inhibiteurs de concentration $1 g.l^{-1}$ (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.* ).

**Figure VI. 12**. Spectres UV-visible de HCl 1M avec $1 g.l^{-1}$ d'extrait des plantes *Punica g. rubia t. papaver r. Hibiscus s. Quercus i. et Lawsonia i.*, avant et après immersion en acier doux pendant 7jours à 298 °K.

## Liste des Tableaux

**Tableau I.1** Noms vernaculaires en Français et en Arabe de six plantes, cibles de notre étude.
**Tableau I.2** Taxonomie des certaines plantes.
**Tableau I.3** Principales classes de composés phénoliques
**Tableau I.4** Structures chimiques des constituants ‘‘anthraquinones’’ présents dans les racines de *Rubia tinctorum*
**Tableau I.5** Bandes d’absorptions en UV de quelques flavonoïdes (d’après Mrakham 1982) [166].
**Tableau I.6** Information spectrale en UV de 39 composés phénoliques (acides hydroxy-phénoliques, acides hydroxy-cinnamiques et flavonoïdes) (d’après Jianping Sun et al. 2007) [167].
**Tableau II.1:** Noms, familles et parties investiguées des espèces végétales étudiées.

**Tableau II.2** Taxonomie des plantes étudiées.
**Tableau II.3:** Propriétés physico-chimiques et indice de polarité des solvants utilisés lors de l’extraction.
**Tableau II.4:** Composition chimique des échantillons de l’acier utilisé

**Tableau II.5:** Impédance des composantes électriques élémentaires.
**Tableau III. 1.** Rendements des extraits de six plantes dans différents types de solvants (*Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonie inermis).*
**Tableau III. 2.** Criblage phytochimique des extraits de six plantes dans différents solvants (*Punica granatum L., Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareiffa, Quercus ilex et Lawsonie inermis)*
**Tableau III. 3.** Détermination des concentrations en composés phénoliques totaux dans les six extraits des plantes suivantes: *Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareifa, Quercus ilex et Lawsonie inermis*
**Tableau III. 4.** Concentrations en flavonoïdes dans les six extraits de plantes étudiées (*Punica granatum L. Rubia tinctorum, Papaver rhoeas, Hibiscus sabdareifa, Quercus ilex et Lawsonie inermis)*
**Tableau IV. 1** Affectation des bandes UV-vis de l'écorce de grenade (*Punica. granatum*) dans les deux extraits : macération et soxhlet
**Tableau IV.2** Attribution des différentes λ (nm) obtenues par UV-vis et leurs chromophores relatifs aux deux types d’extraits (macération, soxhlet) de six plantes : (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*)
**Tableau IV. 3**. Principales bandes IRTF présentes dans les deux extraits (macération, soxhlet) et leurs attributions
**Tableau V.1.** Résultats de la capacité antioxydante totale de deux types d’extraits méthanoliques (macération et soxhlet) issus de six plantes différentes (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*).
**Tableau. V.2.** Activité antiradicalaire (**CI50**) avec test DPPH· de deux types d’extraits méthanoliques (macération, soxhlet) appartenant aux six plantes suivantes: *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*
**Tableau. V.3.** Concentrations efficaces **(CE50**) des extraits méthanoliques (macération et soxhlet) issus des six plantes suivantes : *Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i*.
**Tableau V.4** Zones d'inhibition des deux extraits méthanoliques (macération et soxhlet) de l’écorce de *Punica granatum* L contre six souches bactériennes étudiées

**Tableau V.5** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des antibiotiques testés contre *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and Enterobacter feacalis.*
**Tableau V.6**: Valeurs de **CMI** in vitro (mg/ml) de 12 extraits de plantes (macération + soxhlet) contre six souches bactériennes *(Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterobacter feacalis).*
**Tableau V.7 :** Valeurs de **CMB** in vitro (mg/ml) des extraits des six plantes (macération, soxhlet) contre six souches bactériennes *(Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterobacter feacalis).*
**Tableau VI.1.** Vitesses de corrosion et efficacités inhibitrices correspondant aux différentes concentrations des inhibiteurs au soxhlet pour la corrosion de l'acier dans HCl 1M à 298 °K.
**Tableau VI.2**: Paramètres électrochimiques issus des courbes de polarisation
**Tableau VI.3**: Paramètres électrochimiques issus des diagrammes d'impédance relatifs à l'acier doux dans HCl 1M puis en présence des inhibiteurs testés (*Punica g., Rubia t., Papaver r. Hibiscus s., Quercus i.* et *Lawsonia i.*)
**Tableau VI.4**: Constantes d'adsorption et énergies libres standards d'adsorption ($\Delta G^0_{ads}$) après ajout de 1 $g.l^{-1}$ de chacun des six extraits (inhibiteurs).
**Tableau VI.5**: Effet de la température sur l'évolution de la vitesse de corrosion et du pouvoir inhibiteur.
**Tableau VI.6.** Paramètres d'activation ($E_a$, $\Delta H^*$, $\Delta S^*$) du processus de corrosion de l'acier en milieu acide (HCl 1M) sans et avec inhibiteurs de concentration 1 $g.l^{-1}$ (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*).
**Tableau VI.7.** Effet du temps d'immersion sur les paramètres électrochimiques et l'efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier en milieu acide (HCl 1M), sans et avec addition des inhibiteurs (*Punica g., Rubia t., Papaver r., Hibiscus s., Quercus i. et Lawsonia i.*)

# Liste des abbreviations

°C : Degré Celsius
°K : Degré Kelvin
AcOEt : Acétate d'éthyle
BHT:  butylhydroxytoluene butylhydroxytoluène
BHT: butylatedhydroxytoluene
CCM : Chromatographie sur couche mince
Cdc: Pseudo-capacité de la double couche
CEE: Circuit Electrique Equivalent
CFU: Colony forming unit
Cinh: Concentration de l'inhibiteur
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CPE: *Constant Phase Element*
DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
DPPH: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG: Equivalent d'acide gallique
EC : efficient concentration
Ecorr: Potentiel de corrosion
EOR : espèces oxygénées réactives
EQ: Equivalent quercétine
ER: Electrode de Référence
ERK: Extracellular Signal Regulated Kinases
ERN: Espèce réactive d'azote
ERO: Espèce réactive d'oxygène
$FeCl_3$ : trichloride de fer
FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*.
HCl : Acide chlorohydrique
HPLC : high pressure liquid chromatography -
IC50 : Concentration inhibitrice à50%
IC50: Concentration inhibitrice à 50%
icorr: Courant de corrosion
MeOH : Méthanol
mg EAG/ g MS: milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche.
mg ET/ g MS: milligramme d'équivalents de Trolox par gramme de matière sèche.
MHA : MuellerHinton
OCP: Open *Circuit Potential*
Rct: Résistance de transfert de charge
Rf: Résistance du film inhibiteur
ROS: reactive oxygen species -
Rp: Résistance de polarisation
RPL: Résistance de Polarisation Linéaire

Rs: Résistance de la solution
SIE: Spectroscopie d’Impédance Electrochimique
TSA: tryptone soy agar -
TSB: trypic soy broth -
UHPLC: ultra-high pressure liquid chromatography -