AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THESE

Présentée par

ZAITER ALI

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Discipline Chimie organique
Spécialité Phytochimie

Etude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres superfines

---

Le **03 Mars 2017** devant le jury composé de :

Rapporteurs	:	Nathalie CAYOT (Pr)	Agrosup Dijon
		Adam DAÏCH (Pr)	Université du Havre
Examinateur	:	Michèle SINDT (MCF)	Université de Lorraine
Invité	:	Elie BAUDELAIRE (Dr)	AGRITECH - France
Dir. de recherche	:	Amadou DICKO (Pr)	Université de Lorraine

Je dédie cette thèse à mes parents.

Remerciements

Mes remerciements les meilleurs vont :

Tout d'abord au Pr. ***Amadou Dicko****, directeur de cette thèse, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir fait découvrir le métier de chercheur, son encadrement, son enthousiasme communicatif et aussi pour ses idées novatrices qui sont un moteur pour ses étudiants.*

Je tiens à exprimer ma vive gratitude au Pr. ***Adam Daïch****, au Pr.* ***Nathalie Cayot*** *et au Dr.* ***Michèle Sindt*** *d'avoir accepté d'évaluer les travaux de ma thèse et de faire partie du jury.*

Au Dr. ***Loïc Becker****, j'exprime toute ma reconnaissance pour sa contribution à la réussite de ce travail, ainsi que mon profond respect pour m'avoir fait bénéficier de son expérience scientifique et professionnelle.*

A tout le personnel administratif, surtout Mme ***Catherine Larrière,*** *sans oublier le corps enseignant pour avoir assuré notre formation.*

Au Dr. ***Elie Baudelaire*** *de m'avoir accueilli dans son équipe de travail dans le projet Extrapole, avec un grand plaisir et un profond respect pour ses précieux conseils et ses disponibilités. Ses expériences et ses grandes compétences m'ont aidé à accomplir ce travail. Qu'ils trouvent ici les marques de ma reconnaissance et de mon respect pour la façon efficace et amiable avec laquelle il a suivi ce travail.*

Pour finir, j'adresse mes remerciements à ma famille et tous mes amis pour leur aide, leur présence et leurs encouragements.

Résumé

Ce projet porte sur l'étude de plusieurs plantes d'intérêt de la Lorraine afin d'extraire par voie sèche et d'analyser des substances bioactives pour une valorisation de la flore locale. Un procédé de broyage et de tamisage de matériel végétal en de fines particules est utilisé afin de concentrer les composés bioactifs dans les poudres résultantes. Les poudres présentent des tailles de particules allant de 20 µm à 500 µm. Les propriétés phytochimiques de chaque classe granulométrique sont comparées à celle des parties de plantes non tamisées. Ces activités sont liées aux métabolites secondaires notamment les polyphénols et les dérivés terpéniques, qui sont caractérisés et quantifiés par des analyses LC-MS et GC-MS. Au cours de ce travail ont été développés : - la validation d'une nouvelle technique de séparation différentielle en fonction de la granulométrie des poudres par comparaison avec des extraits de plantes non tamisées ; - le dosage des différents constituants chimiques par des méthodes spectrométriques (UV/Visible), la caractérisation par des techniques analytiques telles que la LC-MS et GC-MS ; - l'évaluation du potentiel antioxydant/anti-radicalaire et anti-acétylcholinestérase réalisée par voie chimique *in vitro* en fonction des classes granulométriques. Cette étude démontre l'intérêt que présente ce nouveau procédé d'extraction différentiel des composés bioactifs issue de matrices végétales. Un enrichissement en produits actifs est observé au niveau de certaines classes granulométriques. Au niveau des activités antioxydante pour toutes les plantes et de l'activité anti- acétylcholinestérase dans le cas du saule blanc, on observe des variations significatives en fonction de la taille de particules des échantillons des poudres superfines. L'étude de l'activité anti- acétylcholinestérase a été complétée par une modélisation *in silico* afin de mettre en évidence l'interaction entre les composés et les sites actifs de l'enzyme acétylcholinestérase.

Abstract

This project focuses on the study of 12 plants coming from Lorraine region. The study aims to improve the exploitation of local flora using a dry extraction process. A milling and a sieving process up to fine particles of plant material is used to concentrate the bioactive compounds in the resulting powders. The powders were classified according to the particle size which were ranging from 20 µm to 500 µm. The phytochemical properties of each particle size fraction are compared to non-sieved plant parts. These activities are linked to secondary metabolites including polyphenols and terpene derivatives, which are characterized and quantified by LC-MS and GC-MS analyses. It was developed in this work a new validation technique of differential separation depending on the particle size of the powders compared with extracts of non-sieved plant parts. The quantification of chemical compound classes was done by UV-Visible methods and their identification was conducted using LC-PDA/MS and GC-MS characterization technics. The evaluations of the antioxidant activity and anti-acetylcholinesterase activity is carried out *in vitro* according to the particle sizes. This study demonstrates the usefulness of this new differential extraction process of bioactive compounds from vegetal matrices. The Enhancing of the concentration of the active products is observed according to the particle sizes. *In silico* modeling study of anti-acetylcholinesterase activity is employed to highlight the interactions between the active sites and some anticipated active compounds in the extract.

Table des matières

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Données ethnobotaniques

1 Plantes sélectionnées..... 14

1.1 Houblon (*Humulus Lupulus*) 14

1.1.1 Présentation générale 14

1.1.2 Composition chimique et intérêt 15

1.2 Achillée millefeuille (*Achillea millefolium*) 16

1.2.1 Présentation générale 16

1.2.2 Composition chimique et intérêt 17

1.3 Millepertuis (*Hypericum perforatum*) 18

1.3.1 Présentation générale 18

1.3.2 Composition chimique et intérêt 18

1.4 *Ortie (Urtica dioica)* 19

1.4.1 Présentation générale 19

1.4.2 Composition chimique et intérêt 19

1.5 Le fenouil (*Foeniculum vulgare*) 20

1.5.1 Présentation générale 20

1.5.2 Composition chimique et intérêt 21

1.6 Scrofulaire noueuse (*Scrophularia nodosa*) 22

1.6.1 Présentation générale 22

1.6.2 Composition chimique et intérêt 22

1.7 Rosier des chiens (*Rosa canina L.*)..... 23

1.7.1 Présentation générale 23

1.7.2 Composition chimique et intérêt 23

1.8 Lierre (*Hedera helix L.*) 24

1.8.1 Présentation générale 24

1.8.2 Composition chimique et intérêt 24

1.9 Piloselle (*Hieracium pilosella*) 25

1.9.1 Présentation générale 25

1.9.2 Composition chimique et intérêt 26

1.10 Saule blanc (*Salix alba*) 26

1.10.1 Présentation générale 26

1.10.2 Composition chimique et intérêt 27

1.11 Basilic (*Ocimum basilicum L.*) 27

1.11.1 Présentation générale 27

1.11.2 Composition chimique et intérêt 28

1.12 Reine-des-prés (*Filipendula ulmaria*) 29

1.12.1 Présentation générale 29

1.12.2 Composition chimique et intérêt 29

1.13 Thé vert (*Camellia sinensis* L.) 30

1.13.1 Présentation générale 30

1.13.2 Composition chimique et intérêt 30

Chapitre II: Métabolismes secondaires

1 Métabolites primaires 31

1.1 Lipides 31

1.2 Sucres 32

1.3 Peptides 32

2 Métabolites secondaires 32

2.1 Alcaloïdes 33

2.2 Polyphénols 33

2.2.1 Acides phénoliques 34

2.2.2 Flavonoïdes 36

2.3 Terpénoïdes 42

2.4 Saponines 42

Chapitre III: Activité biologique

1 Activité antioxydante 43

1.1 Test ABTS 44

1.2 Test DPPH 45

2 Activité anti-acétylcholinestérase 46

2.1 Maladie d'Alzheimer (MA) 46

2.2 Principe du test d'Ellman 48

2.3 Modélisation 49

Chapitre IV: Chromatographie analytique

1 Chromatographie liquide 49

1.1 HPLC 49

1.2 LC-PDA/MS 50

2 Chromatographie gazeuse 53

2.1 GC-MS 53

Chapitre V: Production de poudres superfines

1 Broyage et tamisage 55

2 Pulvérisation et Tamisage différentiel (PTC) 57

Chapitre VI: Méthodes d'extractions

1 Introduction 58

2 Extraction par macération 59

3 Extraction par Soxhlet 60

4 Hydrodistillation 60

5 Méthodes d'assistance à l'extraction 61

5.1 Méthodes précédantes 61

5.2 Nouvelles méthodes 62

6 Références 63

Partie II: Travaux réalisés

Chapitre I: Analyses chimiques

1 Préparation des échantillons 79

1.1 Préparation des poudres 79

1.2 Méthodes d'extraction 80

1.2.1 Extraction des composés phénoliques 80

1.2.2 Extraction des huiles essentielles 80

2 Screening 81

3 Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante 82

3.1 Méthodes d'analyse 82

3.1.1 Polyphénols totaux 82

3.1.2 Flavonoïdes totaux 83
3.1.3 Dosage des tannins 84
3.1.4 Activité antioxydante 84
3.1.5 Calculs statistiques 87
4 Résultats 88
4.1 Screening 88
4.2 Dosages et activité antioxydante des 12 plantes 88
4.2.1 Echantillons non broyés 89
4.2.2 Echantillons des poudres superfines (fractions granulométriques) 91
4.2.3 Conclusion 102

Chapitre II: Analyses par chromatographies

1 Matériel et méthode 105
1.1 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) 105
1.2 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) 107
2 Résultats 108
2.1 Reine-des-prés 108
2.1.1 LC-PDA/MS 108
2.1.2 GC-MS 110
2.2 Millepertuis 110
2.3 Saule blanc 113
2.4 Basilic 115
2.4.1 LC-PDA/MS 115
2.4.2 GC-MS 117
2.5 Houblon 118

2.6 Lierre grimpant 121

2.7 Achillée millefeuille 123

2.8 Piloselle 125

2.9 Fenouil 127

2.9.1 LC-MS 127

2.9.2 GC-MS 129

2.10 Ortie 129

2.11 Scrofulaire noueuse 131

2.12 Rosier des chiens 134

2.13 Conclusion 136

Chapitre III: Activité anti-acétylcholinestérase

1 Test d'Ellman 137

1.1 Mode opératoire 137

1.2 Résultats 137

2 Criblage virtuel par Docking moléculaire 139

2.1 Principe du Docking 139

2.2 Résultats théoriques *in silico* : modélisation par le Docking 141

2.2.1 Interaction galantamine – AChE 141

2.2.2 Interaction catéchine – AChE 143

2.2.3 Interaction salicine – AChE 145

Références 147

Listes des abréviations

AChE : Acétylcholinestérase

ACh : Acétylcholine

AAO : Activité antioxydante

ATCI : Acétylthiocholine iodide

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AAPH : 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CAS : Site anionique catalytique

DTNB : 5,5'-dithiobisnitrobenzoate

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle

EAG/g MS : Equivalent acide gallique par gramme de matière sèche

ECat/g MS : Equivalant catéchine par gramme de matière sèche

EqTrolox/g MS : Equivalent trolox par gramme de matière sèche

ESI : Electrospray Ionization

FVT : Flavonoïdes totaux

GC- MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse

HPLC : La chromatographie liquide haute performance

IE : Impact électronique

IC : Ionisation chimique

IC_{50} : La demi concentration inhibitrice d'une substance

LOD : Limit Of Detection

LOQ : Limit Of Quantification

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse

m/z : rapport masse sur charge

MA : Maladie d'Alzheimer

NT : Non tamisé

PDA : Photodiode Array Detector

PTC : Pulvérisation & Tamisage différentiel Contrôlés

PPT : Polyphénols totaux

PAS : Site anionique périphérique

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

SIM : Selected Ion Monitoring

TIC : Total Ion Current

T_R : Temps de rétention

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

UV-Visible : Ultraviolet-visible

U.A. : Unité Arbitraire

Introduction

La superficie de la Lorraine est de 23 547 km^2. C'est l'une des régions les plus boisées de la France métropolitaine. Elle compte 42% de forêts des collectivités (361 200 ha), 32% de forêts privées et militaires et 2% de forêts domaniales (218 600 ha). La Lorraine dispose ainsi d'une flore riche et variée. Néanmoins, il faut noter que le nombre d'espèces végétales diminue de plus en plus. Il devient donc important de protéger ces espèces afin de poursuivre leur exploitation. Raison pour laquelle, la recherche de molécules chimiques actives d'origines naturelles constitue un des axes prioritaires de l'industrie et de la recherche scientifique en Lorraine.

Dans ce contexte, la région Lorraine au travers d'une série de projets scientifiques s'intéresse à l'exploration de la flore locale.

La recherche développée au cours de cette thèse s'inscrit dans un projet de la région Lorraine intitulé « EXTRAPOLE ». Ce projet regroupe plusieurs acteurs lorrains dont deux PME : Agritech France, une société de commercialisation de produits alimentaires séchés, et Végafruits qui commercialise et distribue des fruits et légumes principalement en Lorraine, ainsi que trois équipes de recherches réparties dans deux laboratoires de l'Université de Lorraine : le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) et l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA). La première équipe qui appartient au LIBio a assuré la production de poudres superfines de qualité constante issues de différentes parties de plantes de la région Lorraine, et la réalisation des analyses physico-chimiques. La deuxième équipe, nommée URAFPA II s'est chargée d'une part, de sélectionner des plantes régionales en fonction de leur intérêt biologique, et d'autre part de réaliser les analyses biologiques *in vivo* des extraits végétaux. La troisième équipe URAFPA I au sein de laquelle ce travail de thèse a été développé s'est intéressée aux caractérisations chimiques des extraits des poudres par la mise en place de méthodologies d'analyses spécifiques.

Le projet EXTRAPOLE repose sur le brevet "PCT/FR2011/000561", qui est un procédé de Pulvérisation & Tamisage différentiel Contrôlés (PTC). Ce nouveau procédé de broyage et de criblage différentiel contrôlé peut être utilisé pour extraire et/ou séparer de façon écologique par voie sèche des composés bioactifs issus de matrices végétales (Baudelaire, 2013). Lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention, l'organe du végétale subit une dessiccation, puis le résidu sec est broyé et les poudres superfines sont fractionnées par tamisage contrôlé en fonction de leurs granulométries.

Ce brevet revendique une extraction de principes actifs naturels, il se distingue des procédés d'extraction classiques en ce qu'il n'utilise aucun solvant organique, il se distingue aussi des procédés dit de la chimie verte qui utilisent des fluides supercritiques ou des plantes à traire. Les intérêts de ce procédé sont sa facilité de mise en œuvre pour la production de gros volumes et sa capacité à extraire une gamme élargie d'actifs de taille et de poids moléculaires très variés.

Le procédé se caractérise par la succession des étapes suivantes :

- Etape 1 : une dessiccation effectuée par des techniques de déshydratation.
- Etape 2 : une pulvérisation effectuée par toute forme de broyage connue.
- Etape 3 : une dispersion permettant d'obtenir un nuage particulaire formé de micro ou de nano particules dispersées dans l'air ou dans un gaz inerte.
- Etape 4 : un tamisage différentielle contrôlé qui permet de séparer les particules en fonction de leur taille granulométrique.
- Etape 5 : une récupération progressive des actifs piégés entre deux tamis par aspiration.

Ainsi, le procédé selon l'invention permet l'obtention de produits qui se prêtent à des applications en chimie analytique et dans les domaines agricoles, alimentaires, neutraceutiques, cosmétiques et pharmaceutiques.

Le but de ce travail est de valider cette nouvelle méthode d'extraction de métabolites secondaires par voie sèche. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de développer une méthodologie d'analyse chimique afin de comparer la teneur en composés bioactifs entre des échantillons broyés non tamisés et des échantillons de poudres superfines de différentes classes granulométriques afin de vérifier si le PTC conduit effectivement à un enrichissement en composés d'intérêts.

Les substances naturelles que l'on trouve dans les plantes représentent une source importante de chimio-diversité, avec des structures originales dont la synthèse est souvent difficile à réaliser. Ce qui explique que ces dernières années nous assistons à un regain d'intérêt pour les plantes dont sont issues de nombreuses substances naturelles. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédures permettant d'extraire les principes actifs d'origine naturelle.

C'est ainsi que la phytochimie ou la chimie végétale, en tant que discipline distincte s'est développée ces dernières années. Elle se situe aux interfaces de la chimie organique, de la chimie analytique et de la biochimie. D'une part, elle s'intéresse à l'étude des structures chimiques des substances organiques qui sont élaborées et accumulées par les plantes. Ce travail nécessite la mise au point de méthodologies d'isolement, de purification, d'identification et de caractérisation des nombreux constituants présents dans les plantes. Ce travail a recours à des techniques chromatographiques dont le choix dépend de la nature des composés à séparer. D'autre part, la phytochimie permet de mettre en évidence les activités biochimiques.

L'utilisation de plantes pour leurs bienfaits date de la préhistoire. De nos jours, cette demande croit dans plusieurs domaines tels que la médecine, la cosmétique, la pharmaceutique ou encore l'agro-alimentaire. En effet, certaines plantes ont de nombreuses vertus et renferment des composés actifs qui peuvent jouer un rôle positif pour la santé humaine. La recherche se focalise sur ces substances afin d'étudier leurs effets potentiels et de nombreuses recherches sont menées pour les extraire et les caractériser.

Les végétaux contiennent divers métabolites dont les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Ces derniers jouent un rôle dans la protection de la plante contre les agressions d'agents pathogènes. Ils sont classés selon plusieurs groupes, dont les trois principaux sont les alcaloïdes, les terpénoïdes ainsi que les polyphénols (Harborne, 1983).

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons principalement, à deux familles de métabolites secondaires : les polyphénols et les terpénoïdes. Les polyphénols, sont des composés organiques ayant des propriétés antioxydantes qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine. En effet, ils présentent un intérêt pour la prévention et le traitement de certaines maladies voire certains cancers, les maladies inflammatoires, cardiovasculaires. Les

terpénoïdes contenus dans les huiles essentielles sont des composés fortement odorants qui protègent les plantes en repoussant leurs éventuels prédateurs. Ils sont principalement retenus pour leur intérêt en cosmétique, en industries pharmaceutiques et en biotechnologies.

Nous avons choisi de mettre au point une méthodologie d'analyse à partir d'échantillons séchés de feuilles de thé vert. Par la suite, cette étude sera étendue à 12 plantes de la Région Lorraine sélectionnées par l'équipe URAFPA II en fonction de leur potentiel bioactif. La production des poudres superfines grâce au procédé PTC ainsi que leurs caractérisations physico-chimiques seront réalisées par l'équipe du LiBio.

La première partie du manuscrit est une étude bibliographique qui porte sur la monographie des plantes retenues, sur une description générale des métabolites secondaires et enfin, sur les principales méthodes d'extractions des composés bioactifs et sur l'activité enzymatique.

La deuxième partie consacrée aux travaux expérimentaux, présente la méthodologie d'identification et de quantification des polyphénols ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante. Ensuite, la caractérisation par LC-MS et GC-MS des différents composés actifs sera décrite. Enfin, l'activité anti-acétylcholinestérase et la modélisation *in silico* seront présentées.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Données ethnobotaniques

1 Plantes sélectionnées

Cette étude bibliographique présente les différentes activités biologiques ainsi que les principaux composés bioactifs contenus dans les 12 plantes sélectionnées suivantes : le houblon (*Humulus Lupulus*), l'achillée millefeuille (*Achillea millefolium*), le millepertuis (*Hypericum perforatum*), l'ortie (*Urtica dioica*), le fenouil (*Foeniculum vulgare*), la scrofulaire noueuse (*Scrophularia nodosa*), le rosier des chiens (*Rosa canina* L.), le lierre (*Hedera helix* L.), la piloselle (*Hieracium pilosella*), le basilic (Ocimum basilicum L.), le saule blanc (*Salix alba*) et la reine des près (*filipendula ulmaria*). Ces plantes ont été sélectionnées pour leur usage traditionnel. Chacune de ces plantes a été authentifiée par le LIBIO.

1.1 Houblon (*Humulus Lupulus*)

1.1.1 Présentation générale



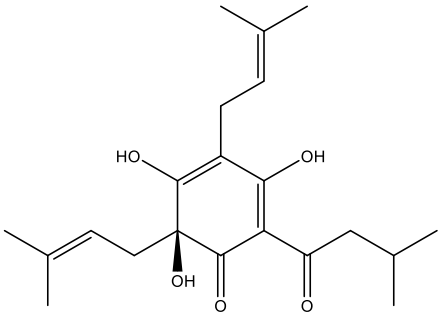
Figure 1 : cônes du houblon (Humulus lupulus). (www.Gerbeau.com)

Le houblon est un végétal grimpant de grande taille, issue de la famille des Cannabaceae, pouvant atteindre plusieurs mètres de hauteur. Le houblon pousse naturellement en milieux frais et humide. Cette plante est parfois désignée sous ses appellations usuelles tels que : couleuvrée septentrionale, bois du diable, vigne du Nord ou encore salsepareille indigène. C'est une plante dioïque qui produit sous ses assises des fleurs mâles et femelles dénommées strobiles à cause de leur forme conique. Ces dernières comportent de petites glandes qui produisent du lupulin, une substance qui donne son goût amer au houblon et également à la bière. Cette substance donne aussi à la plante ses propriétés médicinales (Yamaguchi et al., 2009).

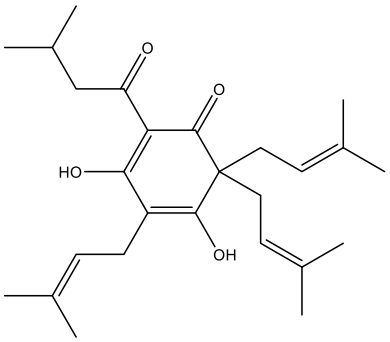
1.1.2 Composition chimique et intérêt

Depuis le XVI^{ème} siècle, le houblon est connu pour ses nombreuses vertus. En effet, il est connu pour ses propriétés diurétique, dépuratif et antiseptique. De par ses principes amers, il est considéré comme aromatisant. Fenselau and Talalay, (1973) rapportent que sa composition en huiles essentielles lui donne des propriétés sédatives et des effets œstrogéniques. En pharmacologie, il est utilisé comme calmant ou même comme agent chimiopréventif du cancer (Zanoli and Zavatti, 2008). De plus, les composés du houblon ont des activités antibactérienne, antioxydante, et anti-collagénase (Yamaguchi et al., 2009).

Le houblon est également composé de résines constituées d'un mélange complexe de dérivés cétoniques (2% à 12% d'humulones et 2% à 10% de lupulones) qui lui confèrent son goût amer. Les extraits de cette plante sont riches en humulone ; cohumulone, et en lupulone ; colupulon respectivement appelés acide alpha et acide beta. Ces acides jouent un rôle dans la prévention du diabète mais aussi contre les maladies cardiovasculaires (Van Cleemput et al., 2009).

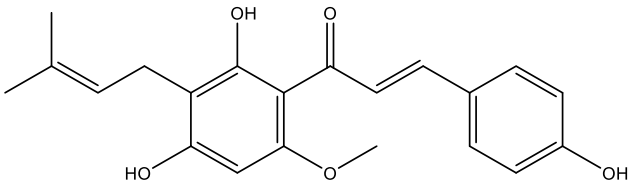


Humulone (alpha-acide).



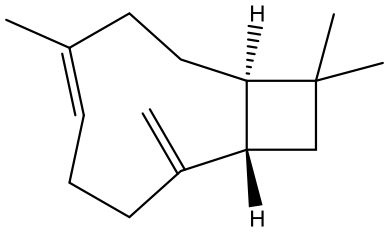
Lupulone (beta-acide)

Quelques composés polyphénoliques tels que les prénylflavonoïdes qui sont une sous-classe des flavonoïdes sont répertoriés dans la littérature chez le houblon, (Prencipe et al., 2014 ; Zhao et al., 2004). Certains prénylflavonoïdes sont connus pour leurs activités œstrogéniques et antioxydantes (Dufall et al., 2003). Selon Keiler et al., 2013, la 8-prénylnaringinine est le phyto-œstrogène le plus actif du houblon. On retrouve également des chalconoïdes prénylés tels que le xanthohumol et le desméthylxanthohumol qui sont considérés comme des agents efficaces dans la prévention de certains types de cancer (Gerhauser et al., 2002 ; Nikolić and van Breemen, 2013).

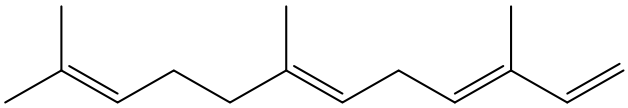


Xanthohumol (chalconoïde prénylé)

Le houblon contient une faible quantité d'huiles essentielles comprise entre 0,5% à 2%. Ce sont des composés très variés, on en trouve plus de 200 différentes dont 4 majoritaires, le myrcène, l'humulène, le caryophyllène et le farnésène (Bowman et al., 1997).



β-caryophyllène



α-farnésène

1.2 Achillée millefeuille (*Achillea millefolium*)

1.2.1 Présentation générale



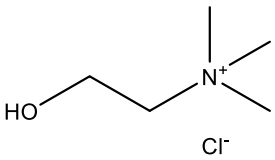
Figure 2 : parties aériennes de l'achillée millefeuille (Achillea millefolium). (www.altheaprovence.com)

L'achillée millefeuille est une plante vivace de la famille des astéracées qui pousse dans les zones tempérées telles que l'Europe, l'Asie et l'Amérique du Sud. C'est une plante à tige ramifiée qui mesure entre 60 et 80 cm. Les tiges du millefeuille sont recouvertes de poils laineux et blanchâtres. Ses feuilles allongées sont de couleur vert-foncé. La floraison intervient entre juin et septembre. Les capitules de fleurs de l'achillée millefeuille sont blancs, roses ou pourpres et portent en leur cœur des fleurons blanc-jaune à jaune.

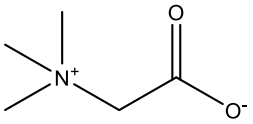
1.2.2 Composition chimique et intérêt

Parmi les composés actifs du millefeuille, on trouve principalement de l'acide chlorogénique et ses dérivés : les acides dicaféylquiniques, connus pour leur activité antioxydante (Candan et al., 2003). En revanche, d'autres composés de la famille des flavonoïdes sont mentionnés chez cette plante, comme l'apigénine-glucoside et la lutéoline-glucoside. Ces deux molécules présentent en outre une activité antispasmodique démontrée par les travaux de (Vitalini et al., 2011). Une étude menée sur des extraits d'achillée millefeuille a montré des effets antibactériens sur Staphylococcus aureus (Molochko et al., 1990). En plus de leur activité antioxydante, l'acide chlorogénique et l'apigénine ont une activité anti-acétylcholinestérase qui aide à lutter contre la maladie d'Alzheimer (Ouattara et al., 2013a).

L'achillée millefeuille contient également des lactones sesquiterpéniques (guaianolides, germacranolides, eudesmanolides). On y trouve aussi des alcaloïdes tels que la bétaïne, la choline, la stachydrine et l'homostachydrine (Hausen et al., 1991).

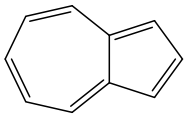


Choline

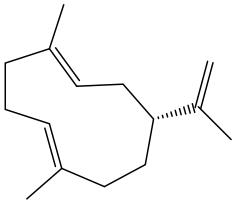


Bétaïne

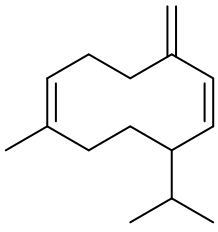
Enfin, elle contient aussi des huiles essentielles dont des sesquiterpènes tels que le β-caryophyllène, le germacrène et l'Azulènes (Candan et al., 2003).



Azulènes



Germacrène A



Germacrène D

1.3 Millepertuis (*Hypericum perforatum*)

1.3.1 Présentation générale



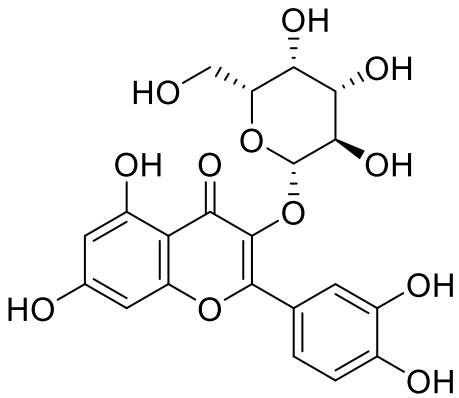
Figure 3 : parties aériennes et fleurs du millepertuis (Hypericum perforatum). (www.troubles-psychiques.com)

Le millepertuis est un arbuste herbacé, annuelle ou vivace, il pousse souvent dans les montagnes et peut atteindre une dizaine de mètre de haut. Il est composé de feuilles de formes ovales à lancéolées, de fleurs jaunes possédant cinq pétales et de nombreuses étamines. Ses fruits sont des capsules sèches qui éclatent à maturité en libérant un grand nombre de petites graines.

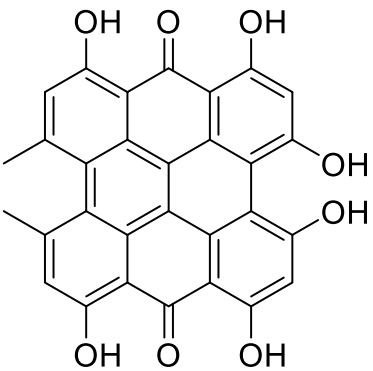
1.3.2 Composition chimique et intérêt

Traditionnellement, le millepertuis est une plante couramment utilisée pour traiter la dépression, l'anxiété et les troubles du sommeil. C'est une plante efficace contre la fibromyalgie, la migraine, et les douleurs musculaires. Il est connu pour avoir des activités anti-inflammatoire (Kim et al., 2011) et antioxydante (Bernardi et al., 2007).

Les naphtodianthrones sont des composés spécifiques au millepertuis (Saint John's Wort). L'hyperforine et l'hypéricine sont les deux naphtodianthrones les plus importants, ils possèdent des propriétés antidépressives (Wang et al., 2010). L'hypéroside (quercétine-O-galactoside) est le flavonoïde principal et spécifique du millepertuis (Kim et al., 2011).



Hypéroside



Hypéricine

On trouve aussi de l'épicatéchine, de la famille des flavan-3-ol de même que de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique qui présentent une activité antioxydante. Les catéchines permettraient de prévenir les cancers et diminuent le risque de maladies cardiovasculaires (Higdon and Frei, 2003). Des propriétés anxiolytiques et antidépressives de l'acide chlorogénique ont été démontrées chez les souris (Bouayed et al., 2007). Cependant, à concentration égale l'activité antioxydante de l'acide chlorogénique est légèrement moins forte que celle de l'acide caféique (Emma M. Marinova, 2009).

1.4 *Ortie (Urtica dioica)*

1.4.1 Présentation générale



Figure 4 : parties aériennes de l'ortie (Urtica dioca). (www.pearltrees.com)

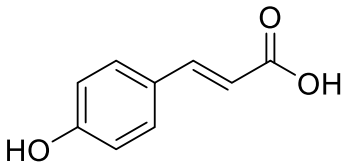
L'ortie de son appellation latine *Urtica dioica* est une plante herbacée haute de 50 cm à 1 m, qui fait partie de la famille des urticaceae, elle pousse notamment en Europe. Elle est très connue en France et plus particulièrement en Lorraine.

1.4.2 Composition chimique et intérêt

C'est une plante qui est utilisée dans de nombreux domaines comme l'agro-alimentaire sous forme de colorants naturels ou encore en cosmétique. Selon la tradition, des propriétés diurétiques sont attribuées aux feuilles d'ortie. La tisane de feuilles d'ortie est utilisée en cas d'irritation de la vessie et contre les sensations de brûlure lors de la miction. Mais son domaine d'application majeure reste la médecine. En effet pendant de nombreuses années elle a été utilisée comme remède traditionnel pour traiter les rhumatismes, l'eczéma, l'arthrite ou encore l'anémie. Des recherches plus récentes ont également démontrées que l'ortie pouvait être utilisée pour les traitements rénaux (Kukric et al., 2012)(Orčić et al., 2014).

Chez l'ortie les flavonoïdes sont représentés par des hétérosides, en particulier, de la quercétine et du kaempférol. Récemment, des analyses par HPLC effectuées sur des extraits méthanoliques d'ortie ont permis de montrer que la plante contenait plusieurs composés

phénoliques de la famille des flavonoïdes la quercétine-3-O-glucoside (isoquercétine), la quercétine-3-O-rutinoside, le kaempférol-3- O-glucoside, le kaempférol-3-O-rutinoside ou des acides phénoliques comme les acides caféique, férulique, chlorogénique ou encore l'acide *p*-coumarique (Aslan et al., 2014). L'acide férulique est connu pour son activité antioxydante, elle est toutefois inférieure à celle de l'acide caféique. En effet, ce dernier est celui qui présente l'activité antioxydante la plus importante parmi les acides hydroxycinnamiques (Kikuzaki et al., 2002). Ce sont ces composés qui donnent à la plante ses propriétés antioxydantes.



Acide p-coumarique

Les feuilles d'ortie cultivées ou sauvages contiennent de grandes quantités d'acide chlorogénique et 2-O-caffeoylmalic, qui représentent respectivement 71,5 et 76,5% de composés phénoliques totaux (Pinelli et al., 2008). Parmi toutes les parties de l'ortie, ce sont les feuilles qui possèdent la meilleure activité antioxydante (76 %) (Hudec et al., 2007). Les feuilles renferment également de la vitamine C, A, B1, B2 et E ainsi que des caroténoïdes sous forme de β-carotène. Des polyphénols sous forme de tannins (Otles and Yalcin, 2012). Les tiges et les racines contiennent également des flavonoïdes mais en quantité plus faible que dans les feuilles (Otles and Yalcin, 2012).

1.5 Le fenouil (*Foeniculum vulgare*)

1.5.1 Présentation générale



Figure 5 : graines (fruits) du fenouil (Foeniculum vulgare). (www.ormenis.com)

De son appellation scientifique *Foeniculum vulgare*, le fenouil est une espèce de plante généralement vivace, c'est une herbe qui pousse parfois deux fois naturellement sur une année. C'est une plante de la famille des apiacées

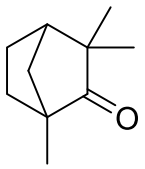
(ombellifères), qui s'est naturalisée à travers le monde. Il existe deux espèces de fenouils : *vulgare* et *piperitum*. La plus cultivée est la famille des *vulgare*.

1.5.2 Composition chimique et intérêt

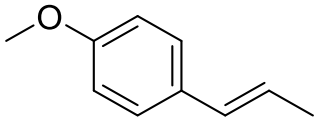
Le fenouil contient des essences aromatiques très utilisées en cuisine, notamment grâce à ses composés actifs comme l'anéthol et ses polymères ou encore dans les industries des parfums, cosmétiques et en phytothérapie (Salama et al., 2015). Il contient également des vitamines comme la vitamine C, B1, B2 ou encore B3. Parmi ces classes de composés il a été reporté que le fenouil contient également des composés du type phénolique. Dans ces composés nous retrouvons des acides phénoliques comme les acides caffeoylquinique (Rather et al., 2012). Des composés polyphénoliques ont pu être identifiés comme l'acide rosmarinique ou encore des flavonoïdes du type rutinoside (Faudale et al., 2008), quercétine ou kaempférol (Parejo et al., 2004). Ce sont ces molécules qui donnent en partie au fenouil ses propriétés anti-inflammatoires (Kim et al., 2011).

La littérature mentionne la présence de flavonoïdes glycosylés chez le fenouil tels que la quercétine-3-glucuronide, le kaempférol-3-glucuronide, la rutine, ou encore kaempférol-3-rutinoside (Rather et al., 2012) (Badgujar et al., 2014). La présence des acides dicaféylquiniques sont également mentionnés par Parejo et al. (2004).

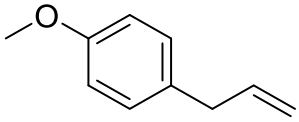
L'huile essentielle du fenouil est en majorité constituée de monoterpènes oxygénés : trans-anéthol, fenchone, d'estragole et d'un monoterpène majeur le limonène.



Fenchone



Trans-anéthole



Estragole

La littérature a révélé que le trans-anéthole, le fenchone, l'estragole et le limonène sont les principaux composants des huiles essentielles de graines de fenouil. Parfois on trouve des variations de la composition chimique des huiles essentielles de fenouil venant de pays différents, ce qui peut s'expliquer par la diversité des climats, du stade de maturité ainsi que du métabolisme d'adaptation des plantes. (Roby et al., 2013).

1.6 Scrofulaire noueuse (*Scrophularia nodosa*)

1.6.1 Présentation générale



Figure 6 : parties aériennes de la scrofulaire noueuse (Scrofularia nodosa). (www.viaurnature.e-monsite.com)

La scrofulaire noueuse, dénommée scientifiquement *Scrophularia nodosa*, est un végétal résistant herbacé de quelques centimètres de la famille des scrofulariacées, qui se trouve naturellement en Europe, en Asie ainsi qu'en Amérique du Nord. Elle pousse dans des endroits humides. La scrofulaire présente près de 120 espèces différentes.

1.6.2 Composition chimique et intérêt

Traditionnellement elle est utilisée pour traiter l'eczéma, les ulcères ou encore les douleurs articulaires. Dans la médecine moderne la scrofulaire peut être utilisée contre les éruptions cutanées ou encore comme agent laxatif et diurétique.

Les composés principaux que nous pouvons retrouver sont les polyphénols parmi eux il y a la famille des flavonoïdes, les glycosides iridoïdes, et les acides phénoliques. Quelques-uns de ces composés ont des effets thérapeutiques intéressants : une activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, antivirale, neuroprotecteur (Crisan et al., 2010).

L'acide caféique qui se trouve dans plusieurs plantes est un précurseur de la biosynthèse de la lignine (Boerjan et al., 2003). Il présente des propriétés hypoglycémiantes et présente une forte activité antioxydante (Jung et al., 2006). Son effet inhibiteur de la prolifération des cellules cancéreuses par un mécanisme oxydatif a également été démontré (Rajendra Prasad et al., 2011). Il a été montré chez d'autres espèces de Scrofulaire (*Scrophularia frutenscens* et *Scrophularia sambucifolia*) que les acides phénoliques présentent une activité antimicrobienne (Fernández et al., 1996). La quercitrin (quercétine-O-rhamnoside), l'isoquercétine (quercétine-O-glucoside) et la rutine présentent des propriétés antioxydantes (Metodiewa et al., 1997). De ces trois flavonoïdes, c'est la rutine qui a l'activité antioxydante la plus puissante *in vivo* (Yang et al., 2008), ses propriétés anticancéreuses (Deschner et al., 1993)(Lin et al., 2009) et anti-inflammatoires(Guardia et al., 2001) ont également été démontrées.

1.7 Rosier des chiens (*Rosa canina L.*)

1.7.1 Présentation générale



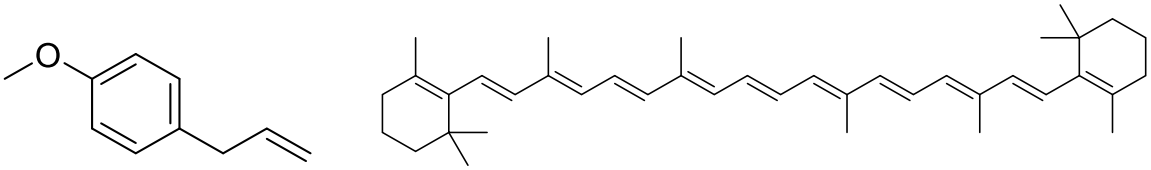
Figure 7 : fruits du rosier des chiens (Rosa canina L.). (www.desfleursanotreporte.com)

Le rosier des chiens, ou églantier des chiens (*Rosa canina L.*) est une espèce d'arbrisseaux épineux de la famille des rosacées pouvant atteindre trois mètres de hauteur, très commun dans les endroits tempérés, comme en Europe, de la Méditerranée à la Scandinavie. C'est une espèce de rosier botanique présentant plusieurs écotypes. Les fruits, cynorhodons, aussi appelés églantines, sont petits et de forme allongée. Ils sont rouges à maturité, vers le mois d'octobre, Ils ont de 1,5 à 2 cm de long. Ils sont en fait issus de la transformation du réservoir floral (faux fruit), qui contient les vrais fruits (akènes résultant de la transformation des carpelles).

1.7.2 Composition chimique et intérêt

L'églantine est utilisée en parfumerie pour ses notes délicates. Historiquement, ses fruits sont connus pour leurs propriétés thérapeutiques antifatigues. Les Romains en leur temps épiçaient le vin et les desserts après macération des feuilles. En Chine, les bourgeons sont également utilisés en tant que légumes et servent aussi à aromatiser le thé. Chrubasik et al., (2008) ont montré des résultats intéressants sur les propriétés anti-inflammatoires et antalgiques du cynorhodon pour lutter contre l'arthrose. Des résultats similaires ont été prouvés par des chercheurs allemands utilisant le cynorhodon comme traitement supplémentaire en cas de rhumatisme inflammatoire (Schimidt, 2014). Ceci a été encore démontré dans un essai clinique réalisé sur des patients soignés avec de la *Rosa canina* du Danemark comme thérapie de complément naturel ou avec une substance inactive, et les médecins ont observé une amélioration de la santé des individus qui ont subi ce traitement.

Czyzowska et al., (2015) décrivent aussi les composés antioxydants présents dans les feuilles de *Rosa canina*. Ces propriétés sont attribuées principalement à la vitamine C et aux polyphénols. Les caroténoïdes sont également largement présents dans les fruits, notamment le β-carotène, le lycopène et le β-rubixanthine (Hodisan et al., 1997).



Lycopène *β-carotène*

Ces composés sont antioxydants (Paiva and Russell, 1999) et leurs effets bénéfiques pour la santé ont été démontrés, en diminuant le risque de cancer et de maladies oculaires (Johnson, 2002). L'extraction des caroténoïdes se fait à l'aide de l'hexane ou du cyclohexane (Lucini et al., 2012).

1.8 Lierre (*Hedera helix L.*)

1.8.1 Présentation générale



Figure 8 : parties aériennes du lierre (Hedera helix L.). (www.mag.plantes-et-jardins.com)

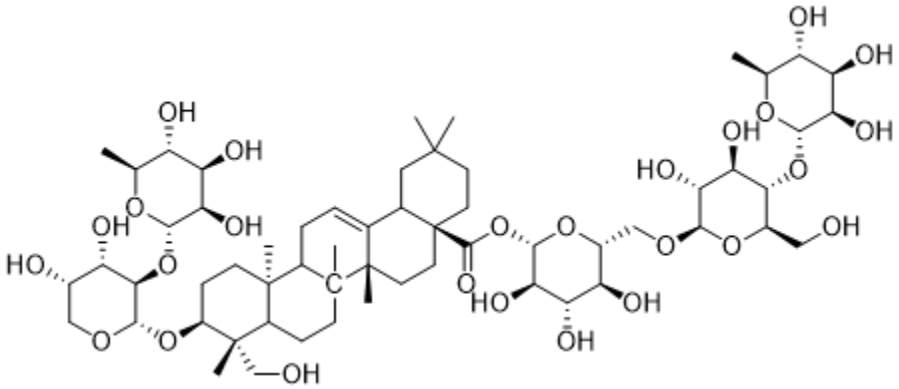
Le lierre (*Hedera helix L.*), est une espèce arbustive à feuilles persistantes, grimpant sur les arbres et les bâtiments. Il est de la famille des *Araliaceae,* cette espèce est présente en zone tempérée de l'Europe et de la méditerrané. Les feuilles du lierre sont à limbe assez dur, vert foncé ou légèrement blanchi sur les contours des pétales.

1.8.2 Composition chimique et intérêt

Traditionnellement, la plante est utilisée pour traiter des toux grasses notamment après ou pendant un refroidissement. C'est une alternative naturelle intéressante, car cette plante rend plus liquides les sécrétions et calme les crampes grâce à son effet spasmolytique. Les extraits de feuilles du lierre sont utilisés dans des industries pharmaceutiques. On peut citer par exemple le médicament suisse Prospan® produit à partir d'extraits éthanoliques de feuilles de lierre.

Différentes familles de composés se retrouvent chez le lierre. On peut citer les acides phénoliques comme le caféique, le chlorogénique et le dicaféylquinique (Wichtl, 2004) mais également des flavonoïdes sous forme d'hétérosides exemple isoquercétine, rutine,

kaempférol-glucoside, kaempférol-rutinoside (Trute and Nahrstedt, 1997). Toutefois, ce sont les triterpènes saponins les composés actifs majeurs de cette plante. Parmi eux : la hédéragenine, la hédéracoside C et l'α-hédérine ont été isolés chez *Hedera helix*. Les feuilles séchées de *Hedera helix* contiennent 21.83mg/g de hédéracoside C, 0.41mg/g de alpha-hédérine et 0,02 mg/g de hédéragenine (Gaillard et al., 2003).



Hédéracoside C

Des activités antispasmodique, antioxydante, antimutagène et anti-tumorale sont prêtées à l'α-hédérine et à l'hédéracoside C (Lutsenko et al., 2010). Une autre étude *in vitro* a montré que l'α-hédérine et la hédérasaponine-C chez *Hedera helix* présentent une forte activité antioxydante comparable à celle de l'α-tocophérol, du butylhydroxyanisole (BHA) et du butylhydroxytoluène (BHT) (Gülçin et al., 2004).

1.9 Piloselle (*Hieracium pilosella*)

1.9.1 Présentation générale



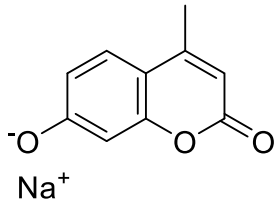
Figure 9 : parties aériennes et fleurs de la piloselle (Hieracium pilosella). (www.luxe.campagne.free.fr)

La Piloselle (*Hieracium pilosella*) qui a plusieurs noms usuels : Épervière piloselle, Oreille de souris, Oreille de rat, Piloselle de rat, Herbe à l'épervier ou Veluette est un végétal d'une taille de 15 à 30 cm, de de la famille des Astéracées. Elle se trouve sur les sols infertiles et pauvres notamment en Europe et en Asie.

1.9.2 Composition chimique et intérêt

Cette plante est connue traditionnellement pour ses effets diurétiques. Parmi les composés actifs décrits dans la littérature chez la piloselle, on retrouve les acides phénoliques notamment l'acide chlorogénique et l'acide caféique. Outre son activité antioxydante, ce dernier présente des activités antibactérienne, antiviral, et anti-cancereuse (Stanojevic et al., 2009). Les dérivés de l'acide chlorogénique, les acides dicaféylquiniques, connus également pour leur propriété antioxydantes sont également présents (Danino et al., 2009; Fraisse et al., 2011).

Dans la famille des coumarines, on retrouve l'ombelliférone aux propriétés antioxydantes démontrées (Singh et al., 2010).



Ombelliférone

Ce composé présente en outre une forte capacité d'absorption des rayons UV, il est ainsi utilisé dans les crèmes solaires (Du et al., 2008).

1.10 Saule blanc (*Salix alba*)

1.10.1Présentation générale



Figure 10 : écorce de saule blanc (Salix alba). (www. floranjou.fr)

Le saule blanc (*Salix alba*) est un arbre de la famille des salicacées qui peut atteindre 25 m de haut, pouvant vivre une centaine d'années. Il pousse facilement à proximité des ruisseaux et des cours d'eau. Cet arbre se retrouvant dans les régions aux climats tempérés comme l'Europe, l'Amérique du Nord, l'Afrique du Nord, Asie, etc. *Salix alba* est un arbuste à feuilles caduques, l'écorce peu atteindre plusieurs centimètres de diamètre, et petites fleurs en chatons, mâles et femelles habituellement sur des plantes séparées.

1.10.2 Composition chimique et intérêt

Depuis longtemps, l'écorce du saule blanc est étudiée à cause de la présence des composés actifs comme les catéchines, les flavonoïdes et des glycosides phénoliques (Kompantsev et al., 1974).

Dans l'écorce du saule blanc, le principal composé actif décrit dans la littérature est la salicine, un β-glucoside alcoolique. Ce composé est connu pour ses activités antalgiques et anti-inflammatoires (Blazics et al., 2010). Cette molécule est très proche au niveau de sa structure de l'acide acétylsalicylique (aspirine). Contrairement aux feuilles et aux fleurs, l'écorce contient très peu de flavonoïdes. Les scientifiques connaissaient bien les effets antidouleur du saule, plante utilisée particulièrement en médecine traditionnelle. Ils ont ensuite développé un nouveau traitement contre la douleur en partant des propriétés de l'acide salicylique. L'écorce de saule est présente dans des études européennes comme constituant de nombreux médicaments, compléments alimentaires et remèdes pour la perte de poids. Des études cliniques ont montré que les médicaments obtenus à partir de l'écorce de saule sont mieux tolérés par les patients que des dérivés synthétiques (Schmid et al., 2001).

1.11 Basilic (*Ocimum basilicum L.*)

1.11.1 Présentation générale



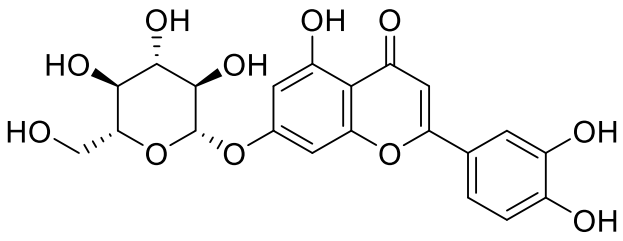
Figure 11 : feuilles du basilic (Ocimum basilicum L.). (www.1jardin2plantes.info)

Le basilic est le nom commun pour l'herbe culinaire *Ocimum basilicum* L. de la famille des Lamiacées, parfois connu sous le nom Saint-Joseph dans certains pays anglophones. C'est une plante herbacée annuelle largement cultivée à des fins culinaires dans les régions tropicales et les régions tempérées du monde, notamment en Asie, en Afrique. Le basilic est une plante à ramifications de 15 cm à 1,3 m de hauteur, avec des feuilles vert clair soyeuses. Ses feuilles de formes ovales, mesurent 3 à 11 cm de long et 1 à 6 cm de large.

1.11.2 Composition chimique et intérêt

Ocimum basilicum L. est une plante médicinale bien connue dans les préparations de la médecine traditionnelle chinoise. Les variétés de basilic ont un parfum différent car la plante contient des huiles essentielles dont les proportions varient pour les différentes variétés. La forte odeur de basilic est dérivée de l'eugénol. Le parfum d'agrumes de basilic vient de leur partie supérieure notamment les feuilles. Le basilic bleu africain a une forte odeur de camphre parce qu'elle contient du camphre en proportion plus élevée. Le basilic contient de l'anéthol, le même produit chimique qui lui donne une odeur de réglisse.

Les activités biologiques citées dans la littérature pour les feuilles de basilic sont principalement des propriétés antioxydantes (Vlase et al., 2014), anticancéreuses (Taie et al., 2010) et antidiabétiques (Vats et al., 2002). Des études scientifiques *in vitro* ont établi que les composés de l'huile essentiel de basilic ont une puissante activité antioxydante, antivirale, des propriétés antimicrobiennes, et une utilisation potentielle dans le traitement du cancer (Chiang et al., 2005). Parmi les composés d'intérêt présents dans les feuilles de basilic, la littérature mentionne plusieurs acides phénoliques (acides rosmarinique, chlorogénique, caféique, férulique, chicorique et caftarique) et flavonoïdes (rutine, isoquercétine, apigénine-glucoside, lutéoline-glucoside) (Lee and Scagel, 2009).



Lutéoline-glucoside

Parmi les huiles essentielles, le linalol est le constituant majeur. D'autres constituants ont été identifiés : le géraniol, le *p*-allylanisole, le 1,8-cinéole, le bergamotène et l'acétate de néryle (Hussain et al., 2008).

1.12 Reine-des-prés (*Filipendula ulmaria*)

1.12.1 Présentation générale



Figure 12 : fleurs de la reine-des-prés (Filipendula ulmaria). (www.topsante.com)

La reine-des-prés (*Filipendula ulmaria*) fait partie de la famille des Rosacées d'une taille de 1 à 2 m. C'est une plante mellifère annuelle originaire d'Europe, largement cultivée dans la méditerranée mais aussi en Asie en tant qu'herbe médicinale. Les fleurs sont de multiples fausses ombelles ramifiées, très odorantes, d'un blanc jaunâtre. Elle est utilisée en tant qu'épaississant dans les crèmes et les desserts (Dume and Rameau, 1989).

1.12.2 Composition chimique et intérêt

Les activités biologiques décrites pour les fleurs de la reine-des-prés sont principalement l'activité antioxydante (Sroka et al., 2001), analgésique, anti-inflammatoire (Lamaison et al., 1990), anti-bactérial (Rauha et al., 2000), anti-cancer (Calliste et al., 2001) et hyper-glycémique (Swanston-Flatt et al., 1989) .

Parmi les composés d'intérêt, la rutine, l'hypéroside, le kaempférol-glucoside, plusieurs acides phénoliques (caféique, chlorogénique, salicylique, gallique, vanillique, rosmarinique) ainsi que la salicyline sont décrits (Sroka et al., 2001) (Poukens-Renwart et al., 1992).

La littérature montre que l'essentiel des molécules d'intérêt spécifiques se retrouvent dans les fleurs de la reine-des-prés avec notamment des composés phénoliques (tannins, spiraeoside, hypéroside, et avicularinue) (Stenberg et al., 2006) et l'héparine (Kudriashov et al., 1991).

1.13 Thé vert (*Camellia sinensis* L.)

1.13.1 Présentation générale



Figure 13 : feuilles de thé vert (Camellia sinensis L.). (www.aceva.com)

Le thé vert (*Camellia sinensis* L.) est originaire de Chine, mais sa production est répandue dans de nombreux pays d'Asie. Plusieurs variétés de thé vert existent, qui diffèrent considérablement en raison de conditions de croissance, d'horticulture, de la production, et du temps de récolte des feuilles. Le thé est la plante la plus consommée dans le monde.

1.13.2 Composition chimique et intérêt

Le thé vert est chargé d'antioxydants et de nutriments ayant des effets puissants sur le corps. Plusieurs études ont montré que l'extrait de thé vert possède des propriétés antioxydantes, antibactériennes, et des fonctions antivirales, anti-carcinogènes et antimutagenes (Higdon and Frei, 2003). Des rapports épidémiologiques indiquent que le pourcentage de maladies cardiovasculaires diminuerait avec la consommation de thé vert. De plus, des études statistiques ont montré que la consommation d'une tasse de thé par jour diminue de 5% le risque de décès d'origine cardiovasculaire (Tang et al., 2015). Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes ; des composés fortement présents dans le thé vert, ont été démontré par (Davis et al., 2009). En outre, ces composés ont des propriétés anti-inflammatoires, vasodilatateurs, anti-thrombotique, antiathérogène, antipyrétiques et des propriétés analgésiques. Cela comprend l'amélioration de la fonction cérébrale, la perte de graisse, un risque plus faible de cancer (Boehm et al., 2009). La consommation de thé vert peut être associée à un risque réduit d'AVC (Accident Vasculaire Cérébral) et à la légère réduction de la pression systolique et diastolique (Larsson, 2014). D'autres analyses portant sur les effets de la consommation du thé vert à long terme sur la pression artérielle, ont abouti à des conclusions similaires (Liu et al., 2014).

Le thé vert contient une variété d'enzymes, des acides aminés, des glucides, des lipides, des stérols, des composés apparentés, oligo-éléments et composés phytochimiques tels que les polyphénols, les flavan-3-ols, et de la caféine. Les polyphénols du thé vert incluent, mais

ne sont pas limités à l'épigallocatéchine gallate (EGCG), l'épigallocatéchine (EGC), l'épicatéchine gallate (ECG) et d'épicatéchine (EC) ; des flavanols tels que le kaempférol, la quercitrine, et myricétine sont également trouvés dans le thé vert mais en quantité très limités (Khan and Mukhtar, 2013). Les parties de cette plante utilisées dans notre étude sont les feuilles du thé vert.

Chapitre II : Métabolisme secondaire

Dans le métabolisme de la plante, on différencie les métabolites primaires des métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont directement impliqués dans la croissance, le développement, la reproduction et l'assimilation des nutriments de la plante. Les métabolites secondaires, quant à eux, jouent plusieurs rôles comme servir de défense pour la plante ou attirer certaines espèces polinisatrices. Ils permettent également la communication de plantes à plantes (Kang et al., 2010).

1 Métabolites primaires

Un métabolite primaire est présent dans de nombreux organismes. Il est également considéré comme un métabolite central, qui remplit une fonction encore plus restreinte (présent dans une cellule ou un organisme en croissance de manière autonome). Les principaux métabolites primaires sont les lipides, les sucres et les peptides.

1.1 Lipides

Les lipides sont définis par leurs propriétés de solubilité particulières et sont extractibles avec de l'éther à partir de tissus de plantes. Les formules générales pour les trois principales classes de lipides de la plante sont les triglycérides, les phospholipides et les glycolipides. La variation structurelle au sein de chaque classe est due aux différents résidus d'acides gras qui peuvent être présents. Les phospholipides sont complexes dans la structure ; tous contiennent non seulement un groupement phosphate, et également substitué par au moins une base. Ce résidu de base peut être la choline, l'éthanolamine ou la sérine. Les phosphates d'inositol sont des lipides reconnus pour participer dans les voies de signalisation de la plante (Munnik and Vermeer, 2010). Les vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, E et K sont des lipides.

1.2 Sucres

Les sucres occupent une position centrale dans le métabolisme de la plante de telle sorte que des méthodes pour leur détection sont très importantes pour la phytochimie. Les sucres sont avantageusement classés en trois groupes sur la base de la taille moléculaire ; les monosaccharides simples (glucose, fructose) et leurs dérivés, les oligosaccharides qui sont une condensation de deux ou plusieurs monosaccharides (sucrose), et les polysaccharides qui sont de longues chaines de monosaccharides.

Les sucres se trouvent dans les tissus de la plupart des plantes. Durant la photosynthèse, les plantes produisent du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), un sucre qui est utilisé par la cellule pour synthétiser des monosaccharides tel que le glucose ($C_6H_{12}O_6$). Les monosaccharides comme le glucose peuvent être convertis en polysaccharides tels que la cellulose et la pectine pour la construction de la paroi cellulaire. Les sucres dans la plupart de temps sont utilisés comme source d'énergie. Les polysaccharides sont souvent associés aux flavonoïdes.

1.3 Peptides

Les protéines sont produites dans toute la plante dans tous les types de tissus. Même un organe tel que la feuille peut contenir plusieurs milliers de protéines, principalement de nature enzymatique. Le problème de la séparation et l'isolement d'une protéine particulière peut donc être fastidieux (Boulter and Parthier, 1982). Les protéines sont fabriquées à partir de 20 acides aminés, mais les plantes produisent d'autres acides aminés impliqués dans les voies de signalisation. Certains acides aminés sont utilisés comme moyens de défense contre les herbivores dans les plantes. Par exemple, la canavanine est analogue à l'arginine (Turner and Harborne, 1967). Cet acide aminé protège les plantes contre les prédateurs tels que les insectes et peut causer des maladies chez les êtres humains si certains types de légumineuses sont consommés sans transformation de cette protéine (Rosenthal, 2001).

2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas directement impliqués dans le processus de croissance et de développement, mais remplissent d'autres fonctions toutes aussi importantes pour la plante. On distingue classiquement trois grandes catégories de

métabolites secondaires chez les végétaux (Harborne, 1983) :

- Les composés azotés : alcaloïdes, bétalaïnes, acides aminés non protéinogènes
- Les composés phénoliques : polyphénols, flavonoïdes, stilbènes
- Les terpénoïdes contenues dans les huiles essentielles.

2.1 Alcaloïdes

Les alcaloïdes, dont 5500 sont connus, comprennent la plus grande classe unique de substances végétales secondaires. Les alcaloïdes sont un groupe de composés chimiques d'origine naturelle contenant au minimum un atome d'azote, habituellement en combinaison comme faisant partie d'un système cyclique. Les alcaloïdes sont produits par une grande variété d'organismes, y compris les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Ils peuvent être purifiés à partir d'extraits bruts de ces organismes par extraction acido-basique. Les alcaloïdes possèdent un large éventail d'activités pharmacologiques parmi lesquelles : antipaludique, antiasthmatique, anticancéreux (Kittakoop et al., 2013) cholinomimétique (Russo et al., 2013) vasodilatateur, anti-arythmique, analgésique (2010) antibactérien (Cushnie et al., 2014) et anti-hyperglycémiques (QIU et al., 2014). Certains alcaloïdes trouvent leur usage dans la médecine traditionnelle ou moderne, ou servent de précurseurs pour l'élaboration de médicaments. D'autres alcaloïdes possèdent des activités très connues stimulantes, comme la cocaïne, la caféine, la nicotine. Certains sont utilisés en tant que drogues récréatives. Les alcaloïdes agissent sur plusieurs systèmes métaboliques chez l'homme et les animaux.

2.2 Polyphénols

Les polyphénols sont des composés organiques ayant la caractéristique d'avoir un groupement aromatique porteur de plusieurs fonctions hydroxyles. Les substances phénoliques ont tendance à être solubles dans l'eau, ils sont le plus souvent combinés avec des sucres et ils sont généralement situés dans la vacuole des cellules végétales (Harborne, 1967). Ils jouent un rôle d'antioxydants naturels qui leurs confèrent un intérêt médicinal pour le traitement de certaines maladies telles que, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et certains cancers (Dufresne and Farnworth, 2001). Parmi les classes de polyphénols, on compte principalement les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes

et les tannins.

2.2.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés qui ont des propriétés antioxydantes. Ils sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (acide caféique, acide gallique), les plantes produisent de l'acide benzoïque en modifiant la structure chimique de l'acide cinnamique de la même manière de nombreux organismes décomposent les acides gras. De même, les groupements hydroxyles supplémentaires de l'acide cinnamique permettent d'obtenir les structures de l'acide coumarique, caféique, chlorogénique et férulique (figure 14).

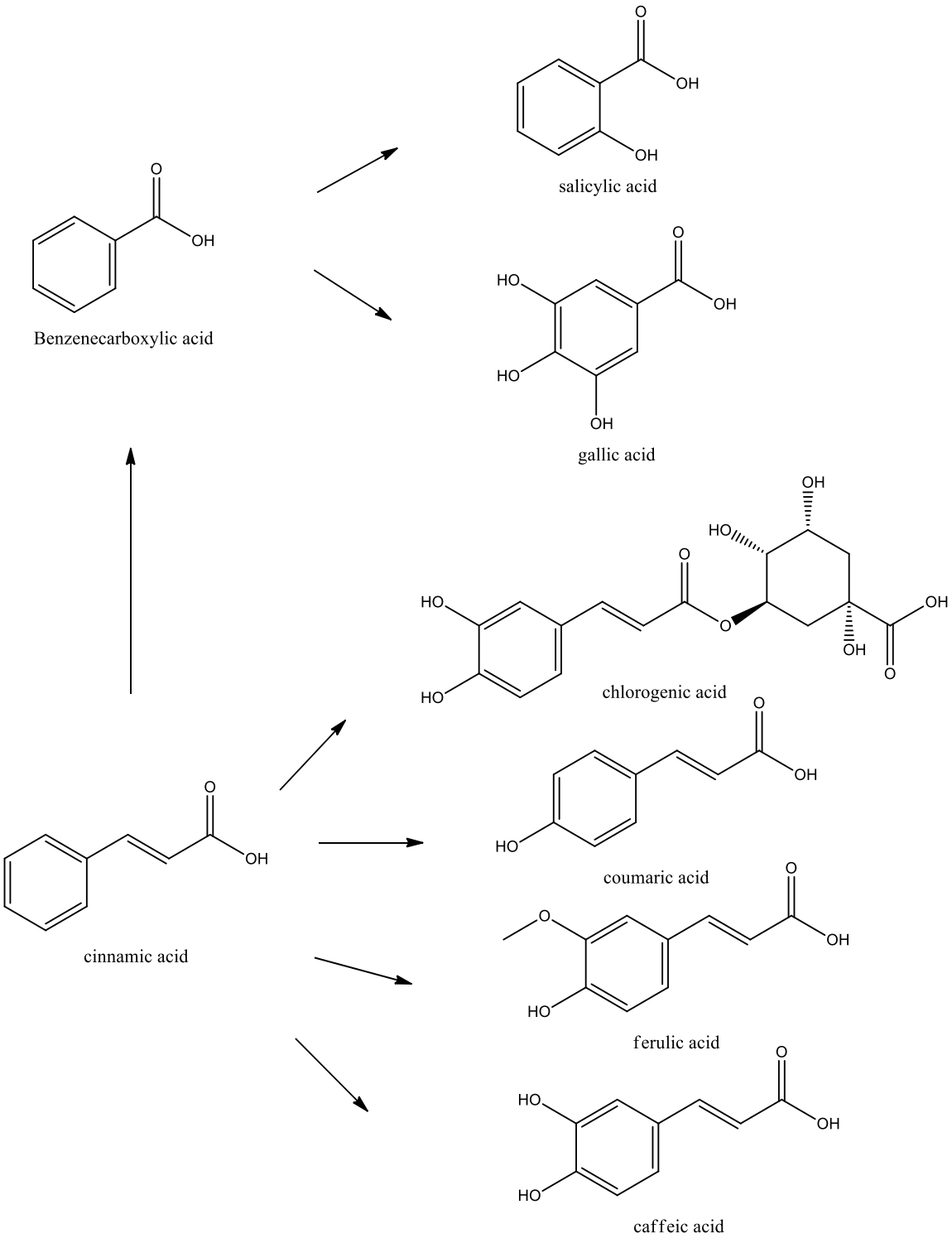


Figure 14 : schéma de différentes voies métaboliques pour obtenir les acides phénoliques.

L'hydrolyse alcoolique du tissu végétal libère un certain nombre d'acides phénoliques hydrosolubles par exemple l'acide gentisique très répandu ou l'acide salicylique et l'acide *o*-protocatéchique qui le sont un peu moins. Ces acides peuvent être associés à des glycosides ou d'autres métabolites primaires. Parmi les activateurs de la floraison, on trouve les acides

p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et syringique. A l'inverse, l'acide gallique, est rapporté comme un inhibiteur naturel de la floraison en particulier dans des feuilles de Kalanchoe (Dickens and Staden, 1990).

2.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles benzéniques porteurs d'une fonction hydroxyle, reliés par une chaîne linéaire à 3C, avec un squelette carboné C6 - C3 - C6. Ils portent un noyau benzénique en position 2. Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo-γ-pyrone (figure 15).

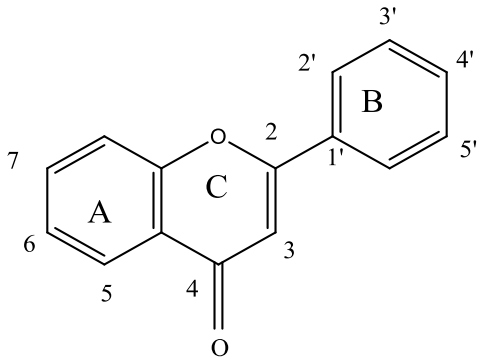


Figure 15 : structure générale des flavonoïdes. La numérotation des carbones vise à expliquer la dénomination de la structure C6-C3-C6

Les flavonoïdes sont largement distribués dans les plantes sous forme de 9 classes principales ; les flavones, les flavonols, les flavonones, les flavononols, les flavanols, les anthocyanidines, les isoflavones, les neoflavone et les chalcones. Toutefois, certaines classes sont plus majoritairement distribuées telles que les flavanols, les flavones et les chalcones tandis que les isoflavones et les autres classes sont minoritaires (Harborne, 1967) (figure 16).

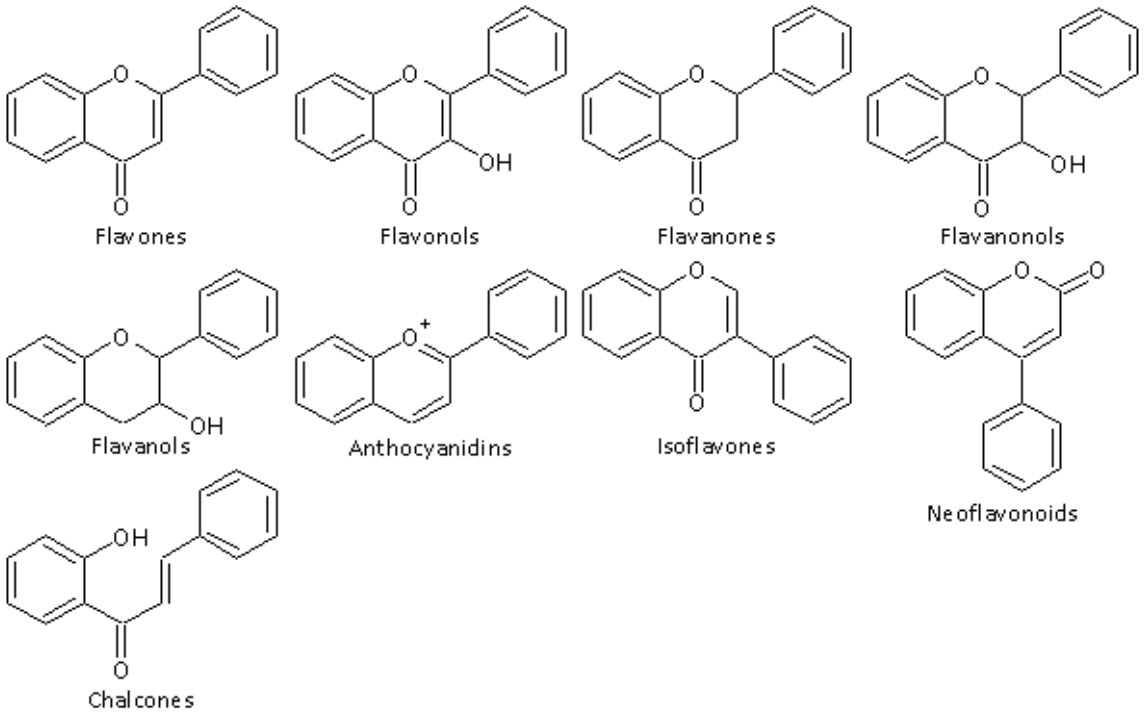


Figure 16 : les sous classes des flavonoïdes.

La biosynthèse des flavonoïdes se fait par la voie des phénylpropanoïdes qui passe par l'action de la malonyl-CoA sur la coumaryl-CoA, issue du métabolisme des sucres (figure 17). La première étape enzymatique est catalysée par la chalcone synthase (CHS), qui aboutit à la formation de la chalcone. Pour la majorité des plantes, la chalcone ne s'accumule pas, elle est métabolisée, en flavonoïde (les flavanones, les dihydroflavonols et les anthocyanes). D'autres classes de flavonoïdes telles que les flavones, les isoflavones, les pro-anthocyanidines et les flavonols sont issues de voies latérales de biosynthèse dont les précurseurs sont les intermédiaires de formation des anthocyanes (Schijlen et al., 2004).

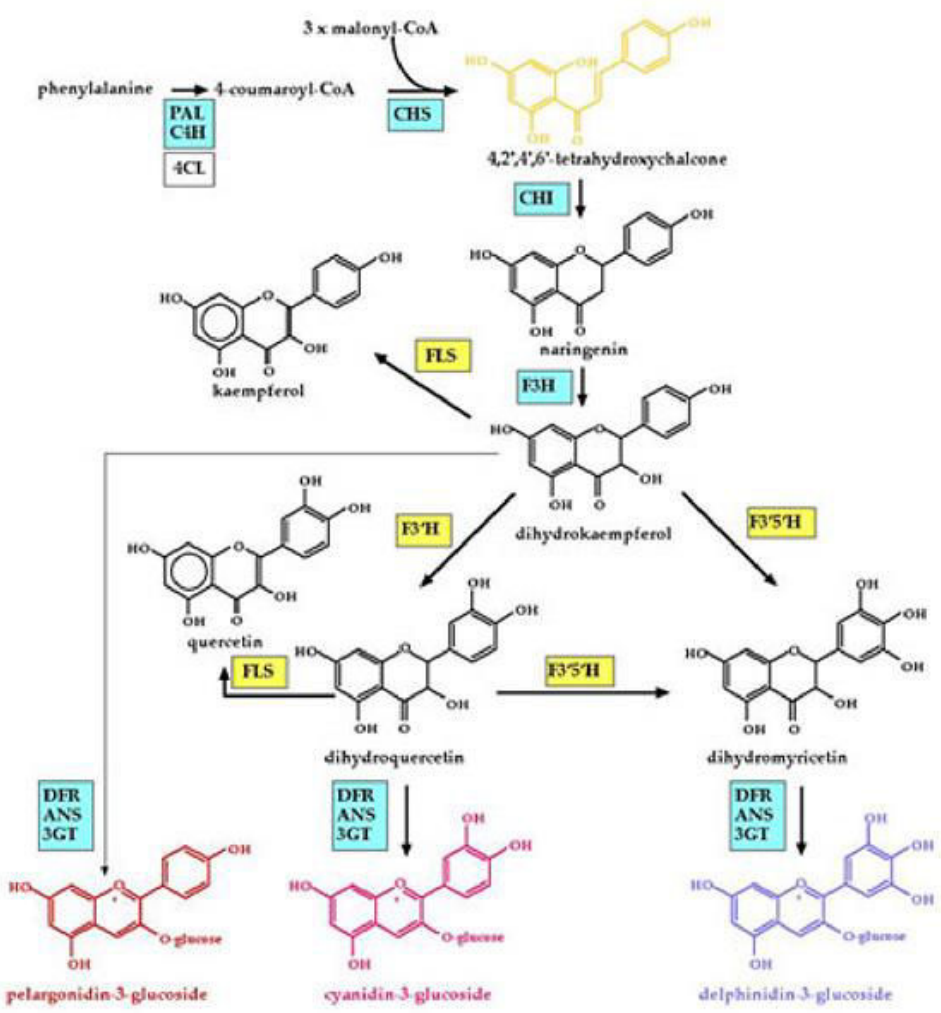


Figure 17 : biosynthèse des flavonoïdes par voie des phénylpropanoïdes. (www.meristemi.wordpress.com)

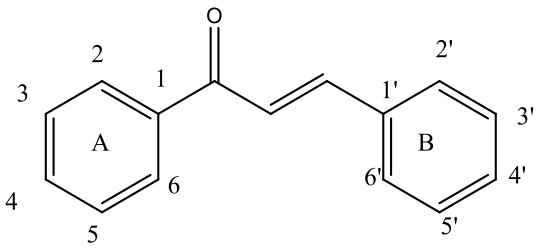
Parmi les flavonoïdes les plus fréquents dans les plantes, on retrouve plusieurs flavonols dont le kaempférol, la quercétine et la myricétine. Ces molécules sont fréquemment substituées par des sucres. Pour les monoglycosides, l'association avec le sucre se fait le plus souvent sur le carbone 3. La catéchine et l'épicatéchine sont des stéréo-isomères, de même pour la gallocatéchine et l'épigallocatéchine qui sont classés parmi les flavan3-ols.

Les flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes qui réduisent les radicaux peroxydes en désactivant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme les ions superoxyde ou encore les radicaux OH•.

Les flavonoïdes peuvent aussi jouer le rôle de pigments pour la coloration des fleurs afin d'attirer les animaux pollinisateurs. Chez les plantes supérieures, les flavonoïdes sont impliqués dans la filtration UV, la fixation symbiotique de l'azote. Ils peuvent également agir en tant que messagers chimiques, des régulateurs physiologiques et d'inhibiteurs du cycle cellulaire. Les flavonoïdes par exemples sécrétées par la racine de leur plante hôte aident les rhizobiums dans le stade de l'infection à se défendre. Les flavonoïdes peuvent être séparés par des techniques chromatographiques et des composants individuels identifiés par comparaison chromatographique et spectrale avec des marqueurs connus (Harborne, 1983).

2.2.2.1 Chalcones

La Chalcone est une cétone aromatique ayant comme structure de base des flavonoïdes et une énone. Elle constitue le noyau central d'une variété de composés biologiques importants, qui sont connus collectivement sous le nom chalcones ou chalconoides. Elles sont montrées sous forme de deux cycles benzéniques A et B liés entre eux par une chaîne à trois carbones, cétonique α, β- insaturé. Ces composés sont rarement substitués sur le cycle B. De manière équivalente aux autres flavonoïdes, les positions 2, 4 et 6 du cycle A peuvent être hydroxylées ou méthoxylées (figure18).



1,3-Diphenyl-2-propen-1-one

Figure 18 : structure générale d'un chalcone

La chalcone est naturellement synthétisée par de nombreux végétaux par la voie métabolique des phénylpropanoïdes. La phénylalanine est d'abord modifiée en acide cinnamique, qui est transformé en acide paracoumarique qui forme alors un thioester avec le coenzyme A, le 4-coumaroyl-CoA (PCM and D, 2005). Le thioester réagit après avec 3 molécules de malonylcoenzyme A qui finissent par se cycliser et former un second groupe phényle, formant ainsi le 4',2,4,6-tetrahydroxychalcone (Tanaka et al., 1998). Les Chalcones et leurs dérivés

montrent un large éventail d'activités biologiques, tels que des anti-diabétiques, anti-néoplasique, anti-hypertenseurs, anti-rétroviraux, anti-inflammatoires, anti-parasitaires, anti-histaminique, anti-paludéens, anti-oxydant, anti-fongique, les anxiolytiques, antispasmodique, anti-nociceptives, hypolipémiants, anti-filariose, anti-angiogénique, anti-protozoaires, anti- bactérien, anti-stéroïdien (Mahapatra et al., 2015a, 2015b, 2015c).

2.2.2.2 Anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C (figure 15).

Les anthocyanidines (aglycones anthocyanes formées lorsque les anthocyanes sont hydrolysées avec de l'acide) sont responsables aussi de la couleur naturelle de la plante. Ces molécules sont constituées d'un aglycone anthocyanidine et d'un glucose en position 2' (Figure 19). L'aglycone est chargé positivement et la charge portée peut être délocalisée par effet mésomère sur la majeure partie du squelette flavonoïde. Parmi les anthocyanidines qui sont très connus il y a la malvidine, la delphinidine, la pétunidine et la cyanidine. La coloration attribuée aux végétaux dépend de plusieurs éléments, particulièrement le pH et de la nature des substitutions de l'aglycone. En plus de la pigmentation, ces composés sont accumulés dans des différents organes des plantes afin de les protéger contre les attaques de nuisibles.

Anthocyanidine	**R1**	**R2**
Cyanidine	OH	H
Delphinidine	OH	OH
Paeonidine	OCH_3	H
Pétunidine	OCH_3	OH
Malvidine	OCH_3	OCH_3

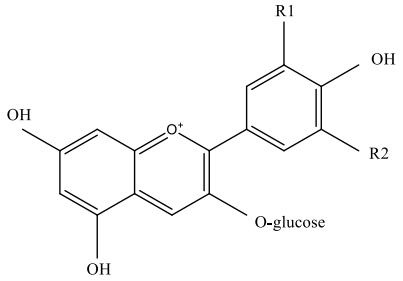


Figure 19 : structure générale des principales anthocyanidines

Les anthocyanes les plus connues sont la pélargonidine responsable de la coloration rouge ou orange dans certaines plantes. Il y a encore la cyanidine qui donne une couleur rouge ou rose et ensuite la delphinidine responsable de la coloration mauve. Elle aussi donne spécialement la coloration rouge aux fruits et aux feuilles en automne.

2.2.2.3 Tannins

Chimiquement, les tannins sont des polyhydroxyphénols. Les tannins sont répartis en quatre groupes suivant leurs structures chimiques : les gallotannins, les ellagitannins, les tannins complexes, et les tannins condensés. Les gallotannins sont des tannins formés d'unités d'acides galliques liées à diverses unités polyol-, flavanol- ou triterpénoïdes. Les ellagitannins sont des tannins formés d'au moins deux unités d'acides galliques C-C couplées entre elles et sans liaison glycosidique avec des unités flavanols (catéchines). Les tannins complexes sont des tannins formés par une unité gallotanin ou ellagitannin comportant une liaison glycosidique. Les tannins condensés sont des proanthocyanidols comportant des liaisons entre le C-4 d'une unité flavanol et un C-8 (ou C-6) d'une autre flavanol monomère. Ils sont bénéfiques pour la santé en raison de leur activité antimutagène et anticancéreux (Chung et al., 1998), antibactériens (Chung et al., 1993). Ils jouent un rôle dans la protection contre la prédation, et peut-être aussi que les pesticides, et dans la régulation de la croissance des plantes (Jr and Ferrell, 2006).

Les proanthocyanidines sont des polymères de flavanols qui peuvent être reconnues par le fait que lorsqu'ils sont chauffés par en milieu acide, les feuilles qui les contiennent deviennent rouges.

2.2.2.4 Stilbènes

Les stilbènes sont des composés organiques classés comme diaryléthène porteurs de groupements hydroxyles, ils disposent d'une double liaison centrale éthylène substitué par des groupes phényle sur chacun des atomes de carbone de la double liaison. Le nom est dérivé de « *stilbos* » mot grec, qui signifie brillant. Ils ont l'apparence d'un solide blanc qui se dissout dans les solvants organiques. Ces polyphénols naturels sont formés de dérivés hydroxy-, méthoxy- du stilbène simple. Comme la plupart des autres composés phénoliques on peut les trouver sous forme hétérosidique ou polymérique. Ils sont abondants chez les plantes

supérieures, et agissent en réponse à des attaques de pathogènes.

2.3 Terpénoïdes

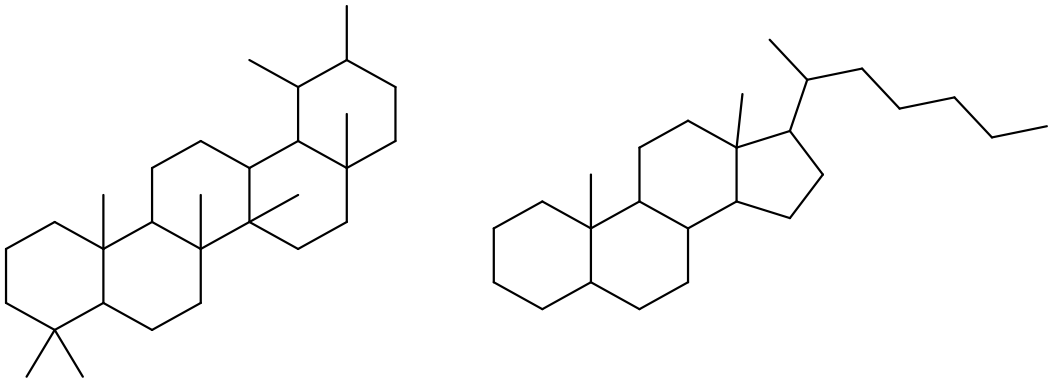
Il existe plus de 22 000 terpènes différents. Les terpènes sont classés suivant le nombre d'unités d'isoprène qu'ils possèdent. Par exemple, les monoterpénoïdes et les triterpénoïdes présentent respectivement deux unités et six unités d'isoprène. La différence entre les terpènes et les terpénoïdes est que les terpènes sont des hydrocarbures, tandis que les terpénoïdes contiennent des groupes fonctionnels supplémentaires. Le plus simple d'entre eux, l'isoprène est un gaz volatil émis en quantité importante par les feuilles lors de la photosynthèse. Ce gaz permet de protéger les membranes cellulaires d'éventuels dommages causés par le stress oxydant (Loreto et al., 2001) ou des hautes températures (Sharkey et al., 2001). Dans les extraits de fenouil (*Foeniculum vulgare L.*) et de camomille (*Matricaria chamomilla L.*), les terpènes montrent une activité antimicrobienne importante (Roby et al., 2013).

2.4 Saponines

Les saponines sont une classe de composés chimiques qui se trouvent chez certaines espèces végétales. Ce sont des groupes glycosides de type tensio-actifs comportant une ou plusieurs fractions glycosidiques hydrophiles combinées à un dérivé triterpène lipophile. Les portions aglycones des saponines sont appelés sapogénines. Le nombre de chaînes de saccharides attachés au noyau sapogénine/aglycone peut varier donnant lieu à une autre dimension de la nomenclature : monodesmosidique, bidesmosidique. Une nomenclature récente classe les saponines selon la longueur de leurs chaînes saccharidiques allant de 1 à 11 (Hostettmann and Marston, 1995). Les numéros 2-5 sont les plus fréquents avec deux saccharides à chaînes linéaires ou ramifiées. Le glucose et le galactose sont parmi les éléments les plus communs de ces chaînes rattachées.

L'aglycone lipophile peut être d'une grande variété de terpènes. Les unités terpèniques composant un squelette C30 de type triterpénique, sont souvent modifiées ultérieurement en squelette stéroïdien (C27) (figure 20). Le sous-ensemble de saponines stéroïdiens sont appelés saraponins. Les dérivés aglycones peuvent également incorporer de l'azote, de sorte que certaines saponines peuvent aussi présenter des caractéristiques pharmacologiques et

chimiques proches de certains alcaloïdes.



a) b)

Figure 20 : a) structure générale triterpénique. b) structure générale stéroïdien.

Chapitre III : Activités biologiques

1 Activité antioxydante

Les antioxydants biologiques ont été définis comme des composés qui protègent les systèmes biologiques contre les effets potentiellement nocifs des processus ou des réactions qui peuvent provoquer une oxydation excessive. Notre corps est riche en antioxydants endogènes et on peut trouver dans la nature les antioxydants exogène (Reiter and Robinson, 1995).

Les réactions biochimiques dans le corps génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des radicaux libres, qui peuvent endommager par oxydation l'ADN et les protéines, entrainant certaines maladies. L'action néfaste des radicaux libres peut être bloquée par des antioxydants qui neutralisent les radicaux libres et éliminent leurs effets dommageables sur les constituants cellulaires.

Pour diminuer l'oxydation dans notre alimentation, des antioxydants synthétiques traditionnels tels que l'hydroxyanisole butylé et l'hydroxytoluène butylé, le gallate de propyle et l'hydroquinone tertiaire de butyle sont utilisés depuis plusieurs décennies. Cependant, ces antioxydants fabriqués sont suspectés de présenter des effets négatifs sur la santé humaine. D'où, un intérêt croissant de trouver des antioxydants naturels tels que ceux contenus dans

des matrices végétales. De nombreuses sources d'antioxydants d'origine végétale ont été étudiées ces dernières années.

Les composés polyphénoliques sont abondant dans la plupart des végétaux. Leurs rôles d'antioxydants naturels leurs confèrent un grand intérêt pour la santé humaine. Dans cette thèse, nous allons étudier les différentes méthodes qui ont été mises au point afin d'évaluer la capacité antioxydante des polyphénols.

Pour cela, deux tests sont présentés : le test ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) et le test DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle). Dans notre étude, nous avons choisi le test DPPH pour évaluer les activités antioxydantes de nos échantillons. En effet, pour des difficultés de solubilisation de nos échantillons dans l'eau, nous n'avons pas retenu le test qui utilise le sel d'ABTS. Le trolox est utilisé comme étalon au lieu de la vitamine C qui est moins stable en présence d'oxygène et de lumière.

1.1 Test ABTS

La figure 21 décrit le mécanisme de cette méthode, elle est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ en solution qui donne une couleur bleu-vert. Ce dernier va être transformé en ABTS cationique, $ABTS^{+}$, une solution incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. L'activité antioxydante totale de l'extrait a été déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{\bullet+}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6- sulfonique) comparativement à un antioxydant de référence. En réagissant avec le persulfate de potassium, l'ABTS forme le radical $ABTS^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange.

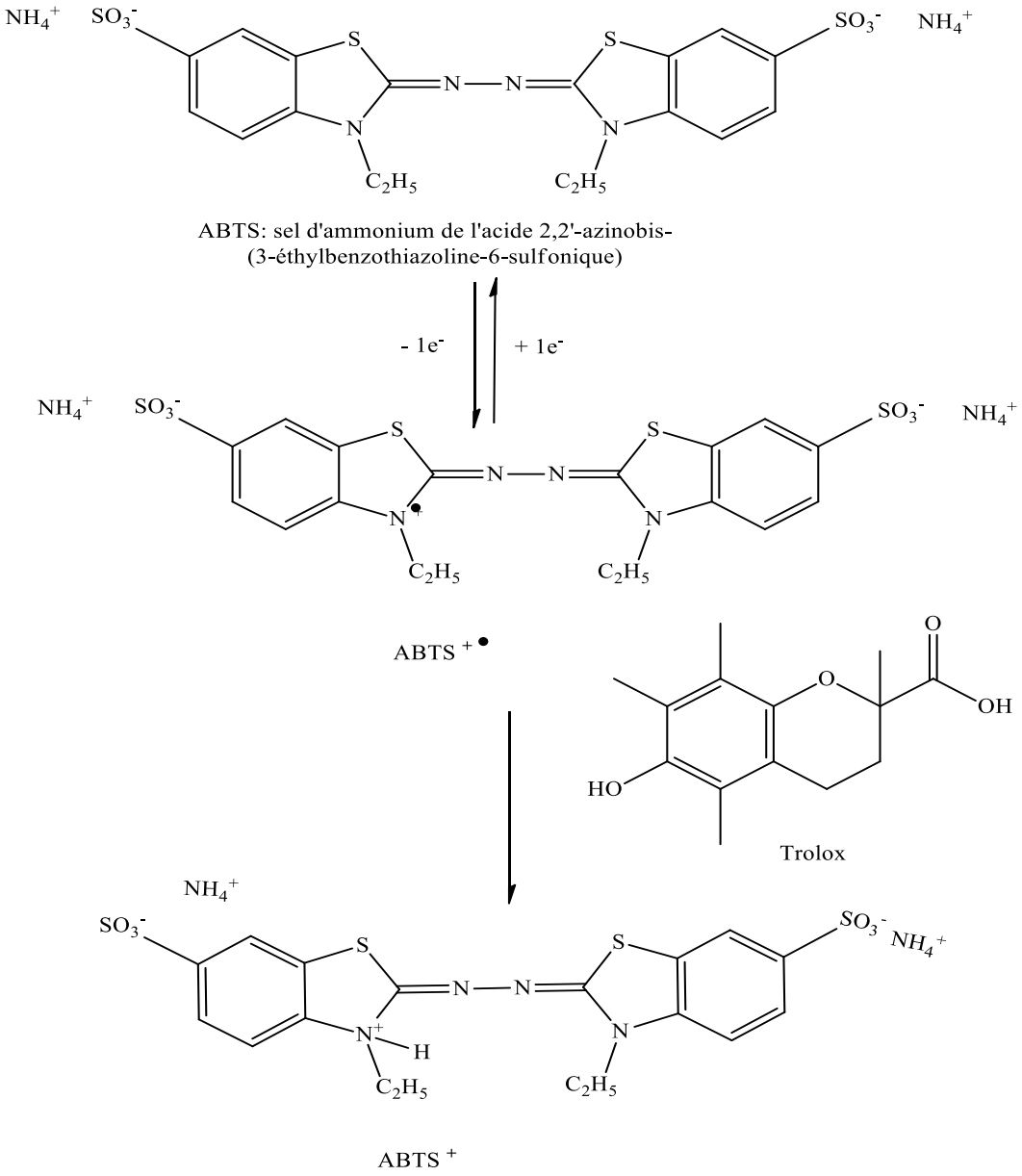


Figure 21 : Réaction entre l'ABTS et un antioxydant donneur de H (AH) trolox.

1.2 Test DPPH

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH• illustrée sur la Figure 22. L'antioxydant va réagir avec le DPPH•, en lui transférant un électron singulet. La solution radicale DPPH• de couleur violette va se réduire en DPPH de couleur jaune-verte. La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permettra de déterminer l'IC50 qui correspond au temps au bout duquel 50% de coloration est perdue c'est à dire que la moitié d'antioxydant présent réagit avec (DPPH•).

Un autre mode d'expression du résultat consiste à construire une gamme étalon avec le trolox puis de reporter l'absorbance des échantillons sur la courbe d'étalonnage. Cela permet d'exprimer le résultat en mg d'équivalent de trolox par gramme de matière sèche.

Cette méthode a été développée en 1995 par Brand et al. et a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

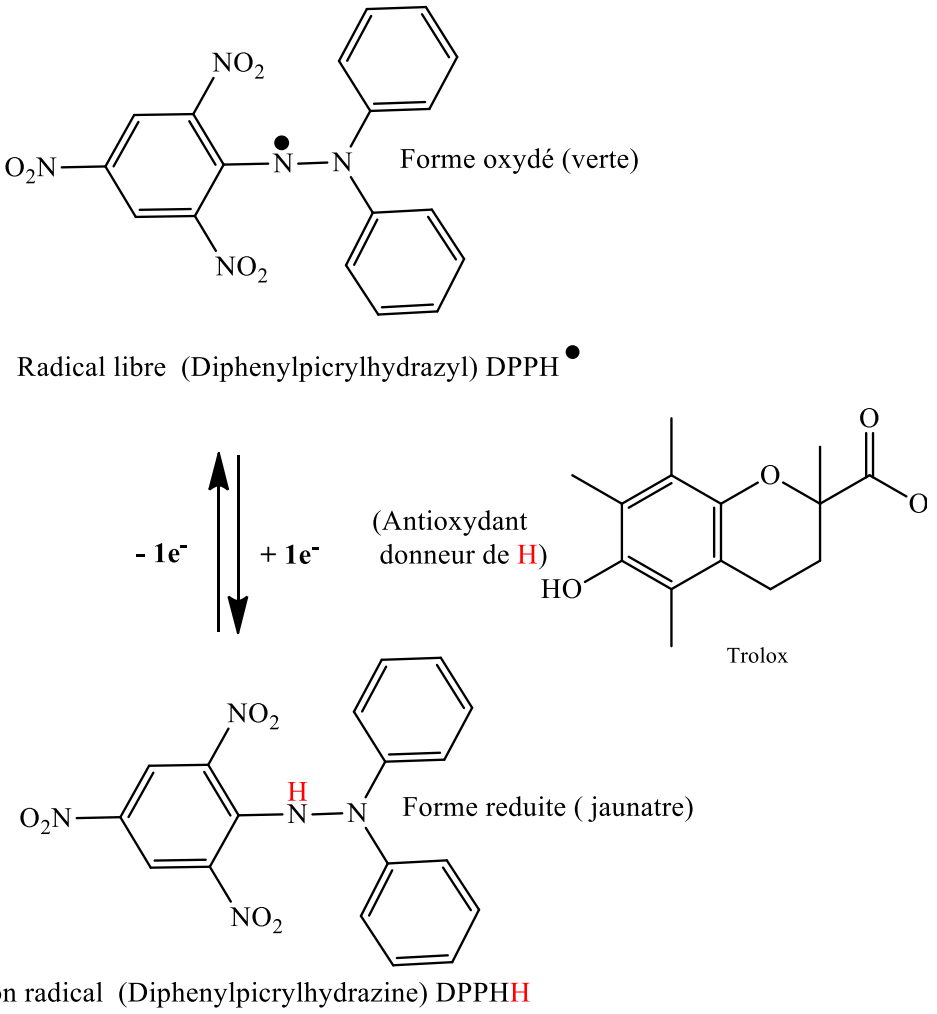


Figure 22 : Réaction entre le DPPH et un antioxydant donneur de H (AH) Trolox.

2 Activité anti-acétylcholinestérase

2.1 Maladie d'Alzheimer (MA)

C'est en 1906 que la maladie d'Alzheimer fut découverte par le médecin allemand Alois Alzheimer. C'est une maladie neurodégénérative (perte progressive de neurones) du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et de la mémoire. C'est une forme la plus fréquente de démence chez l'être humain.

A ce jour, la maladie d'Alzheimer reste incurable. Néanmoins, pour ralentir la progression de cette maladie, il est possible d'augmenter le niveau d'acétylcholine dans le cerveau par le biais d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. En effet, les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ont un taux d'acétylcholine particulièrement faible, expliquant les troubles cognitifs observés. L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui se trouve au niveau des synapses. Il permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'enzyme responsable de l'équilibre nerveux est l'acétylcholinestérase. Ce dernier assure la libération de la fente synaptique pour une nouvelle transmission par dégradation de l'acétylcholine résiduelle se trouvant sur les récepteurs post-synaptique (Figure 23). La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton et al., 2006). Des recherches récentes convergent dans ce but afin de trouver un composé capable de se substituer à l'acétylcholine et qui inhiberait l'activité de l'enzyme. Les médicaments disponibles sur le marché agissent sur cette activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine. A l'heure actuelle, quatre inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, la tacrine, le donepzil, la rivastigmine et la galanthamine ont été approuvés par la « Food and Drug Administration » des Etats-Unis.

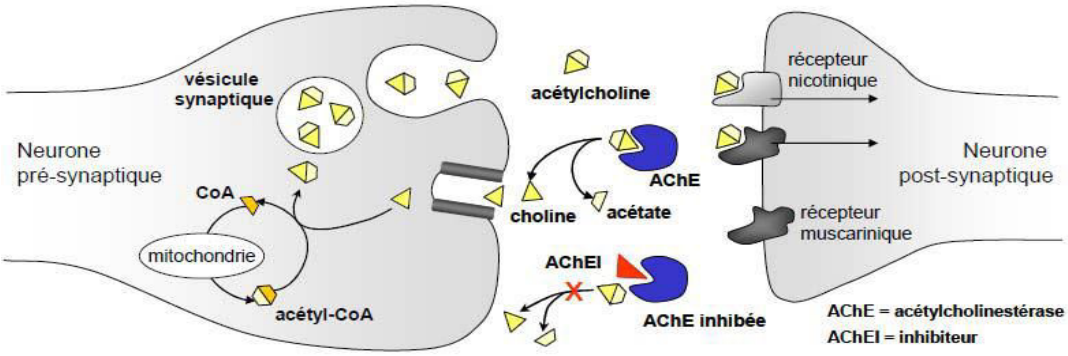


Figure 23 : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique. (Urbain, 2007)

Le développement de nouveaux agents inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est nécessaire. Dans les pratiques traditionnelles, de nombreuses plantes ont été utilisées pour traiter les troubles cognitifs, y compris les maladies neurodégénératives et différents troubles neuropharmacologiques. Certaines plantes médicinales ainsi que leurs composés phytochimiques ont été étudiés pour leur capacité à inhiber l'acétylcholinestérase.

L'étude de l'activité inhibitrice de l'AChE, évaluée à l'aide du test d'Ellman, ont démontré pour la première fois que l'acide chlorogénique, et la catéchine était un puissant inhibiteur de l'acétylcholinestérase. En outre, la galanthamine qui est un alcaloïde isolé à partir de plantes de la famille des Amaryllidaceae est devenu un important traitement de la maladie d'Alzheimer (Ouattara et al., 2013b).

2.2 Principe du test d'Ellman

Le test d'Ellman évalue le pouvoir inhibiteur d'un composé sur l'AChE. Il s'agit d'un protocole standard qui permet la détermination des thiols libres. Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE pour produire de la thiocholine. Cette dernière va réagir avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune. Cette réaction est illustrée en figure 24.

En présence d'un inhibiteur enzymatique, cette réaction permet d'étudier les paramètres cinétiques et par la suite de quantifier l'inhibition exprimée par son IC50 (concentration diminuant l'activité enzymatique de moitié) (Ellman 1961).

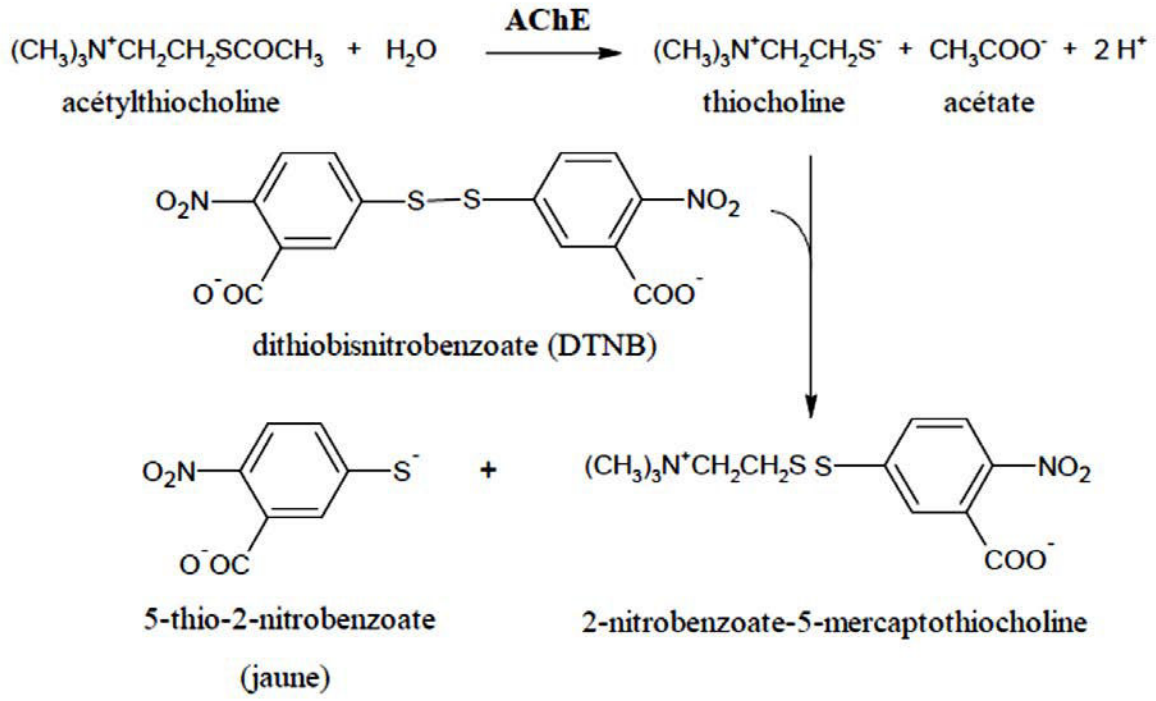


Figure 24 : mécanisme de dosage de l'activité AChE en utilisant le DTNB et le thionitrobenzoate.

2.3 Modélisation

Le criblage virtuel (docking) est une méthode utilisée avec des logiciels dédiés qui constituent une suite de programmes mathématique-informatiques conçus pour la chimie pharmaceutique. Cette suite se base sur la collection du type de la cible protéinique (enzyme) et de la famille d'inhibiteurs ou d'activateur (ligand). Dans la majorité des cas, il faut appliquer différents programmes afin d'optimiser les résultats et avoir l'étude complète pour observer les interactions entre le ligand et l'enzyme (Krid, 2008). Généralement, le criblage virtuel est une méthode permettant l'évaluation biologique du criblage réel, qui nous aide à vérifier le mode de fixation et l'emplacement d'un nombre illimité et varié de molécules dans les sites actifs des enzymes. Ceci rend cette méthode très utile et primordiale en chimie médicinale, elle peut en effet servir comme indicateur des composés qui interagissent avec la protéine (Krid, 2008). Ainsi, le docking a pour objectif l'évaluation de deux structures chimiques différentes, un ligand et un récepteur, ainsi que l'étude de leurs adaptations. De plus, on a la possibilité d'étudier le milieu des acides aminés dans lequel le ligand est considéré comme adaptable. En revanche, comme tout autre programme, le docking possède des désavantages. Il néglige ainsi toutes déformations effectuées sur l'enzyme durant la cristallisation ou la protéine lors de la fixation d'un ligand (Arrault, 2007). Mais on peut résoudre ce problème par la minimisation de l'énergie de la protéine par des logiciels spécifiques.

Chapitre IV : Chromatographie analytique

1 Chromatographie liquide

1.1 HPLC

La chromatographie s'est fortement développée au cours des années 1940 et 1950 suite aux travaux d'Archer John Porter Martin et de Richard Laurence Millington Synge. Ils ont établi les principes et les techniques de base de la chromatographie de partage. Leur travail a conduit au développement rapide de plusieurs nouvelles méthodes de chromatographie : sur papier, sur colonne, en phase gazeuse, et la chromatographie liquide haute performance.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est adaptée aux analyses qualitatives et quantitatives d'analytes présents dans un mélange.

Un appareillage de chromatographie liquide à haute performance est constitué d'un injecteur, d'un système de pompes qui entrainent la phase mobile, d'une colonne qui contient une phase stationnaire et enfin et d'un détecteur (figure 26). Il existe plusieurs types de phases stationnaires. La différence principale concerne le groupement greffé sur la silice. Lorsque la silice est greffée par des groupements apolaires comme les chaines carbonées linaires C18 ou C8 par exemple, on parle chromatographie en de phase inverse. C'est la technique la plus couramment utilisée, elle permet de séparer avec efficacité un large éventail de molécules polaires. Des interactions de type hydrophobe sont mises en jeu avec ce type de phase stationnaire. Pour d'autres applications telles que la séparation de composés apolaires, la phase normale peut être utilisée notamment avec des groupements NH_2 greffés.

En HPLC, la détection est assurée le plus couramment par un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) de longueurs d'ondes comprises entre 200 et 800 nm. Deux lampes permettent de couvrir cette gamme de longueurs d'ondes, une lampe au deutérium (190 – 600 nm) et une lampe au tungstène (370 – 800 nm). Cependant, il existe d'autres type de détecteurs tels que les réfractomètres différentiels ou encore les détecteurs électrochimiques.

1.2 LC-PDA/MS

La chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) encore appelée LC-MS, combine une méthode séparative à une détection en spectrométrie de masse. Ce détecteur permet de résoudre les phénomènes de coélution en rendant possible l'identification de composés structuralement similaires grâce à leur masse différente. La LC-MS permet d'analyser un large éventail d'espèces chimiques. C'est une technique puissante avec une sensibilité élevée. Son application est orientée vers la séparation, la détection et l'identification de produits chimiques au sein de mélanges complexes. Cette technique est adaptée pour l'identification de métabolites inconnus.

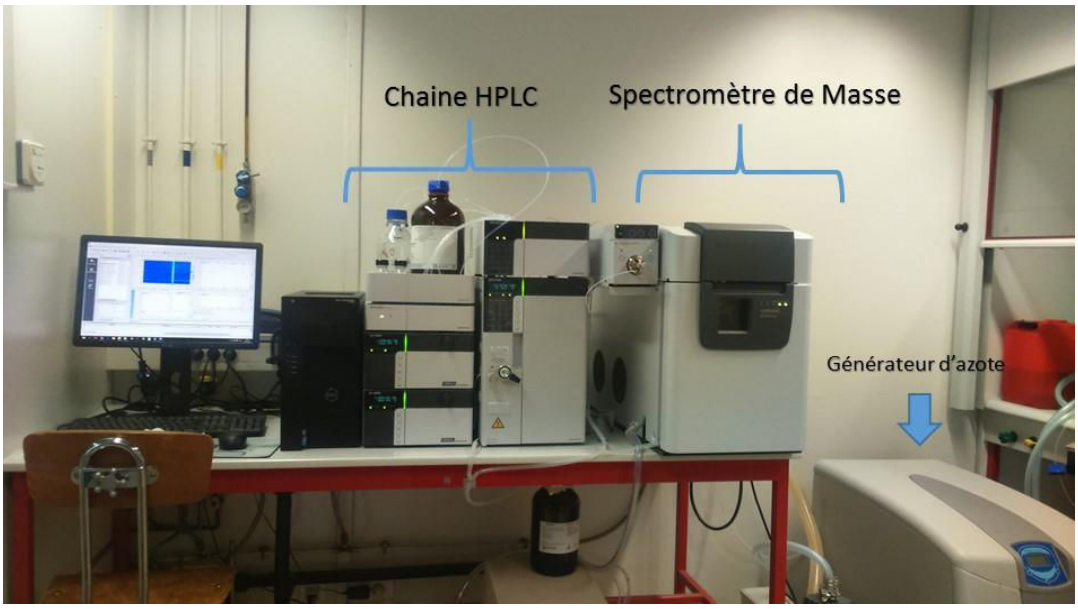


Figure 25 : appareillage Shimadzu LC-MS 2020.

Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse est courant dans la chimie analytique. En premier lieu, la chromatographie sépare les composés au sein de mélanges complexes. Les analytes sont ensuite ionisés dans une source d'ionisation (figure 26). L'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont les deux techniques le plus couramment utilisées en LC-MS. En effet, ces techniques sont adaptées pour les échantillons sous forme liquide. Notre appareillage étant équipé d'une source par électronébulisation, seule cette technique sera décrite.

Trois étapes dans le processus d'ionisation par électronébulisation sont décrites : la formation de gouttelettes électriquement chargées, l'explosion de ces gouttelettes en de plus petites, puis la formation des ions en phase gaz (figure 26). La formation des gouttelettes est obtenue par l'application d'un potentiel élevé aux électrodes du capillaire par lequel arrive les analytes et la phase mobile. L'accélération des gouttelettes chargées vers l'entrée du spectromètre de masse est assurée par une différence de potentiel appliquée entre le cône d'extraction de la contre-électrode et le cône de l'électrode échantillonneuse (quelques dizaines de volts). Lorsque la solution quitte le capillaire, elle est polarisée par le champ électrique généré par la différence de potentiel entre le capillaire d'introduction et la contre-électrode (entrée du spectromètre de masse). Le diamètre du flux d'écoulement diminue et conduit à la formation d'un cône dit « cône de Taylor ». Lorsque le champ électrostatique est

suffisamment intense, le cône s'étire et conduit à la formation de gouttelettes chargées à leur surface positivement ou négativement selon la polarité des ions à analyser. Afin d'assister ce processus, un flux d'azote est appliqué parallèlement à l'axe du capillaire d'infusion. Au cours de la progression de l'aérosol, l'évaporation du solvant provoque la diminution de la taille des gouttelettes. Lorsque le rapport charge/surface de la gouttelette devient trop élevé (limite de Raleigh), elle éclate en gouttelettes plus petites. Par évaporation du solvant et explosions « coulombiennes » successives, le diamètre des gouttelettes diminue fortement. Les gouttelettes résultantes contiennent alors en moyenne un ion. Les ions formés en phase gaz après l'évaporation du solvant restant, transmettent alors leur charge à l'analyte.

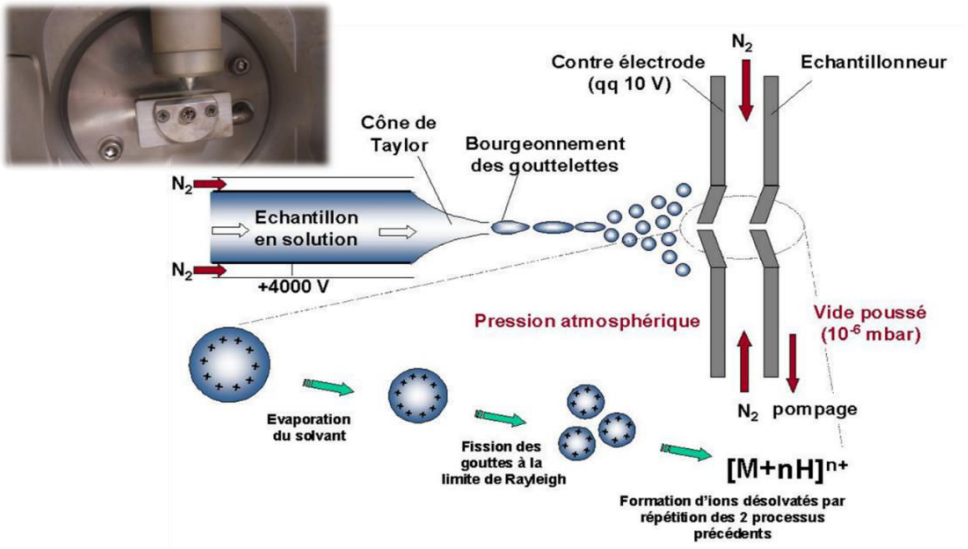


Figure 26 : schéma de principe de la source électrospray d'ionisation (ESI) (Tang and Kebarle, 1993).

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse permettant de détecter selon la mesure de leur masse. On peut qualifier cette technique de balance moléculaire qui donne accès à la masse moléculaire de la forme ionisée de l'analyte, sous la forme d'un rapport (*m/z*). L'ionisation peut être réalisée soit en détection négative (détection d'anions), soit en détection positive (détection de cations). Dans le cas d'un analyseur de type quadripôle, la séparation a lieu dans un champ magnétique sous haute tension au sein du QIA (Quadripole Ion Analyzer) avant leur détection qui transforme le signal des ions en signal électrique. L'intensité du signal augmente proportionnellement avec le nombre d'ions (figure 27).

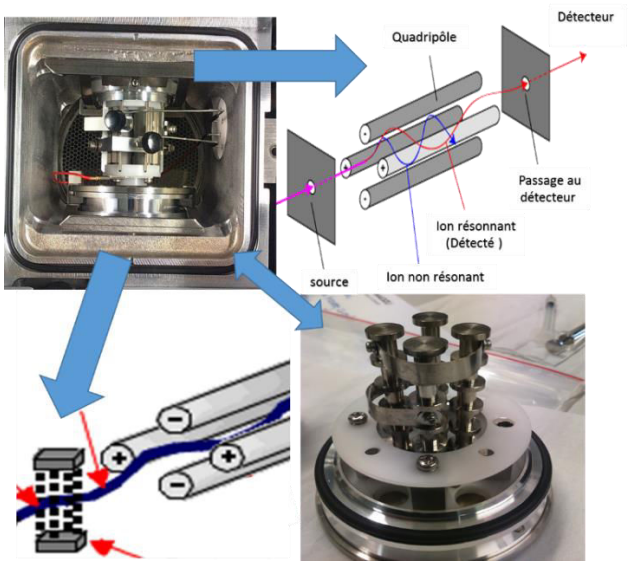


Figure 27 : image illustrant la séparation ayant lieu dans le champ magnétique du spectromètre (Bristol university).

2 Chromatographie gazeuse

2.1 GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet de séparer, identifier et quantifier des analytes au sein de mélanges complexes (figure 28). C'est une méthode adaptée pour l'analyse de composés de faible poids moléculaire. Pour être analysé en GC-MS, un composé doit être suffisamment volatil et thermiquement stable. En outre, les composés fonctionnalisés peuvent nécessiter une modification chimique (dérivatisation) avant l'analyse afin d'éliminer les effets d'adsorption indésirables. Les échantillons sont généralement analysés sous forme de solutions organiques, par conséquent, les analytes doivent être extraits de la matrice végétale par des solvants organiques.

La solution est introduite dans l'appareil par le biais de l'injecteur. Elle est ensuite vaporisée et envoyée dans une colonne chromatographique. L'échantillon est entrainé via un gaz vecteur (hélium) à travers la colonne. Les composés présents dans le mélange sont séparés en fonction de leur interaction avec la phase stationnaire de la colonne et la phase mobile (gaz). La dernière section de la colonne passe à travers une ligne de transfert chauffée reliée à l'entrée de la source d'ionisation où les composés sont ionisés (figure 28).

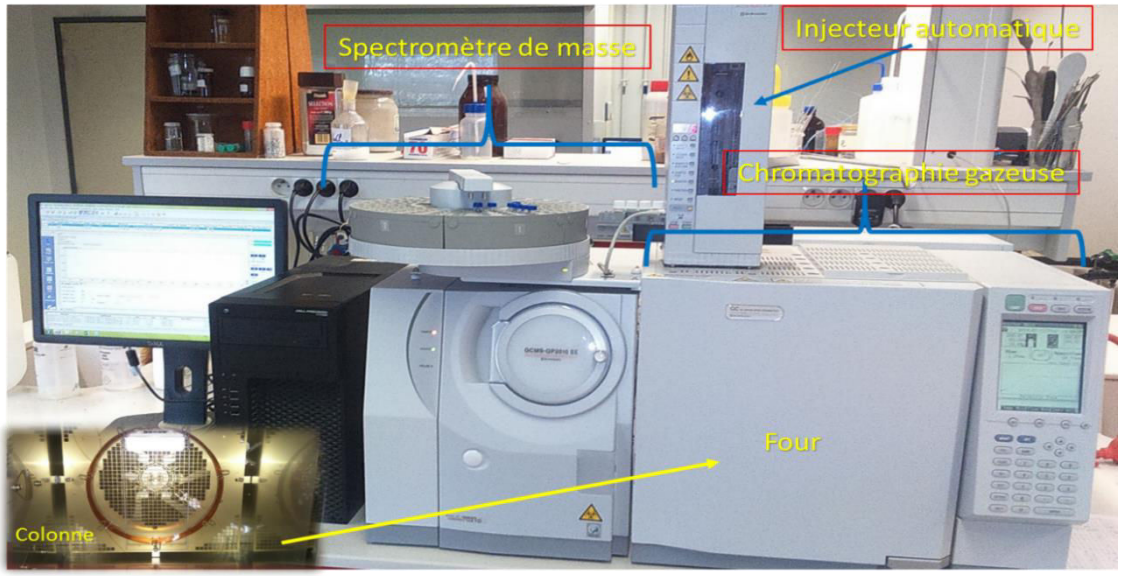


Figure 28 : appareillage Shimadzu GCMS-QP2010 Plus.

Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Pour l'IE (le cas de notre appareillage), un faisceau d'électrons ionise les molécules en leur arrachant un électron, on parle de « douche électronique ». Une molécule ayant perdu un électron est appelée ion radicalaire $M^{\bullet+}$. En raison de la quantité importante d'énergie transmise à l'ion (habituellement 70 eV), il se fragmente en ions produits présentant des abondances relatives caractéristiques qui fournissent une « empreinte » de cette structure moléculaire. Ces informations sont utilisées pour l'identification de composés avec l'aide d'une base de données NIST 11 (*National Institute of Standards and Technology*).

L'analyse des ions se fait dans un analyseur de type quadripôle. Une fois les ions analysés, ils pénètrent dans un détecteur dont la sortie est amplifiée pour l'obtention d'un signal exploitable. Le détecteur envoie des informations à un ordinateur qui enregistre les données produites.

Chapitre V : Production de poudres superfines

1 Broyage et tamisage

Il existe plusieurs méthodes de broyage telles que : la compression, l'impact, l'attrition ou la découpe. Dans le cas du broyage de végétaux deux catégories peuvent êtres différenciées : le broyage classique et la micronisation.

- La première implique des broyeurs à marteaux, à disques ou à broches ce qui permet d'obtenir des poudres dont la taille de particules peut varier de quelques microns à plusieurs millimètres.
- La micronisation implique des broyeurs à billes, à jet ou encore à haute pression (Kenmegne et Hardy, 1995) ce qui permet d'obtenir des poudres superfines dont la taille de particules est inférieure à 10 µm.

Peu de données bibliographiques sont disponibles sur le tamisage. En effet, la technique du tamisage est utilisée depuis longtemps mais peu d'études sont réalisées dans ce domaine. Le tamisage est une technique qui sert à séparer un mélange poudreux pulvérulent en fonction de sa granulométrie. Le tamis est un dispositif composé soit : d'un écran tissé en métal ou en tissu, soit d'un cyclone centrifugeur à vitesse variable. Cependant, très récemment, les études de Zhao et al., 2015 et de (Rosa et al., 2013) décrivent la séparation de poudres selon leur granulométrie avec une technique de tamisage.

Le broyage et le tamisage des parties de plantes séchées sont des opérations consécutives qui ont pour but de produire des poudres avec différentes granulométries. Le broyage est une opération consistant à fractionner un solide ce qui a pour effet d'augmenter sa surface spécifique. Le broyage mécanique permet de diminuer la taille des particules, le tamisage a pour rôle la séparation des différentes granulométries. Dans l'industrie pharmaceutique le broyage est souvent utilisé car il permet d'augmenter la biodisponibilité d'une substance, l'un des intérêts du broyage est d'augmenté la surface spécifique. La production de particules microniques peut être un moyen d'améliorer l'efficacité du produit lors d'une administration orale. Le broyage et le tamisage est un procédé connu depuis longtemps et actuellement fortement utilisé pour divers procédés industriels.

Certains auteurs ont néanmoins proposé des modèles théoriques concernant l'énergie utilisée lors du broyage. L'ensemble de ces modèles relie le rendement de broyage, l'énergie de broyage et la distribution de la taille des particules (Jankovic, 2010). Les procédés de broyage comportent aussi des effets négatifs, notamment pour les matériaux sensibles à la température comme les végétaux. En effet, durant le broyage, l'énergie utilisée pour fracturée les particules peut entraîner une élévation de température pour un solide donné. Cela peut induire une dégradation de la qualité du produit avec une perte de molécules aromatiques et de nutriments (Pesek et Wilson, 1986 ; Singh et Goswani, 1999a; Murthy et al., 1999).

Les travaux de Walde et al. en 2002 ont montré qu'une déshydratation préalable du produit avait pour effet de réduire l'énergie de broyage permettant d'éviter l'échauffement ainsi que la production de particules de plus petites tailles. De plus, Baudelaire en 2006 a établi que la teneur en eau du matériau à broyer est liée à la vitesse d'encrassement du broyeur. Ce phénomène d'encrassement est l'un des problèmes majeurs des procédés de broyage car il réduit la capacité du broyeur à fractionner les particules et entraîne une forte élévation de l'énergie nécessaire au broyage. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur le broyage de matières alimentaires (Djantou, 2006).

Le broyage comporte deux aspects : la taille des particules obtenues et les modifications de surface spécifique de ces particules. Les opérations de broyage peuvent provoquer des modifications significatives de texture, de structure, de forme et de surface (Chamayou et Phage, 2003). L'augmentation de la surface de contact due à la fragmentation augmente la réactivité physique, chimique ou enzymatique des particules. Certains composants nutritionnels peuvent aussi voir leur disponibilité augmenter suite à la destruction des structures cellulaires. Du fait de l'élévation de la température due à l'énergie de rupture des molécules, certaines caractéristiques physicochimiques peuvent également être modifiées (Maaroufi, 2000). Pour cela des paramètres spécifiques ont été utilisés pour préserver les produits actifs tels que les temps et les vitesses de broyage.

a) Broyage

Il existe plusieurs méthodes de broyage telles que : la compression, l'impact, l'attrition ou la découpe. Dans le cas du broyage de végétaux deux catégories peuvent êtres différenciées : le broyage classique et la micronisation.

- La première implique des broyeurs à marteaux, à disques ou à broches ce qui permet d'obtenir des poudres dont la taille de particules peut varier de quelques microns à plusieurs millimètres.
- La micronisation implique des broyeurs à billes, à jet ou encore à haute pression (Kenmegne et Hardy, 1995) ce qui permet d'obtenir des poudres superfines.

Les poudres sur les quelles cette étude porte sont produites par un broyeur à disque.

b) Tamisage

Peu de données bibliographiques sont disponibles sur cette procédure. La technique de tamisage est utilisée depuis longtemps mais peu d'études sont réalisées dans ce domaine. Cependant, très récemment, les études de Zhao et *al*., 2015 et de (Rosa et *al*., 2013) décrivent la séparation de poudres selon leur granulométrie à l'aide d'une technique de tamisage.

Le tamisage est une technique qui sert à séparer un mélange poudreux pulvérulent en fonction de sa granulométrie. Le tamis est un dispositif composé soit : d'un écran tissé en métal ou en tissu, soit d'un cyclone centrifugeur à vitesse variable. Dans ce dernier cas, les particules sont triées en fonction de leur masse.

2 Pulvérisation et Tamisage différentiel (PTC)

Le procédé PTC selon Baudelaire E., (2013) permet la séparation à sec des constituants d'un corps en permettant l'extraction des principes actifs à partir d'organes végétaux. C'est une méthode d'extraction à sec qui diffère des méthodes classiques en ce qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'un solvant organique. Elle peut être également une méthode d'assistance à l'extraction utilisée pour la production d'un plus large éventail de principes actifs ayant une large gamme de tailles et de masses moléculaires. Ce procédé se distingue également des procédés utilisant les plantes à traire et les fluides supercritiques en ce qu'il conduit à un meilleur rendement de production. Les produits issus de cette nouvelle méthode peuvent être utilisés à des fins nutritionnelles ou encore dans les domaines de la neutraceutique, du cosmétique et de la pharmaceutique.

Chapitre VI : Méthodes d'extraction

1 Introduction

Après nous être intéressé aux métabolites de nos 12 plantes sélectionnées, nous allons aborder les principales méthodes d'extraction pour isoler ces composés actifs.

Les procédures industrielles d'extraction des principes actifs sont principalement basées sur des méthodes de macération combinées avec de l'agitation, des ultrasons, des micro-ondes ou un encore des traitements enzymatiques (Lee and Lee, 2008).

Un des enjeux majeurs de la chimie consiste en l'innovation technologique et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction qui s'inscrivent dans une démarche de « chimie verte » ainsi que dans le respect de l'environnement, ceci par des procédures plus rapides qui consomment moins de solvant, voire plus de solvant du tout. Le but principal est d'extraire les substances actives stockées à l'intérieur des organes (racines, tiges, feuilles…), puis de fournir les extraits directement exploitables dans les secteurs de la neutraceutique, l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmaceutique.

L'étude qualitative et quantitative des métabolites secondaires à partir de matières végétales repose principalement sur le choix approprié de la méthode d'extraction. L'extraction est la première étape de toute étude de plantes médicinales et joue un rôle déterminant sur les résultats finaux (Smith, 2003).

Du fait des nouvelles technologies émergentes et des améliorations techniques qui touchent les produits pharmaceutiques ou encore les agro-ressources, les chercheurs se sont intéressés aux molécules bioactives issues de végétaux. Les substances naturelles peuvent également être utilisées dans le domaine de l'agroalimentaire en tant que colorant ou arôme (exemple : la vanilline). Ces molécules bioactives présentent également des propriétés pharmacologiques qui permettent l'élaboration de nouveaux médicaments. Ils peuvent être extraits à partir de diverses parties des plantes telles que les feuilles, les tiges, les fleurs, l'écorce, les fruits ou encore les racines.

Les principaux facteurs qui affectent le processus d'extraction en fonction du type de métabolites secondaires sont notamment : le solvant employé, la température ou encore la pression ainsi que sa durée. L'extraction peut donc se faire en fonction de différents paramètres selon les molécules ciblées. Les méthodes classiques utilisées sont la macération,

l'extraction soxhlet et l'hydrodistillation. La procédure chimique classique pour l'obtention de constituants organiques à partir de tissus séchés de la plante (écorces, graines séchées, racines, feuilles) se fait le plus souvent avec des solvants apolaires (éther de pétrole, hexane ou chloroforme) pour les composés apolaires (lipides, terpénoïdes), et avec des alcools (méthanol, éthanol) pour les composés polaires (phénols, acide phénoliques, glucosides).

L'efficacité de l'extraction dépend principalement du choix du solvant employé. La polarité du composé cible à extraire est le facteur le plus important pour ce choix. L'affinité moléculaire entre le solvant et le soluté, le transfert de masse, l'utilisation de co-solvants, l'impact sur l'environnement, la toxicité pour l'homme et le coût sont autant de facteurs à prendre en compte dans la sélection du solvant pour l'extraction de composés bioactifs (Cowan, 1999).

D'autres méthodes existent pour extraire les métabolites secondaires du matériel végétal. On peut citer la décoction qui consiste à faire bouillir la plante dans l'eau, l'infusion qui consiste à ajouter de l'eau chaude à la plante ou encore la percolation qui permet d'extraire les métabolites de la plante à l'aide d'un percolateur. D'autres méthodes dites non conventionnelles ont également été développées ces dernières années. On peut citer l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction de champs pulsés électriques, l'extraction assistée par enzyme, l'extraction assistée par micro-onde, l'extraction par un fluide supercritique ou encore l'extraction liquide sous pression.

2 Extraction par macération

La macération est une procédure d'extraction utilisée depuis de longues années. Elle est devenue, au fil du temps un moyen très répandu et peu coûteux pour l'isolement des composés polaires comme les polyphénols. La macération consiste à laisser reposer un solide dans un liquide à température ambiante afin d'en extraire des composés actifs, un parfum ou une saveur pour les conserver ou pour qu'ils s'y décomposent. Le but est d'épuiser le matériel végétal de toutes substances solubles dans le solvant d'extraction. Pour améliorer le rendement d'extraction il est possible par exemple de broyer la plante sèche afin d'augmenter la surface spécifique pour un meilleur échange soluté solvant (Azmir et al., 2013). La procédure d'extraction par macération sera précisée plus en détail dans le chapitre suivant (matériel et méthode).

Pour notre étude, des extraits par macération hydroalcoolique sont réalisés dans le but de doser les polyphénols et flavonoïdes totaux ainsi que les métabolites secondaires contenus dans les poudres obtenues par PTC et des parties de plantes non broyées. En effet, la macération hydroalcoolique est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur comme les polyphénols. D'après la littérature elle permet d'obtenir d'excellents résultats sur de longues durées (20h), à température ambiante (Rostagno and Prado, 2013). Nous n'avons pas utilisé d'acide pour éviter toute dégradation des composés d'intérêt ciblés.

3 Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple permettant de répéter plusieurs cycles d'extraction avec un solvant jusqu'à épuisement complet du soluté issu de la matière première. L'extracteur Soxhlet a d'abord été proposé par le chimiste allemand Franz Ritter Von Soxhlet en 1879. Au départ, il a été conçu principalement pour l'extraction des lipides et les terpènes mais à l'heure actuelle, il n'est pas limité à cette seule tâche. En effet, il est également utilisé pour l'extraction de composés bioactifs à partir de diverses sources naturelles. De manière générale, une petite quantité d'échantillon est placée dans une cartouche d'extraction en cellulose surmontée d'un réfrigérant. Le ballon de distillation contient le solvant. Le solvant est choisi en fonction du type de molécules ciblées : polaire pour l'extraction de molécules polaires (exemple : méthanol) et apolaire pour l'extraction de composés apolaires telles les huiles essentielles (exemple : hexane). Lorsque la cartouche est presque totalement immergée par le solvant d'extraction, la solution est aspirée par un siphon. Le siphon évacue le solvant du porte-cartouche, le solvant retournant dans le ballon. Le solvant contient ainsi les molécules extraites. Ce cycle est répété à plusieurs reprises, jusqu'à ce que l'extraction soit terminée (Azmir et al., 2013).

4 Hydrodistillation

Une autre méthode permettant d'extraire les produits actifs du matériel végétal est l'hydrodistillation. C'est une méthode usuelle d'extraction des huiles essentielles. Elle ne nécessite pas l'utilisation de solvant organique et peut être réalisée avant ou après la déshydratation de la plante. Elle consiste à porter à ébullition un mélange eau/matériel

végétal. Les cellules du végétal éclatent et libèrent alors les espèces chimiques odorantes, insolubles dans l'eau, qui sont entrainées par la vapeur d'eau puis récupérées dans un autre récipient après condensation dans le réfrigérant.

Il existe deux types d'hydrodistillation :

- La distillation à l'eau, lors de l'hydrodistillation, les matières végétales sont introduites dans un premier temps dans un ballon, et dans un deuxième temps, une quantité d'eau est ajoutée puis le mélange est porté à ébullition.

- La distillation à la vapeur d'eau, de la vapeur d'eau est injectée directement dans l'échantillon de plante. L'eau chaude et la vapeur sont les principaux facteurs influents sur la libération des composés actifs du tissu végétal.

Dans les deux cas, le refroidissement permet de condenser le mélange de vapeur d'eau et d'huile. Le mélange s'écoule du condenseur jusqu'à un séparateur où les composés bioactifs sont séparés de l'eau.

L'hydrodistillation implique trois principaux processus physico-chimiques qui sont l'hydrodiffusion, l'hydrolyse et la décomposition par la chaleur. A une température élevée d'extraction, certains composants volatils peuvent être dégradés. Cet inconvénient limite donc son utilisation pour des composés non thermolabiles (Vankar, 2004).

5 Méthodes d'assistance à l'extraction

5.1 Méthodes précédantes

De nouvelles procédures, écologiques, dites de « chimie verte », sont apparues récemment. Elles ont pour but, soit d'assister l'extraction, soit de concentrer les composés actifs. Parmi elles, on peut citer par exemple la pulsation électrique qui a pour rôle de détruire les membranes cellulaires, étape déterminante pour toute extraction (Parniakov et al., 2016), jouant ainsi le rôle de promoteur pour l'extraction intracellulaire à partir de matières végétales (Lebovka, 2011). La facilité avec laquelle la paroi cellulaire se rompt est également un paramètre important susceptible d'influencer le processus (Fincan et al., 2004). La destruction de la membrane cellulaire dans les tissus végétaux par l'application d'impulsions électriques a été décrite comme une phase de prétraitement pour augmenter l'efficacité d'extractions intracellulaires (Bazhal et al., 2001).

Des extractions sous pression avec enrichissement en résine macroporeuse sont également utilisées pour obtenir de meilleurs rendements d'extraction (Qi et al., 2015).

L'application de l'extraction assistée par ultrasons permet d'améliorer l'extraction de composés à partir d'une matrice végétale (Vilkhu et al., 2008). En effet, les ultrasons agissent directement sur la cellule de la plante pour libérer les métabolites (Sicaire et al., 2016). Le traitement par ultrasons permet une plus grande pénétration du solvant dans le matériel cellulaire, un traitement plus court, des rendements plus élevés, une meilleure reproductibilité, une consommation plus faible de solvants et d'émulsifiants, rendant le processus plus écologique (Roselló-Soto et al., 2015).

Enfin, l'utilisation du processus d'extraction par microondes a également suscité un intérêt important pour l'extraction verte de composés issus de matrices végétales (Barba et al., 2016). Le but principal dans ce type de procédures d'extraction consiste à travailler à faible température (< 60 °C) pour ne pas dégrader les composés actifs (Liazid et al., 2007).

Ces procédures procurent plusieurs avantages, d'une part la réduction du temps d'extraction, la consommation d'énergie, l'utilisation réduite de solvants dangereux et coûteux, et d'autre part, l'augmentation des rendements d'extraction, dans un contexte d'extraction verte. Cependant, l'augmentation de la température dans le cas des ultrasons et des microondes peut induire la dégradation ou l'oxydation des composés actifs (Pingret et al., 2012). Chaque méthode présente ses avantages et ses inconvénients, même si ces derniers tendent à êtes moins nombreux.

5.2 Nouvelles méthodes

Notre étude a pour but d'appliquer une méthode d'extraction dite « verte », la procédure PTC, qui ne présente pas les désavantages décrits pour les autres méthodes. Cette procédure d'extraction qui se fait par voie sèche, sans solvant, implique de broyer finement le matériel végétal pour extraire et concentrer les composés actifs dans les poudres résiduelles. Cette procédure décrite comme une méthode d'extraction est très récente, ainsi peu de littérature est disponible à son sujet. Lors de la mise en œuvre du procédé, les parties des plantes subissent tout d'abord une dessiccation qui conduit à l'obtention d'un produit sec par élimination de l'eau présente dans le matériel végétal. Le produit déshydraté est ensuite pulvérisé et tamisé pour individualiser les constituants du produit sous forme de microparticules (Baudelaire 2013). Le but est d'enrichir en produits actifs sans les dégradés,

dans les différentes fractions de poudres superfines et de mettre en évidence la fonctionnalisation (propriétés biofonctionnelles) de ces extraits par sélection granulométrique.

6 Références

Arrault, A. (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse Université d'Orléans.

Aslan et al. (2014). Quality Assesment of Urtica dioica L. Samples Collected from Different Locations of Turkey. short communication Turk J Pharm Sci 11(2), 223-230.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J. Food Eng. *117*, 426–436.

Badgujar, S.B., Patel, V.V., and Bandivdekar, A.H. (2014). Foeniculum vulgare Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. BioMed Res. Int. *2014*, 842674.

Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., de Souza Sant'Ana, A., and Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. Trends Food Sci. Technol P. 96–109.

Baudelaire, E. (2006). Optimisation du broyage des mangues séchées (manguifera indica var Kent) : influence sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des poudres obtenues (thèse université de Lorraine).

Baudelaire E. (2013). Brevet WO2013057379A1 - Procede ptc pour l'extraction par voie seche des principes actifs naturels.

Bazhal, M.I., Lebovka, N.I., and Vorobiev, E. (2001). Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. J. Food Eng. *50*, 129–139.

Bernardi, A.P.M., López-Alarcón, C., Aspee, A., Rech, S., Von Poser, G.L., Bride, R., and Lissp, E. (2007). Antioxidant activity of flavonoids isolated from Hypericum ternum. J. Chil. Chem. Soc. *52*, 1326–1329.

Blazics, B., Papp, I., and Kéry, Á. (2010). LC–MS Qualitative Analysis and Simultaneous Determination of Six Filipendula Salicylates with Two Standards. Chromatographia *71*, 61–67.

Boehm, K., Borrelli, F., Ernst, E., Habacher, G., Hung, S.K., Milazzo, S., and Horneber, M. (2009). Green tea (Camellia sinensis) for the prevention of cancer. Cochrane Gynaecological, Neuro-oncology and Orphan Cancer Group Reviews, Issue 3. Art. No. CD005004.

Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. *54*, 519–546.

Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., and Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from Prunus domestica (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. J. Neurol. Sci. *262*, 77–84.

Boulter, D., and Parthier, B. (1982). Nucleic Acids and Proteins in Plants I - Structure, Biochemistry. Encyclopedia of Plant Physiology. vol.*14* / A 1982

Bowman, J.M., Braxton, M.S., Churchill, M.A., Hellie, J.D., Starrett, S.J., Causby, G.Y., Ellis, D.J., Ensley, S.D., Maness, S.J., Meyer, C.D., et al. (1997). Extraction Method for the Isolation of Terpenes from Plant Tissue and Subsequent Determination by Gas Chromatography. Microchem. J. *56*, 10–18.

Bristol University - Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). http://www.bris.ac.uk/

Butler, L.R.P., and Laqua, K. (2009). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-IX. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation of optical radiation (IUPAC Recommendations 1995). Pure Appl. Chem. *67*, 1725–1744.

Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P., Simon, A., and Duroux, J.L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. J. Agric. Food Chem. *49*, 3321–3327.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., and Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). J. Ethnopharmacol. *87*, 215–220.

Chiang, L.-C., Ng, L.-T., Cheng, P.-W., Chiang, W., and Lin, C.-C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of Ocimum basilicum. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *32*, 811–816.

Chrubasik, C., Wiesner, L., Black, A., Müller-Ladner, U., and Chrubasik, S. (2008). A one-year survey on the use of a powder from Rosa canina lito in acute exacerbations of chronic pain. Phytother. Res. *22*, 1141–1148.

Chung, K.-T., Jr, S.E.S., Lin, W.-F., and Wei, C.I. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. Lett. Appl. Microbiol. *17*, 29–32.

Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., and Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. *38*, 421–464.

Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., and Heyerick, A. (2009). Hop (Humulus lupulus)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. J. Nat. Prod. *72*, 1220–1230.

Crisan, G., Kiss, B., Vlase, L., Balica, G., and Tamas, M. (2010). HPLC determination of some phenolic compounds of Scrophularia nodosa and S. scopolii. Chem. Nat. Compd. *45*, 885–888.

Cushnie, T.P.T., Cushnie, B., and Lamb, A.J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. Int. J. Antimicrob. Agents *44*, 377–386.

Czyzowska, A., Klewicka, E., Pogorzelski, E., and Nowak, A. (2015). Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from Rosa canina L. and Rosa rugosa Thunb. J. Food Compos. Anal. *39*, 62–68.

Danino, O., Gottlieb, H.E., Grossman, S., and Bergman, M. (2009). Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from Inula viscosa. Food Res. Int. *42*, 1273–1280.

Davis, J.M., Murphy, E.A., Carmichael, M.D., and Davis, B. (2009). Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *296*, R1071–R1077.

Deschner, E.E., Ruperto, J.F., Wong, G.Y., and Newmark, H.L. (1993). The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. Nutr. Cancer *20*, 199–204.

Dickens, C.W.S., and Staden, J. van (1990). The In Vitro Flowering of Kalanchöe blossfeldiana Poellniz. II. The Effects of Growth Regulators and Gallic Acid. Plant Cell Physiol. *31*, 757–762.

Du, L., Li, M., Zheng, S., and Wang, B. (2008). Rational design of a fluorescent hydrogen peroxide probe based on the umbelliferone fluorophore. Tetrahedron Lett. *49*, 3045–3048.

Dufall, K.G., Ngadjui, B.T., Simeon, K.F., Abegaz, B.M., and Croft, K.D. (2003). Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant Dorstenia mannii. J. Ethnopharmacol. *87*, 67–72.

Dufresne, C.J., and Farnworth, E.R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. J. Nutr. Biochem. *12*, 404–421.

Dume, G., and Rameau, C. (1989). Flore forestière française (tome 1) de Gérard DUME et Jean-Claude RAMEAU, IDF.

Emma M. Marinova, A.T. (2009). Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. Food Chem. - FOOD CHEM *114*, 1498–1502.

Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., and Codina, C. (2008). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wild, Edible, and Medicinal Fennel from Different Mediterranean Countries. J. Agric. Food Chem. *56*, 1912–1920.

Fenselau, C., and Talalay, P. (1973). Is oestrogenic activity present in hops? Food Cosmet. Toxicol. *11*, 597–603.

Fernández, M.A., García, M.D., and Sáenz, M.T. (1996). Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of Scrophularia frutescens and Scrophularia sambucifolia. J. Ethnopharmacol. *53*, 11–14.

Fincan, M., DeVito, F., and Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment. J. Food Eng. *64*, 381–388.

Fraisse, D., Felgines, C., Texier, O., and Lamaison, J.-L. (2011). Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the Asteraceae Family. Food Nutr. Sci. *02*, 181–192.

Gaillard, Y., Blaise, P., Darré, A., Barbier, T., and Pépin, G. (2003). An unusual case of death: suffocation caused by leaves of common ivy (Hedera helix). Detection of hederacoside C, alpha-hederin, and hederagenin by LC-EI/MS-MS. J. Anal. Toxicol. *27*, 257–262.

Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauft, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H., et al. (2002). Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. Mol. Cancer Ther. *1*, 959–969.

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., and Pelzer, L.E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Il Farm. *56*, 683–687.

Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., and Elias, R. (2004). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. Planta Med. *70*, 561–563.

Harborne, J.B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids (London; New York: Academic Press).

Harborne, J.B. (1983). Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis (Springer Science & Business Media).

Hausen, B.M., Breuer, J., Weglewski, J., and Rücker, G. (1991). alpha-Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (Achillea millefolium L., Compositae). Contact Dermatitis *24*, 274–280.

Higdon, J.V., and Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. *43*, 89–143.

Hodisan, T., Socaciu, C., Ropan, I., and Neamtu, G. (1997). Carotenoid composition of Rosa canina fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. *16*, 521–528.

Hostettmann, K., and Marston, A. (1995). Saponins (Cambridge; New York: Cambridge University Press).

Hudec, J., Burdová, M., Kobida, L., Komora, L., Macho, V., Kogan, G., Turianica, I., Kochanová, R., Lozek, O., Habán, M., et al. (2007). Antioxidant capacity changes and phenolic profile of Echinacea purpurea, nettle (Urtica dioica L.), and dandelion (Taraxacum officinale) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. J. Agric. Food Chem. *55*, 5689–5696.

Hussain, A.I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S.T., and Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. Food Chem. *108*, 986–995.

Johnson, E.J. (2002). The role of carotenoids in human health. Nutr. Clin. Care Off. Publ. Tufts Univ. *5*, 56–65.

Jr, R.W.T., and Ferrell, K.E. (2006). Squirrels: The Animal Answer Guide (JHU Press).

Jung, U.J., Lee, M.-K., Park, Y.B., Jeon, S.-M., and Choi, M.-S. (2006). Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. *318*, 476–483.

Kang, J.-H., Liu, G., Shi, F., Jones, A.D., Beaudry, R.M., and Howe, G.A. (2010). The Tomato odorless-2 Mutant Is Defective in Trichome-Based Production of Diverse Specialized Metabolites and Broad-Spectrum Resistance to Insect Herbivores1[W][OA]. Plant Physiol. *154*, 262–272.

Khan, N., and Mukhtar, H. (2013). Tea and Health: Studies in Humans. Curr. Pharm. Des. *19*, 6141–6147.

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H. (2002). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. J. Agric. Food Chem. *50*, 2161–2168.

Kim, S.-J., Um, J.-Y., and Lee, J.-Y. (2011). Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-κB activation in mouse peritoneal macrophages. Am. J. Chin. Med. *39*, 171–181.

Kittakoop, P., Mahidol, C., and Ruchirawat, S. (2013). Alkaloids as Important Scaffolds in Therapeutic Drugs for the Treatments of Cancer, Tuberculosis, and Smoking Cessation. Curr. Top. Med. Chem. *14*, 239–252.

Kompantsev, V.A., Gaidash, P.M., and Dauksha, A.D. (1974). Phenolic compounds of the bark of Salix alba × babylonica. Chem. Nat. Compd. *10*, 839–839.

Krid, A. (2008). Thèse: Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant.

Kudriashov, B.A., Ammosova, I.M., Liapina, L.A., Osipova, N.N., Azieva, L.D., Liapin, G.I., and Basanova, A.V. (1991). [Heparin from the meadowsweet (Filipendula ulmaria) and its properties]. Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol. 939–943.

Kukric, Z., Topalic-Trivunovic, L., Kukavica, B., Matos, S., Pavicic, S., Boroja, M., and Savic, A. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (Urtica dioica L.). Acta Period. Technol. 257–272.

Lamaison, J.L., Carnat, A., and Petitjean-Freytet, C. (1990). [Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae]. Ann. Pharm. Fr. *48*, 335–340.

Larsson, S.C. (2014). Coffee, Tea, and Cocoa and Risk of Stroke. Stroke *45*, 309–314.

Lee, J., and Scagel, C.F. (2009). Chicoric acid found in basil (Ocimum basilicum L.) leaves. Food Chem. *115*, 650–656.

Lee, K.J., and Lee, S.H. (2008). Extraction behavior of caffeine and EGCG from green and black tea. Biotechnol. Bioprocess Eng. *13*, 646–649.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., and Barroso, C.G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. J. Chromatogr. A *1140*, 29–34.

Lin, J.-P., Yang, J.-S., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Wu, C.-L., Lin, J.-J., Lin, H.-L., Yang, M.-D., Liu, K.-C., Chiu, T.-H., et al. (2009). Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo. Leuk. Res. *33*, 823–828.

Liu, G., Mi, X.-N., Zheng, X.-X., Xu, Y.-L., Lu, J., and Huang, X.-H. (2014). Effects of tea intake on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials. Br. J. Nutr. *112*, 1043–1054.

Loreto, F., Mannozzi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., and Pasqualini, S. (2001). Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. Plant Physiol. *126*, 993–1000.

Lucini, L., Pellizzoni, M., Baffi, C., and Molinari, G.P. (2012). Rapid determination of lycopene and β-carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. J. Sci. Food Agric. *92*, 1297–1303.

Mahapatra, D.K., Asati, V., and Bharti, S.K. (2015a). Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives. Eur. J. Med. Chem. *92*, 839–865.

Mahapatra, D.K., Bharti, S.K., and Asati, V. (2015b). Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. Eur. J. Med. Chem. *98*, 69–114.

Mahapatra, D.K., Bharti, S.K., and Asati, V. (2015c). Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. Eur. J. Med. Chem. *101*, 496–524.

Metodiewa, D., Kochman, A., and Karolczak, S. (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. Biochem. Mol. Biol. Int. *41*, 1067–1075.

Molochko, V.A., Lastochkina, T.M., Krylov, I.A., and Brangulis, K.A. (1990). [The antistaphylococcal properties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylactic formulations for the skin]. Vestn. Dermatol. Venerol. 54–56.

Natalia Dudareva (2012). Scientists uncover last steps for benzoic acid creation in plants - PhD thesis in Purdue University.

Nikolić, D., and van Breemen, R.B. (2013). Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. Curr. Anal. Chem. *9*, 71–85.

Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., and Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in Urtica dioica extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. Food Chem. *143*, 48–53.

Otles, S., and Yalcin, B. (2012). Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. Sci. World J. *2012*.

Ouattara, N., Meda, R.N.-T., Hilou, A., Guenné, S., Konaté, K., Coulibaly, A.Y., Kiendrébeogo, M., Millogo, J.F., and Nacoulma, O.G. (2013a). Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities and HPLC-MS analysis of polyphenol from extracts of Nelsonia canescens (Lam.) Spreng. Asian Pac. J. Trop. Dis. *3*, 382–388.

Ouattara, N., Meda, R.N.-T., Hilou, A., Guenné, S., Konaté, K., Coulibaly, A.Y., Kiendrébeogo, M., Millogo, J.F., and Nacoulma, O.G. (2013b). Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities and HPLC-MS analysis of polyphenol from extracts of Nelsonia canescens (Lam.) Spreng. Asian Pac. J. Trop. Dis. *3*, 382–388.

Paiva, S.A., and Russell, R.M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. J. Am. Coll. Nutr. *18*, 426–433.

Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (2004). Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (Foeniculum vulgare) Using Liquid Chromatography−Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. *52*, 3679–3687.

Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Lebovka, N., and Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. Food Chem. *192*, 842–848.

PCM, J., and D, C. (2005). Prota : Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3: colorants et tanins — AgriCultures Network. Ed. PROTA Foundation. ISBN: 90 5782 164 8

Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., and Romani, A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of Urtica dioica L. J. Agric. Food Chem. *56*, 9127–9132.

Pingret, D., Durand, G., Fabiano-Tixier, A.-S., Rockenbauer, A., Ginies, C., and Chemat, F. (2012). Degradation of Edible Oil during Food Processing by Ultrasound: Electron Paramagnetic Resonance, Physicochemical, and Sensory Appreciation. J. Agric. Food Chem. *60*, 7761–7768.

Poukens-Renwart, P., Tits, M., Wauters, J.N., and Angenot, L. (1992). Densitometric evaluation of spiraeoside after derivatization in flowers of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. J. Pharm. Biomed. Anal. *10*, 1085–1088.

Prencipe, F.P., Brighenti, V., Rodolfi, M., Mongelli, A., dall' Asta, C., Ganino, T., Bruni, R., and Pellati, F. (2014). Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in Humulus lupulus L. J. Chromatogr. A *1349*, 50–59.

Qi, X.-L., Peng, X., Huang, Y.-Y., Li, L., Wei, Z.-F., Zu, Y.-G., and Fu, Y.-J. (2015). Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from Equisetum palustre L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. Ind. Crops Prod. *70*, 142–148.

Qiu, S., Sun, H., Zhang, A.-H., Xu, H.-Y., Yan, G.-L., Han, Y., and Wang, X.-J. (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. Chin. J. Nat. Med. *12*, 401–406.

Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., and Reddy, B.V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. Mol. Cell. Biochem. *349*, 11–19.

Rather, M.A., Dar, B.A., Sofi, S.N., Bhat, B.A., and Qurishi, M.A. (2012). Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arab. J. Chem.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., and Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food Microbiol. *56*, 3–12.

Reiter, R., and Robinson, G. (1995). Where Do Free Radicals Come From? Melatonin (Ed. Newnes Bantam Book, USA). ISBN: 9780124059368.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., and Khalel, K.I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare L.) and chamomile (Matricaria chamomilla L.). Ind. Crops Prod. *44*, 437–445.

Rosa, N.N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., and Micard, V. (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. J. Cereal Sci. *57*, 84–90.

Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R.P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Grimi, N., and Barba, F.J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. Trends Food Sci. Technol. *45*, 296–310.

Rosenthal, G.A. (2001). l-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical. Amino Acids *21*, 319–330.

Cavalcanti, R.N., and Forster-Carneiro, M.T. (2013). Natural Product Extraction: Principles and Applications. Ed. Rostagno and Prado, Royal Society of Chemistry.

Russo, P., Frustaci, A., Del Bufalo, A., Fini, M., and Cesario, A. (2013). Multitarget Drugs of Plants Origin Acting on Alzheimer's Disease. Curr. Med. Chem. *20*, 1686–1693.

Salama, Z.A., El Baz, F.K., Gaafar, A.A., and Zaki, M.F. (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (Foeniculum vulgare Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. J. Saudi Soc. Agric. Sci. *14*, 91–99.

Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., and Bovy, A.G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. Phytochemistry *65*, 2631–2648.

Schiller, H., Forster, A., Vonhoff, C., Hegger, M., Biller, A., and Winterhoff, H. (2006). Sedating effects of Humulus lupulus L. extracts. Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm. *13*, 535–541.

Schimidt, S. (2014). Bach-Blüten für innere Harmonie (Ed.Wilkommen im Leben). ISBN: 978-3833819483.

Schmid, B., Lüdtke, R., Selbmann, H.-K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., and Heide, L. (2001). Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. Phytother. Res. *15*, 344–350.

Sharkey, T.D., Chen, X., and Yeh, S. (2001). Isoprene Increases Thermotolerance of Fosmidomycin-Fed Leaves. Plant Physiol. *125*, 2001–2006.

Sicaire, A.-G., Vian, M.A., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., and Chemat, F. (2016). Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. Ultrason. Sonochem.

Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., and Arora, S. (2010). Umbelliferone – An antioxidant isolated from Acacia nilotica (L.) Willd. Ex. Del. Food Chem. *120*, 825–830.

Smith, R.M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. J. Chromatogr. A *1000*, 3–27.

Sroka, Z., Cisowski, W., Seredyńska, M., and Łuczkiewicz, M. (2001). Phenolic Extracts from Meadowsweet and Hawthorn Flowers Have Antioxidative Properties. Z. Für Naturforschung C *56*, 739–744.

Stanojevic, L., Stankovic, M., Nikolic, V., Nikolic, L., Ristic, D., Canadanovic-Brunet, J., and Tumbas, V. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of Hieracium pilosella L. Extracts. Sensors *9*, 5702–5714.

Stenberg, J.A., Witzell, J., and Ericson, L. (2006). Tall herb herbivory resistance reflects historic exposure to leaf beetles in a boreal archipelago age-gradient. Oecologia *148*, 414–425.

Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., and Flatt, P.R. (1989). Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. Acta Diabetol. Lat. *26*, 51–55.

Taie, H.A.A., Salama, Z.A.-E.R., and Radwan, S. (2010). Potential Activity of Basil Plants as a Source of Antioxidants and Anticancer Agents as Affected by Organic and Bio-organic Fertilization. Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca *38*, 119–127.

Tanaka, Y., Tsuda, S., and Kusumi, T. (1998). Metabolic Engineering to Modify Flower Color. Plant Cell Physiol. *39*, 1119–1126.

Tang, L., and Kebarle, P. (1993). Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. Anal. Chem. *65*, 3654–3668.

Tang, J., Zheng, J.-S., Fang, L., Jin, Y., Cai, W., and Li, D. (2015). Tea consumption and mortality of all cancers, CVD and all causes: a meta-analysis of eighteen prospective cohort studies. Br. J. Nutr. *114*, 673–683.

Turner, B.L., and Harborne, J.B. (1967). Distribution of canavanine in the plant kingdom. Phytochemistry *6*, 863–866.

Urbain, A., 2007. Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de Gentianella campestris (L.) Börner et Gentianella amarella (L.) Börner ssp. acuta (Michx.) J.M.Gillett (Gentianaceae), et Peucedanum ostruthium (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat à la Faculté des sciences de l'Université de Genève, p 29.

Vankar, P.S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. Resonance *9*, 30–41.

Vats, V., Grover, J.K., and Rathi, S.S. (2002). Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of Trigonella foenum-graecum Linn, Ocimum sanctum Linn and Pterocarpus marsupium Linn in normal and alloxanized diabetic rats. J. Ethnopharmacol. *79*, 95–100.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., and Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. *9*, 161–169.

Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M., and Fico, G. (2011). Phenolic compounds from Achillea millefolium L. and their bioactivity. Acta Biochim. Pol. *58*, 203–209.

Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., Mot, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., and Tilea, I. (2014). Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys. Molecules *19*, 5490–5507.

Walde, S.G., Balaswamy, K., Velu, V., and Rao, D.G. (2002). Microwave drying and grinding characteristics of wheat (Triticum aestivum). J. Food Eng. *55*, 271–276, 14 ref.

Wang, Y., Shi, X., and Qi, Z. (2010). Hypericin prolongs action potential duration in hippocampal neurons by acting on K+ channels. Br. J. Pharmacol. *159*, 1402–1407.

Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., and Ono, M. (2009). In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (Humulus lupulus) addressing acne vulgaris. Phytomedicine *16*, 369–376.

Yang, J., Guo, J., and Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. LWT - Food Sci. Technol. *41*, 1060–1066.

Zanoli, P., and Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. J. Ethnopharmacol. *116*, 383–396.

Zhao, F., Watanabe, Y., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K., and Kitanaka, S. (2004). Prenylflavonoids and Phloroglucinol Derivatives from Hops (Humulus lupulus). J. Nat. Prod. *68*, 43–49.

Zhao, X., Zhu, H., Zhang, G., and Tang, W. (2015). Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. Powder Technol. *286*, 838–844.

Partie II :

Travaux réalisés

Chapitre I : Analyses chimiques

La mise au point des protocoles d'analyse ainsi que leur adaptation au matériel utilisé durant toute notre étude ont été réalisées sur des échantillons de poudres de feuilles de thé vert séchées obtenu par PTC, afin de trouver les meilleurs paramètres à appliquer pour la production des poudres superfines ont été sélectionnés à partir d'une étude menée sur des échantillons de feuilles de thé verts séchées (Zaiter et *al*., 2016) Annexe 3.

Nous avons utilisé des échantillons de feuilles séchées de thé vert comme modèle pour mettre au point notre méthodologie d'analyse. Cette méthode consiste à doser les polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et à déterminer l'activité biologiques puis à quantifier les principes actifs extraits des différentes classes granulométriques des plantes pour ensuite les comparer à des échantillons des plantes qui n'ont pas subi la procédure PTC. L'identification et la quantification sont réalisées par comparaison des temps de rétention, de la surface des pics et la masse molaire des principes actifs de nos échantillons à ceux des étalons commerciaux correspondants, dont la qualité est de grade analytique. Les composés actifs sont choisis pour chaque plantes d'après la bibliographie effectuée dans la première partie. Dans certains cas, nous nous sommes également intéressés à des composés non décrits dans la littérature. En annexe 2 sont rassemblés l'ensemble des étalons utilisés dans ce travail.

1 Préparation des échantillons

1.1 Préparation des poudres

Le broyeur ultracentrifuge utilisé est le modèle Retsch ZM 200 (Haan, Allemagne), d'une capacité de 900 mL avec un tamis annulaire de 1 mm et une vitesse de broyage variable. L'ultra-centrifuge ZM 200 est un broyeur à rotor à grande vitesse de haute performance ainsi qu'une tamiseuse Fritsch Analysette 3 Spartan (Idar-Oberstein · Allemagne) en mode vibrationnel d'une amplitude de 0,5 mm, ont été utilisés.

Les plantes séchées ont été broyées à une vitesse de 12 000 rpm. Cette vitesse est un compromis entre la finesse des poudres et la protection des principes actifs. Les poudres ont ensuite été tamisées en mode vibration permanente pendant 10 min. Les fractions granulométriques qui suivent ont été récupérées : (1) > 500 µm, (2) 315 - 500 µm ; (3) 180 -

315 µm ; (4) 100 - 180 µm ; (5) 50 - 100µm ; (6) 20 - 50 µm et (7) < 20 µm. Les poudres produites ont été conservées sous vide afin de limiter les interactions avec l'environnement.

Les poudres ont été produites à partir de différentes parties de plantes :

- Parties aériennes tiges, feuilles et fleurs du millepertuis, de l'ortie, du millefeuille, de la piloselle et de la scrofulaire ;
- Fruits du rosier des chiens, du houblon et le fenouil ;
- Feuilles du lierre et du basilic ;
- Ecorce du saule blanc.

1.2 Méthodes d'extraction

1.2.1 Extraction des composés phénoliques

Deux grammes de matériel végétal sont introduits dans 20 mL d'une solution méthanol/eau (70/30). Le mélange macère sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. L'agitation a un rôle important dans l'extraction des composés actif par les solvants, car il permet d'augmenter le contact entre la matrice végétale et les solvants ce qui aide à la destruction de cette matrice et des cellules qui contiennent les produits actifs. D'après Ćujić et al. (2016), la macération est une méthode d'extraction douce et efficace. L'extrait recueilli est centrifugé (4000 rpm) pendant 20 minutes, le surnageant obtenu est filtré et stocké au frais (4°C), dans des Vials en verre fumé (Roby et al., 2013).

1.2.2 Extraction des huiles essentielles

Pour extraire les huiles essentielles, nous effectuons une macération au dichlorométhane. Pour cela nous pesons 2 g de chaque échantillon pour chaque granulométrie auxquels nous ajoutons 20 mL de solvant. Nous laissons les préparations sous agitation pendant 24h. Après filtration le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu huileux est stocké à 4°C.

2 Screening

Un screening a tout d'abord été réalisé pour évaluer la richesse en métabolites secondaires des extraits des 12 plantes. Ces tests préliminaires permettent de révéler la présence des familles de métabolites secondaires.

- Polyphénols : 1 à 2 gouttes de chlorure ferrique dilué à 1% est ajouté à 5 ml d'extrait hydroalcoolique, le virage à la couleur bleu-vert de la solution indique la présence de polyphénols (Saba.T. Hashim, 2013).
- Flavonoïdes : (test de Shinoda), 1 gramme de copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré sont additionné à 2 ml d'extrait organique. La coloration rose ou rouge de la solution indique la présence de flavonoïdes.
- Tannins : 1 ml d'une solution de chlorure ferrique dilué à 5% est ajouté à 5 ml d'extrait organique l'apparition d'un précipité verdâtre sombre indique la présence de tanins.
- Alcaloïdes : (Test de Dragendorff), à une solution de 2 ml d'extrait organique et 0,2 ml d'une d'acide chlorhydrique à 1% sont ajoutés deux gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orange de la solution est la preuve de la présence d'alcaloïdes (N'Guessan et al., 2009).
- Stéroïdes et terpènes/ (Test de Liebermann), 2 ml de l'extrait au dichlorométhane sont ajoutés à une solution de 2 ml de chloroforme et 2 ml d'acide acétique puis refroidie dans de la glace. Si L'ajout d'acide sulfurique entraine un changement de coloration du violet au bleu-vert cela indique la présence de terpénoïdes ou de noyaux stéroïdiens.
- Saponines : 5 ml d'extrait dans 5ml d'eau distillée sont vigoureusement secoués. L'apparition d'une mousse qui persiste pendant au moins 15 min affirme la présence de saponines.

3 Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante

3.1 Méthodes d'analyse

La spectrométrie UV-Visible sera utilisée dans le cas des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et tannins totaux mais également pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

Un spectrophotomètre est un instrument utilisé pour mesurer les propriétés de la lumière sur une partie spécifique du spectre électromagnétique, typiquement utilisé dans l'analyse spectroscopique pour identifier les matériaux (Butler and Laqua, 2009).

La spectrophotométrie est utilisée pour mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible. La spectrophotométrie par absorption UV-visible peut être utilisée pour réaliser des mesures quantitatives. L'absorbance des composés est exploitée en analyse quantitative par l'application de la loi de Beer-Lambert :

$$A = Log\ ({}^{I_0}/_{I)} = \varepsilon . L . C$$

- A : Absorbance exprimé en unité arbitraire (u.a.),
- I_0 : Intensité lumineuse incidente,
- I : Intensité lumineuse transmise par l'échantillon,
- ε: Coefficient d'extinction molaire,
- L : Largeur de la cuve,
- C : Concentration de la solution.

3.1.1 Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux se fait en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu par la méthode décrite par Muchuweti et al. (2006) avec de légères modifications.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) dont la réduction par les polyphénols conduit à la formation d'un complexe molybdène (Mo_8O_{23})—tungstène (W_8O_{23}) de couleur bleu stable qui absorbe fortement à une longueur d'onde de 760 nm. Le composé de référence utilisé dans cette méthode est l'acide gallique. La coloration

de la solution à 760 nm est proportionnelle à la quantité d'acide gallique choisi comme étalon ou de polyphénols présents dans l'extrait.

L'extrait de plante (200 µL) suffisamment dilué est introduit dans un tube contenant initialement 4,5 mL de méthanol puis complété à 5 mL avec du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 min, une solution de Na_2CO_3 à 7% (5 mL) est ajoutée sous agitation. La solution est immédiatement diluée avec 2mL l'eau distillée puis mélangée vigoureusement. Après un temps d'incubation de 60 min à 23 °C, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible SCAN.50 spectrophotomètre, par rapport à une solution 100 % méthanol.

A partir de solutions de différentes concentrations en acide gallique, suivant le protocole décrit ci-dessus, on obtient les absorbances correspondantes à chacune des concentrations ce qui nous permet de tracer une courbe d'étalonnage, absorbance en fonction de la concentration en acide gallique. Le coefficient de corrélation R^2 obtenu est de 99%. A partir de cette courbe d'étalonnage, la teneur des composées phénoliques est exprimée en équivalents de mg d'acide gallique (GAE) par gramme de matière sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

3.1.2 Flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont dosés par colorimétrie (Chen and Chen, 2011), cette méthode a été légèrement modifiée par Wafa et al. (2014). Le test consiste en l'introduction de 250 µL d'échantillon de plante dans un tube à essai contenant 1 mL d'eau distillée. A un temps t=0 min, 75 µL de nitrite de sodium à 2,5% est ajouté au tube. Ensuite, au temps t=5 min, 75 µL de chlorure d'aluminium à 10% est également ajouté au tube. Et après 6 min, 500 µL d'une solution à 1 N d'hydroxyde de sodium est ajoutée au mélange. Puis le mélange est dilué avec 2,5 mL d'eau distillée. Le mécanisme de la coloration de la réaction est expliqué par (Zhu et al., 2009).

Les réactifs sont des solutions incolores de nitrite de sodium ($NaNO_2$, 5%) et chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 10%). La réaction d'oxydation des flavonoïdes entraîne la formation d'un complexe qui absorbe à 510 nm. Le dosage est une comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

Une courbe d'étalonnage de l'absorbance des solutions mesurée à 510 nm est élaborée en fonction de la concentration en catéchine des solutions. Le coefficient de corrélation R^2 obtenu est de 99%.

Une gamme étalon adaptée à la concentration en flavonoïdes, est préalablement préparée à partir d'une solution de catéchine pour chacune de nos plantes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (EC/g MS), tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

3.1.3 Dosage des tannins

En milieu acide, les tanins condensés réagissent avec la vanilline et entraînent une coloration verte de la solution. Les tanins condensés ont été dosés par colorimétrie par la méthode décrite (Djeridane et al., 2006), Au cours de cette réaction, la vanilline va réagir avec les tannins condensés pour donner des complexes colorés qui absorbent à 500 nm (Scalbert, 1992). Pour 0,2-1 mL d'extrait, 5 mL de 0,5% de réactif de vanilline ont été ajoutés ; un volume de 5 mL de 4% de HCl concentré dans du méthanol a été utilisé comme témoin à blanc. L'absorbance des échantillons et du blanc ont été lu à 500 nm après repos pendant 20 min à température ambiante, toutes les solutions ainsi que les blancs sont préparés dans les mêmes conditions. Les tubes obtenus sont de nouveau incubés à 35°C. 3,5 moles d'eau par mole de catéchine a été utilisé comme étalon dans ces expériences. Le dosage des quantités de TC est réalisé à partir d'une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en catéchine. La courbe d'étalonnage présente un coefficient de corrélation de 97,32%. La teneur en tannin condensé est exprimée en équivalents de catéchine mg par g de matière sèche.

3.1.4 Activité antioxydante

Dans cette partie, nous allons décrire les différentes méthodes mises au point afin d'évaluer la capacité antioxydante de nos échantillons. Pour cela, deux tests ont été utilisés.

3.1.4.1 Test ABTS

On a utilisé le protocole expérimental développé par (Djeridane et al., 2006) (Muanda et al., 2011) avec de petites modifications. Une solution contenant 1 mM d'AAPH ainsi que 2,5

mM d'ABTS est ajoutée à une solution tampon contenant 100 mM de phosphate de potassium (pH 7,4) et 150 mM de NaCl. Le mélange est chauffé à 68 °C pendant 30 min. La concentration du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ de couleur bleu vert est ajustée à 0,62 ± 0,02 à 734 nm. Un échantillon de 60 µL d'extrait de la plante est ajouté à 2,94 mL de la solution d'$ABTS^{\bullet+}$.

Le mélange est placé dans l'obscurité et incubé dans un bain d'eau à 37 °C durant 30 min. Ensuite, la diminution de l'absorbance à 734 nm est mesurée.

Cette absorbance est reportée sur une gamme étalon établie avec du trolox. Les conditions expérimentales ont été répété trois fois.

$$\underset{\text{(Incolore)}}{ABTS + AAPH} \longleftrightarrow \underset{\text{(Bleu- vert)}}{ABTS^{\bullet+}}$$

$$\underset{\text{Donneur de H}}{ABTS^{\bullet+} + trolox} \longleftrightarrow \underset{\text{(Incolore)}}{ABTS^{+}}$$

Le mécanisme de fonctionnement de l'ABTS durant le dosage, la solution ABTS incolore vire au bleu-vert lorsqu'il est oxydé en $ABTS^{\bullet+}$ par le 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH).

L'antioxydant (Trolox) réduit le radical cation $ABTS^{\bullet+}$ (bleu-vert) en un cation ABTS+, ce qui décolore la solution. La décroissance de DO (734 nm) reflète la capacité de capture du radical libre par l'antioxydant.

La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des absorbances en fonction des différentes concentrations de trolox. La courbe présente une corrélation R^2=0,9807, les résultats obtenus sont exprimés en équivalent trolox par gramme de matière sèche (EqT/g MS) (figure 29). Compte tenu de l'instabilité des réactifs à utiliser ceux-ci doivent être préparés quotidiennement.

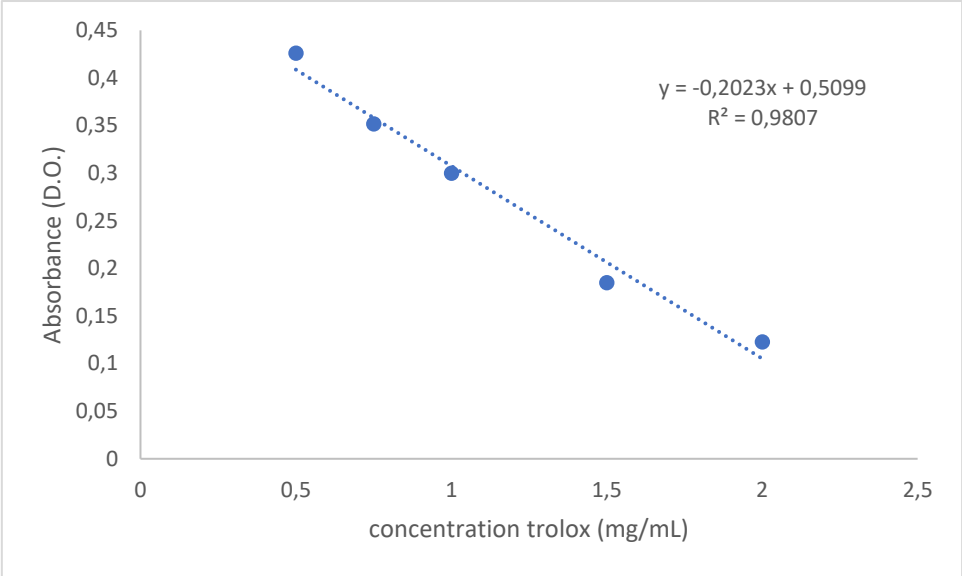


Figure 29 : Etalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en trolox.

3.1.4.2 Test DPPH

On a utilisé le protocole expérimental développé par (Floegel et al., 2011) avec de petites modifications. Une solution de 200 µM de DPPH a été préparée dans du méthanol. Le mélange est gardé à l'abri de la lumière. Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, le DPPH est un radical libre de couleur violette qui est réduit en un composé jaune par des composés anti-radicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont nous souhaitons déterminer l'activité.

Ensuite dans un tube à essai, 2,90 mL de la solution de DPPH sont ajoutés à 100 µL à l'extrait de plante. La solution est agitée et incubée à l'obscurité à 37°C pendant 20 min. Après incubation, l'absorbance de la solution est lue à 517 nm. Pour le contrôle, une solution constituée de 2,90 mL de DPPH (200 µM) et 100 µL de méthanol sont utilisées.

L'absorbance est reportée sur une gamme étalon établie avec du trolox les conditions expérimentales ont été réalisées en trois répétitions.

DPPH + AH (antioxydant) ←→ DPPHH + A (forme réduite: coloration jaunâtre)

La décroissance de la DO mesurée reflète la capacité de capture du radical libre de l'antioxydant. Capacité exprimée en Eq. Trolox par gramme de matière sèche.

Les échantillons, les étalons et le blanc sont préparés dans des conditions similaires. Après 30 minutes, la décroissance de l'absorbance est mesurée au

spectrophotomètre UV à 517 nm. Le trolox est préparé à partir d'une solution mère de 2 g/L. Compte tenu de l'instabilité des réactifs à utiliser ceux-ci sont préparés à nouveau avant chaque étude. On a utilisé le trolox à la place de la vitamine C pour sa meilleur stabilité face au lumière et à l'oxygène, Nojavan et al., 2008 ont montré qu'après 5 jours l'acide ascorbique perd 30% de sa teneur initiale. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des absorbances en fonction des différentes concentrations de trolox. La courbe présente une corrélation R^2=0,9925, les résultats obtenus sont exprimés en équivalent trolox par gramme de matière sèche (EqT/g MS) (figure 30).

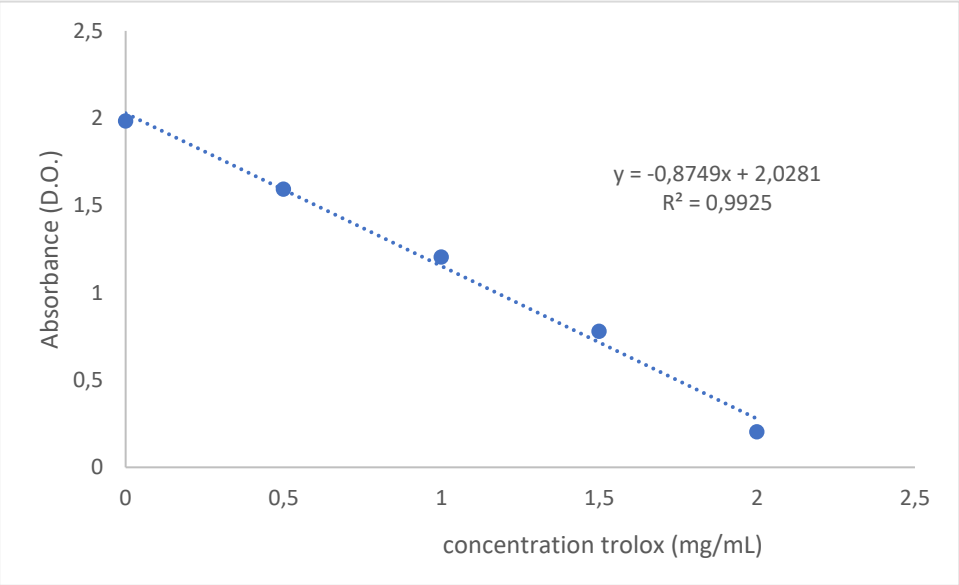


Figure 30 : étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en trolox.

3.1.5 Calculs statistiques

Toutes les expériences sont répétées trois fois. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± l'écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel SAS (v8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les valeurs moyennes sont comparées en utilisant le test *t* de Student et considérées avec $p < 0,05$ comme significatives.

4 Résultats

4.1 Screening

Le screening a pour but d'orienter les travaux vers les familles moléculaires effectivement présentes chez les plantes étudiées (polyphénols, flavonoïdes, tannins, saponines, alcaloïdes et terpènes). Les résultats du screening sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1: le screening des plantes etudies pour 6 familles des composes actifs. "-" absence, "+/-" trace, " +" faible quantite, "++" presence et "+++" forte presence de la famille.

Plantes	Partie de plante	Polyphénols	Flavonoïdes	Tannins	Saponines	Alcaloïdes	Terpènes
Reine-des-prés	fleurs	+++	+++	+++	-	+/-	-
Millepertuis	parties aériennes	+++	++	+++	-	-	-
Saule blanc	écorce	+++	++	++	-	-	-
Basilic	feuilles	++	+	++	-	-	++
Houblon	Fleurs, feuilles	++	+	+	+/-	-	++
Lierre grimpant	parties aériennes	++	++	+	+	+/-	+
Millefeuille	parties aériennes	++	++	+	-	-	-
Piloselle	parties aériennes	++	++	+	-	-	-
Fenouil	graine	+	+	-	-	-	++
Ortie	parties aériennes	+	+	++	-	-	-
Scrofulaire noueuse	parties aériennes	+	+	++	-	-	-
Rosier des chiens	fruit	+	+	+	-	-	-

Il apparait que les 12 plantes sélectionnées possèdent toutes des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins à l'exception du fenouil pour lequel le test de caractérisation des tannins s'est avéré négatif. La reine-des-prés et le millepertuis montrent une forte quantité de polyphénols et flavonoïdes. En plus des polyphénols, le basilic, les graines de fenouil et les fleurs de houblon contiennent des terpènes. Des alcaloïdes ont été détectés à l'état de trace chez le lierre grimpant et la reine-des-prés. A noter également de faibles quantités de saponines pour le lierre grimpant.

4.2 Dosages et activité antioxydante des 12 plantes

Cette partie détaille les résultats obtenus pour le dosage de la teneur en : polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tannins totaux ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des différentes parties de plantes étudiées.

4.2.1 Echantillons non broyés

4.2.1.1 Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés

Les résultats obtenus sont rassemblés en figure 31, les valeurs sont exprimées en équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche pour les polyphénols totaux et en équivalent de catéchine par gramme de matière sèche pour les flavonoïdes totaux ainsi que pour les tannins condensés.

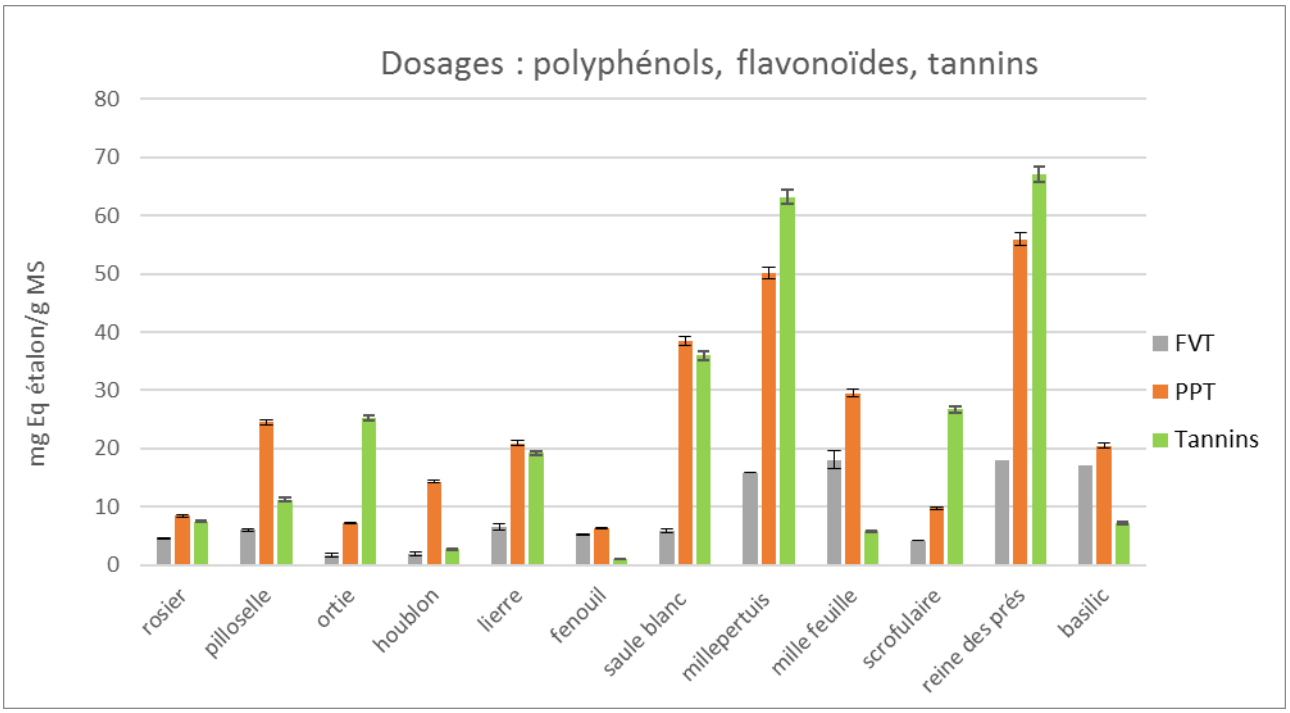


Figure 31 : Dosages des polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tannins condensés réalisés pour les 12 plantes sélectionnées.

Cet histogramme montre que la reine-des-prés est la plus riche en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins avec 55,9 mg EAG/g MS, 18,02 mg ECAT/g MS et 67,12 mg ECAT/g MS respectivement. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des fruits du rosier des chiens, des feuilles d'ortie, ainsi que celles des graines de fenouil sont très faibles. Cependant, il est important de noter une forte teneur en tannins condensé chez l'ortie (25,26 mg ECAT/g MS) à l'inverse du fenouil pour lequel les tannins sont absents. Ces résultats sont conformes à ceux reportés dans la partie bibliographique lors de la description des composés d'intérêt de chacune des plantes.

4.2.1.2 Activité antioxydante

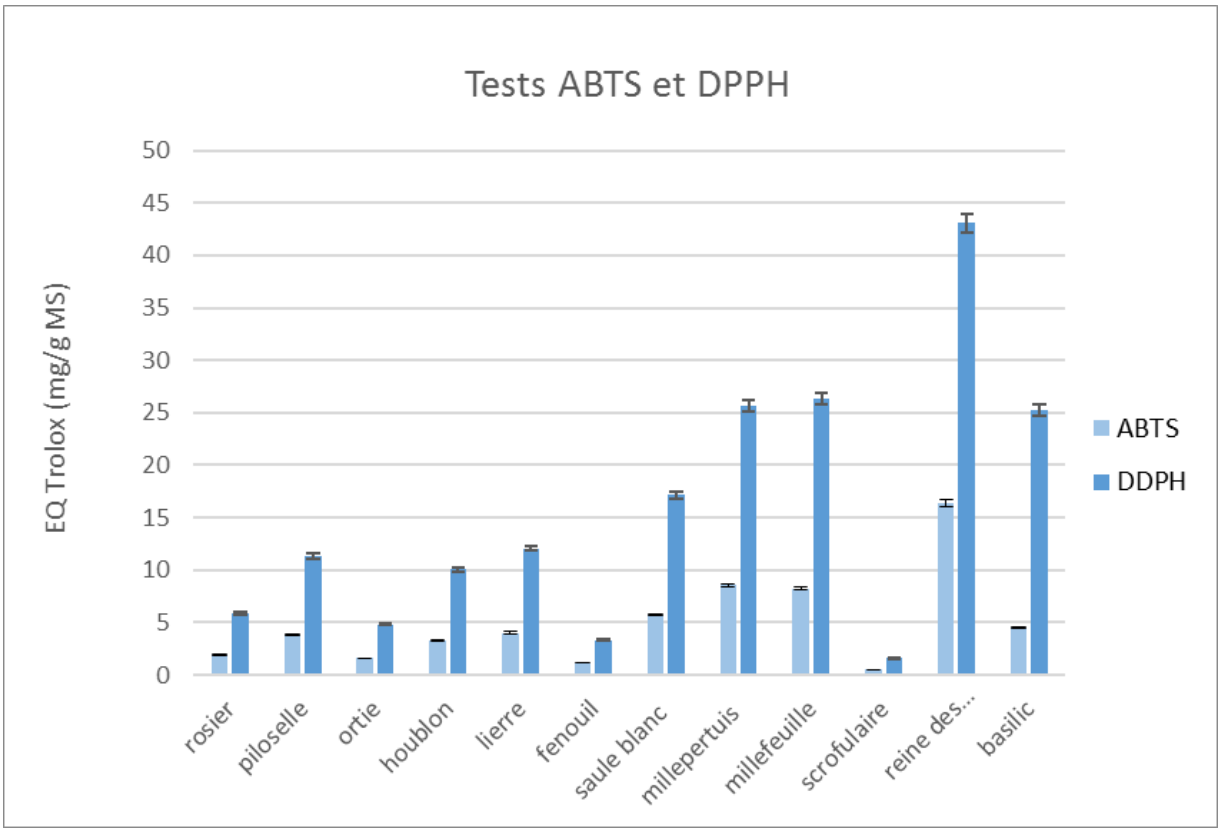


Figure 32 : Evaluation de l'activité antioxydante (tests ABTS et DPPH)

Pour évaluer cette activité deux tests ont été effectués : l'un avec de l'ABTS et l'autre avec du DPPH. Les résultats obtenus par les deux méthodes suivent la même tendance. Cependant, les valeurs obtenues avec le test ABTS sont plus basses, car dans les solvants organiques la solubilité du sel ABTS est beaucoup plus faible (méthanol-eau 70/30). Les résultats sont exprimés en équivalent de trolox par gramme matière sèche (mg ET/g MS) et sont reportés dans la figure 32. L'activité la plus forte est relevée pour la reine-des-prés, avec 43,0 et 16,41 mg ET/g MS lors des tests au DPPH et à l'ABTS respectivement. Le test dans le DPPH du basilic, du saule blanc, du millefeuille et millepertuis révèle une activité antioxydante relativement importante : 25,2 ; 17,1 ; 27,9 et 26,0 mg ET/g MS respectivement.

Pour les 12 plantes, ces résultats ont permis d'établir une corrélation positive entre les quantités de polyphénols totaux, les quantités de flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante avec des coefficients de corrélation de 0,88 et 0,91 respectivement.

4.2.2 Echantillons des poudres superfines (fractions granulométriques)

Ci-dessous, sont rapportés plante par plante, les dosages en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux ainsi que l'activité antioxydante des différentes poudres superfines en fonction de leur classe granulométrique. Les valeurs enregistrées seront comparées à celle d'un échantillon broyé non tamisé.

4.2.2.1 Reine-des-prés

Le broyage des fleurs de la reine-des-prés conduit à l'obtention de poudres à l'aspect légèrement granuleux. Les teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et leur activité antioxydante sont rassemblées dans l'histogramme qui suit.

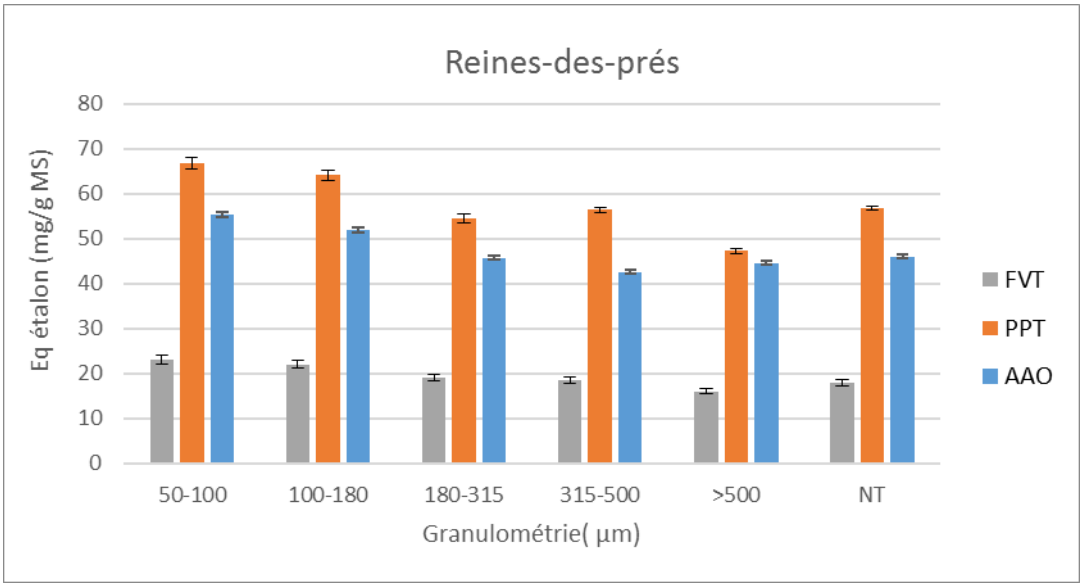


Figure 33 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Cet histogramme montre que l'activité antioxydante des différentes fractions granulométriques sont directement corrélées aux teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux. Les valeurs maximales sont enregistrées pour les poudres les plus fines (50-100 µm). L'analyse de la fraction 100-180 µm donne des résultats très proches de ceux de la fraction inférieure. Le non tamisé donne des valeurs supérieures à celle dont la taille de particules est supérieure à 500 µm. Ces résultats indiquent clairement que le procédé PTC enrichit les fractions les plus fines.

4.2.2.2 Millepertuis

Le broyage des parties aériennes (tiges, feuilles, et fleurs) du millepertuis donne des poudres qui ont un aspect légèrement fibreux.

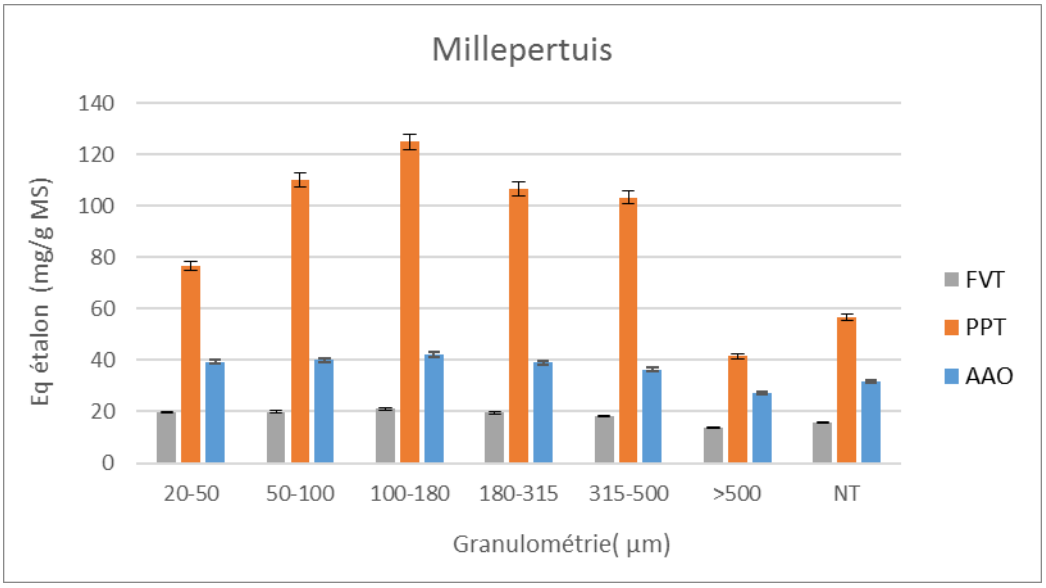


Figure 34 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Cet histogramme montre de grandes différences des teneurs en polyphénols totaux en fonction de la granulométrie avec une valeur maximale (125,1 mg GAE / g MS) pour la fraction 100-180 µm. De plus, la taille de particules supérieures à 500 µm donne une valeur (41,67 mg GAE / g MS) inférieure à celle de l'échantillon non tamisé (56,67 mg GAE / g MS). Il apparait que les teneurs en flavonoïdes et l'activité antioxydante suivent la même tendance avec une différence moins importante entre les différentes fractions à l'exception de la fraction supérieure à 500 µm qui est inférieur à l'échantillon non tamisé.

Ces résultats indiquent que le procédé de fractionnement différentiel influe positivement sur l'enrichissement en polyphénols.

4.2.2.3 Saule blanc

L'aspect des poudres obtenues après le broyage de l'écorce du saule blanc est fibreux.

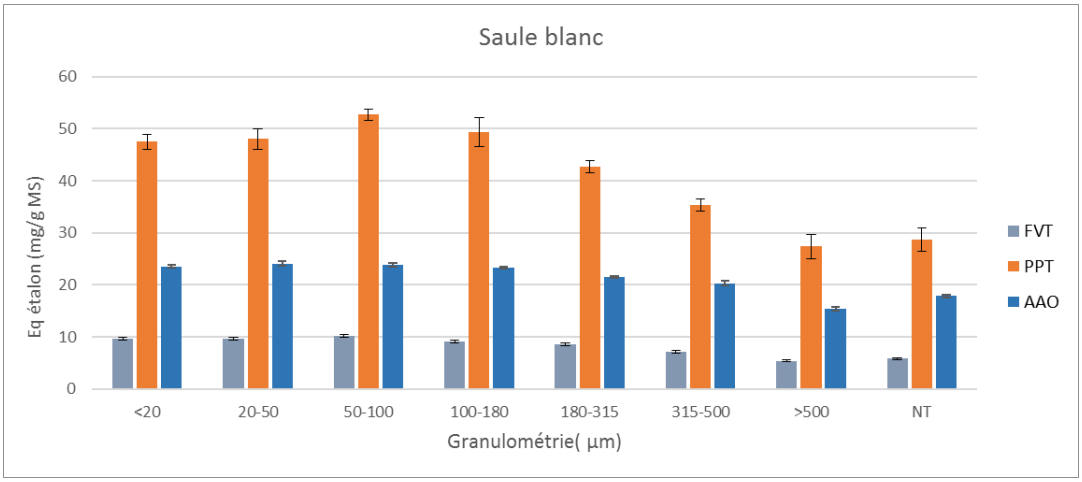


Figure 35 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

L'évolution des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des poudres en fonction de leurs granulométries suit la même tendance et elle indique que les fractions les plus petites sont les plus riches. Les valeurs maximales sont atteintes pour les fractions 50-100 µm et 100-180 µm en polyphénols : 53,6 et 45,3 mg GAE/g MS respectivement et en flavonoïdes : 10,17 et 9,13 mg ECAT/g MS respectivement. Une corrélation positive (r^2=0,74) obtenue entre l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes totaux. Ces résultats montrent l'efficacité du procédé de broyage/tamisage dans l'amélioration de la teneur en polyphénols dans les échantillons de poudre, la plante non tamisée présentant une plus faible teneur, à l'exception de la fraction> 500 µm, encore inférieur à cet échantillon référence. L'enrichissement également pour les flavonoïdes se trouve dans la fraction 50-100 µm (10,17 mg ECAT / g MS) et la fraction > 500 contient moins des flavonoïdes (5,39 mg ECAT / g MS).

4.2.2.4 Basilic

Dans le cas du basilic, les feuilles séchées sont broyées et tamisées, les poudres résultantes présentent un aspect granuleux.

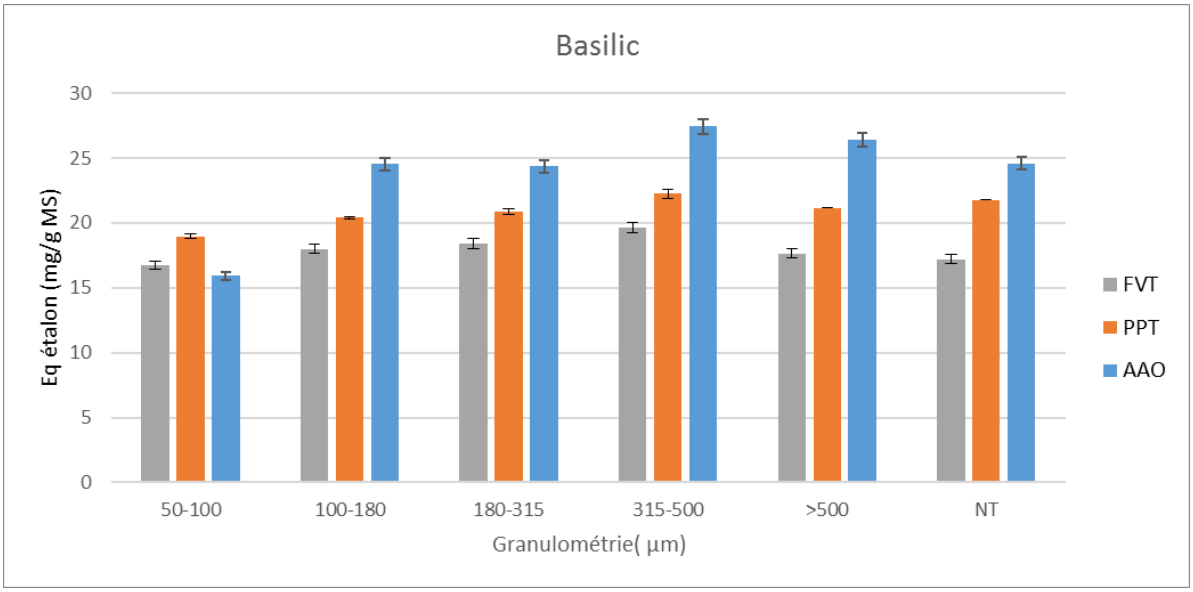


Figure 36: Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

L'histogramme montre des variations significatives entre les fractions 50-100 et 315-500 µm de poudres. Les teneurs maximales en polyphénols totaux (22,25 mg EGA/ g MS) et en flavonoïdes totaux (19,64 mg ECAT/g MS) sont atteintes dans la fraction 315-500 µm. Les valeurs les plus faibles, qui sont inférieures à l'échantillon non tamisé, sont obtenues pour la fraction 50-100 µm. Nous observons Une faible différence de teneur en polyphénols totaux entre les différentes fractions granulométriques entre 100-180 et supérieur à 500 µm avec le non tamisé.

L'échantillon non tamisé manifeste une activité antioxydante plus faible (24,58 mg Eq trolox / g MS) que celle des fractions tamisées, à l'exception de la fraction 50-100 µm pour laquelle elle tombe à 15,93 mg Eq trolox / g MS. De plus, on peut noter que l'activité antioxydante est fortement corrélée à la teneur en flavonoïdes ce qui confirme que leur action sur l'activité antioxydante est plus intense que celle des polyphénols.

4.2.2.5 Houblon

Pour cette plante les échantillons traités sont les fleurs et les feuilles. Après le passage par le procédé PTC les poudres ont un aspect fibreux.

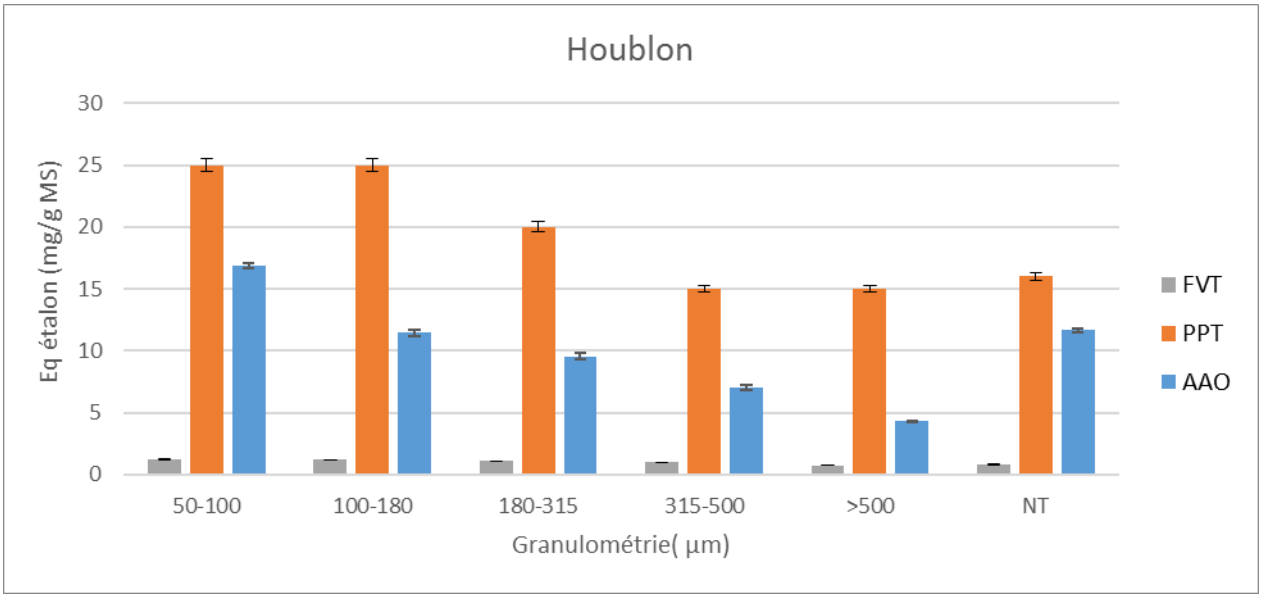


Figure 37 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Cet histogramme indique clairement que la teneur en flavonoïdes totaux est faible. La variation de la teneur en polyphénols totaux en fonction des classes granulométrie montrent que les fractions les plus fines sont le plus riches (25 mg EAG / MS) et que leur activité antioxydante est la plus grande (16,8 mg Eq trolox / g MS). A l'inverse pour la granulométrie la plus élevée (500 µm), l'activité antioxydante est 4 fois plus petite (4.3 mg Eq trolox / g MS). Par rapport à la classe granulométrique 50-100 µm, l'échantillon non tamisé montre une activité faible. Une corrélation positive est observée entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux.

Ces résultats montrent l'intérêt du procédé PTC pour l'extraction différentielle des polyphénols des fleurs et des feuilles du houblon.

4.2.2.6 Lierre grimpant

Les feuilles du lierre grimpant ont été utilisées pour la fabrication des différentes fractions granulométriques de poudres révèle un aspect granuleux.

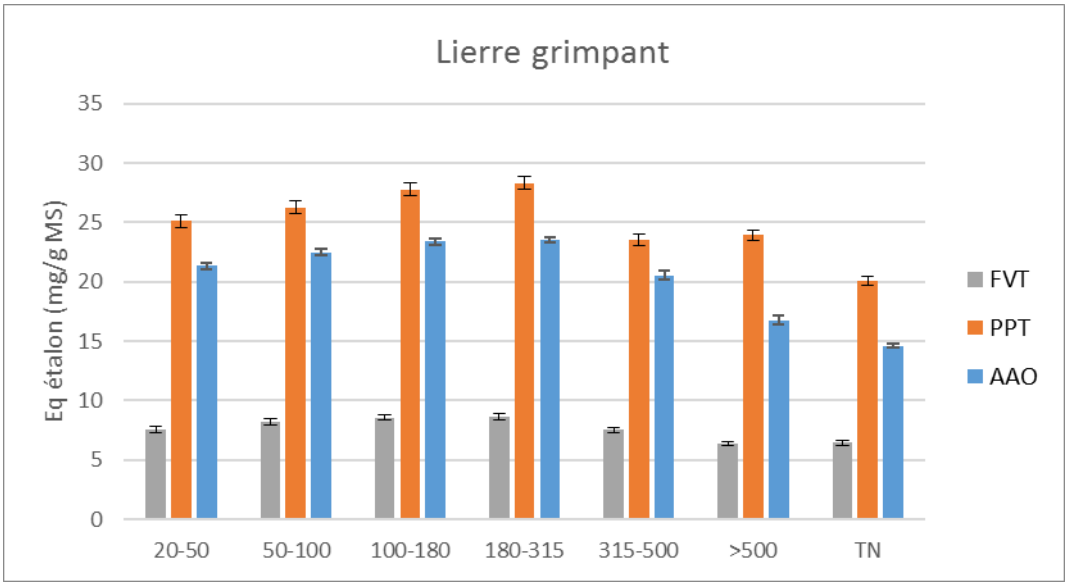


Figure 38 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

L'histogramme ci-dessus montre des variations entre les différentes classes granulométriques, les valeurs maximales sont atteintes dans la fraction 180-315 µm, la teneur en polyphénols totaux (28,32 mg EGA/g MS), en flavonoïdes totaux (8,63 mg ECAT/g MS) ainsi que pour l'activité antioxydante (23,52 mg Eq trolox/g MS). Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux suivent la même tendance que l'activité antioxydante.

L'application du procédé PTC apporte un gain de 61%, par rapport à la fraction non tamisé (14,63 mg Eq trolox / g MS), ce qui montre l'intérêt de ce procédé.

4.2.2.7 Achillée millefeuille

Les parties aériennes du millefeuille ont été utilisées pour la fabrication des poudres qui ont un aspect fibreux.

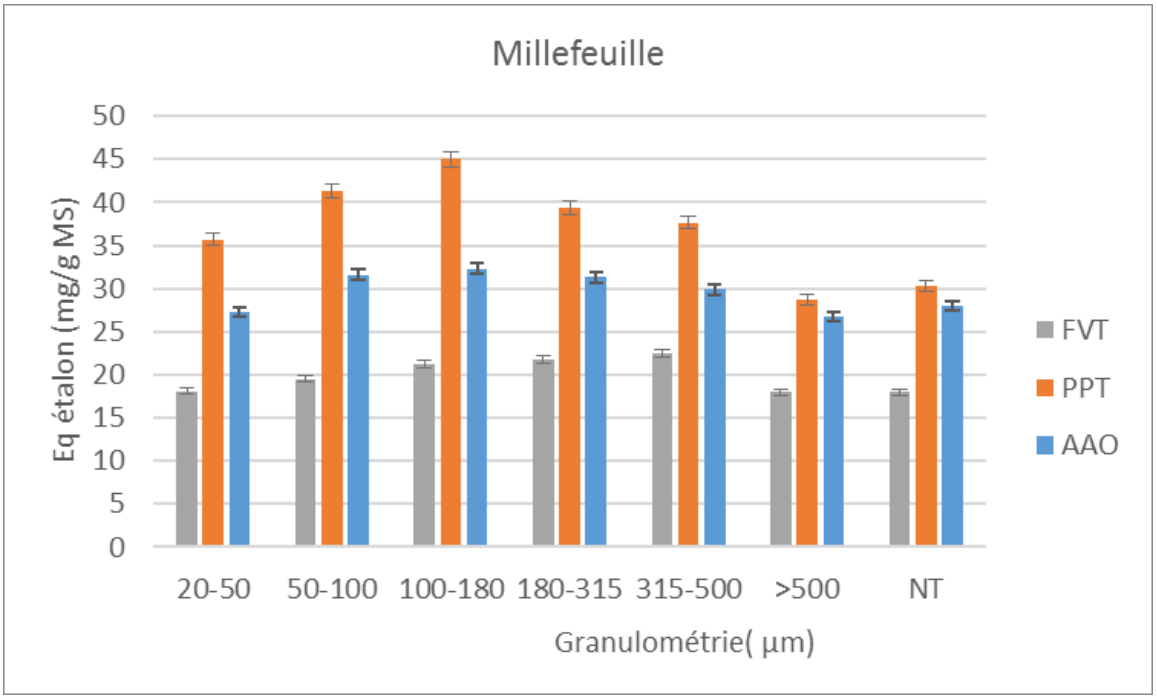


Figure 39 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

La figure 39 montre que la teneur maximale en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux est dans la fraction granulométrique 100-180 µm. Il apparait que l'activité antioxydante suive la même tendance que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, avec un lien plus fort pour cette dernière. De plus, à l'exception de la granulométrie >500 µm toutes les autres fractions ont une teneur en polyphénols totaux supérieur à celle de l'échantillon non tamisé. La classe granulométrique 20-50 µm indique des valeurs plus faibles qui sont proches de celles de la fraction non tamisée.

4.2.2.8 Piloselle

Les parties utilisées pour produire les poudres sont les tiges, les feuilles et les fleurs, l'aspect des poudres obtenues est fibreux.

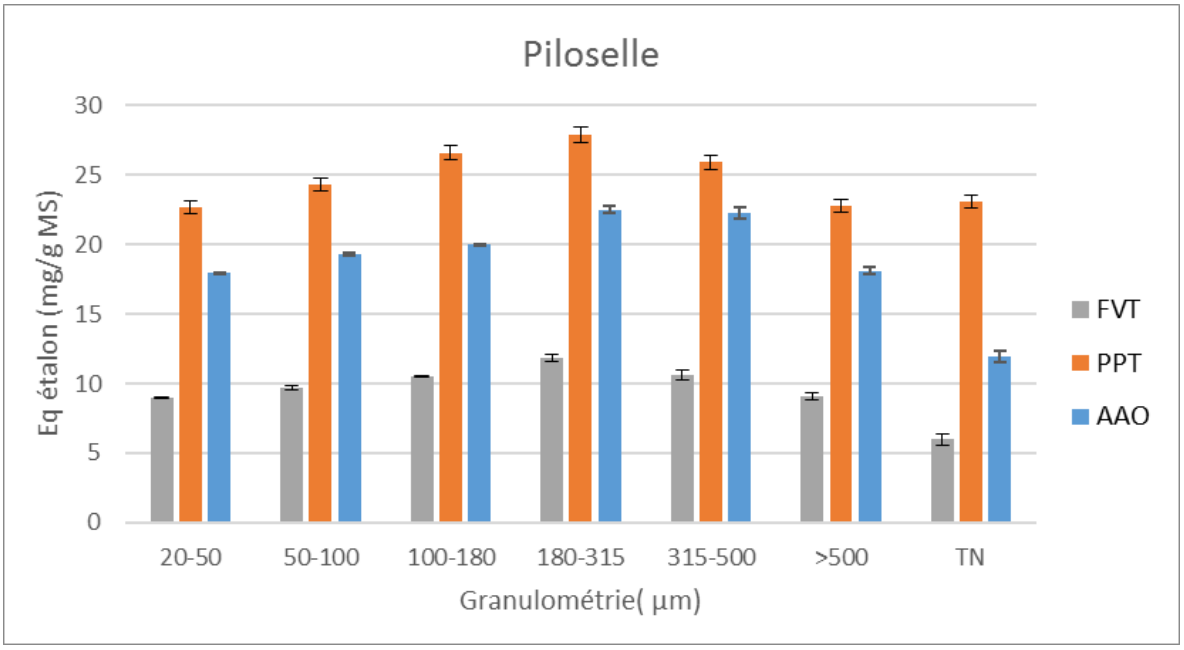


Figure 40 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

L'histogramme montre que la fraction 180-315 µm contient les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes les plus fortes avec 27,90 mg EAG/g MS et 11,84 mg ECAT/g MS respectivement. L'activité antioxydante la plus importante (22,50 mg Eq Trolox/g MS) est obtenue pour la classe granulométrique 180 et 315 µm. Ces valeurs sont plus grandes que celles de la fraction non tamisée, avec un gain de 87% de l'activité antioxydante, ce qui indique l'intérêt du PTC.

4.2.2.9 Fenouil

Les fruits (graines) du fenouil ont été utilisés pour la fabrication des poudres, dont l'aspect est granuleux.

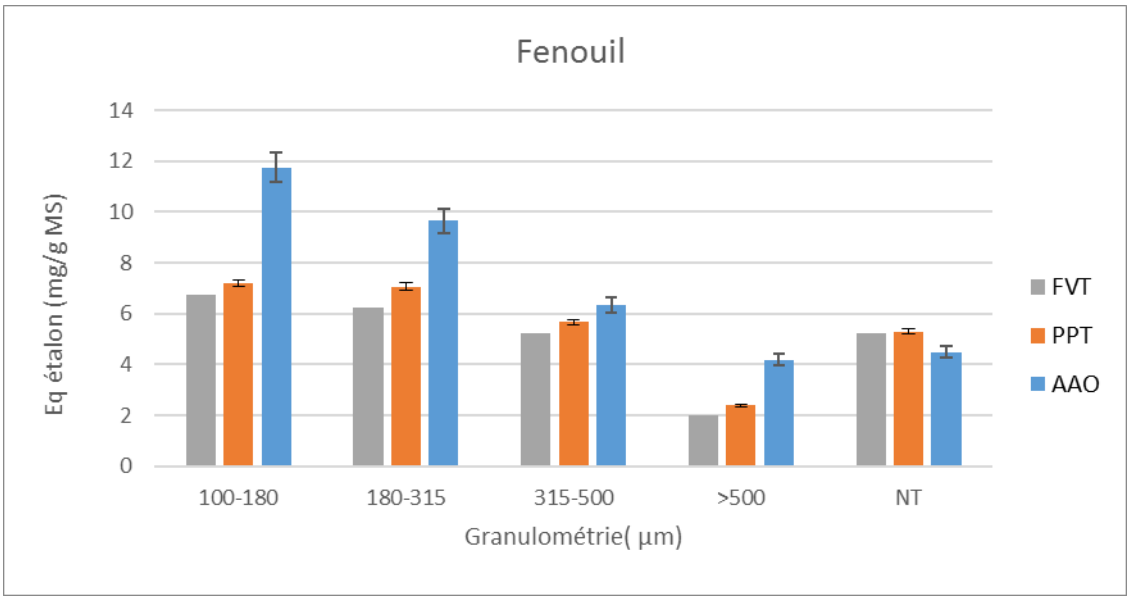


Figure 41 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Pour le fenouil l'absence des poudres superfines comprise entre 20 µm et 100 µm ne nous permet pas de formuler la comparaison des différentes fractions avec autant de pertinence que dans les cas précédents. Le dosage de la teneur en polyphénols totaux montre que pour les poudres du fenouil la quantité est maximale dans les deux fractions 100-180 µm et 180-315 µm (environ 7 mg EAG/MS). Les poudres de granulométrie plus grande que 500 µm contiennent la plus faible quantité de polyphénols totaux (2,4 mg EAG/ MS), deux fois inférieure à la valeur maximale et moins que la fraction non tamisée.

4.2.2.10 Ortie

Les parties aériennes de l'ortie ont été utilisées pour la fabrication des poudres avec un aspect granuleux.

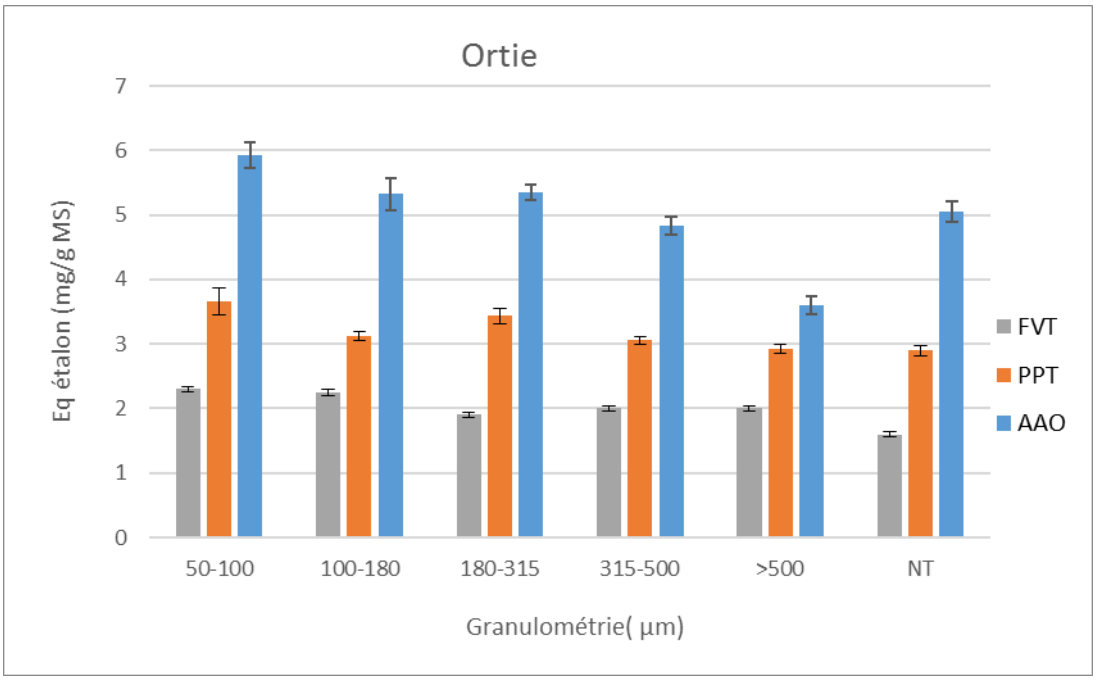


Figure 42: Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux dans les différentes classes granulométriques donnent des valeurs faibles avec des variations non significatives. Ce qui expliquerait une activité antioxydante relativement faible. À la vue de ces résultats il semblerait, compte tenu de la faible quantité de polyphénols dans les différentes fractions, que le procédé PTC n'apporte pas de gains significatifs par rapport à la fraction non tamisée.

4.2.2.11 Scrofulaire noueuse

Les tiges, feuilles et fleurs sont utilisés pour la production de poudres qui ont un aspect granuleux.

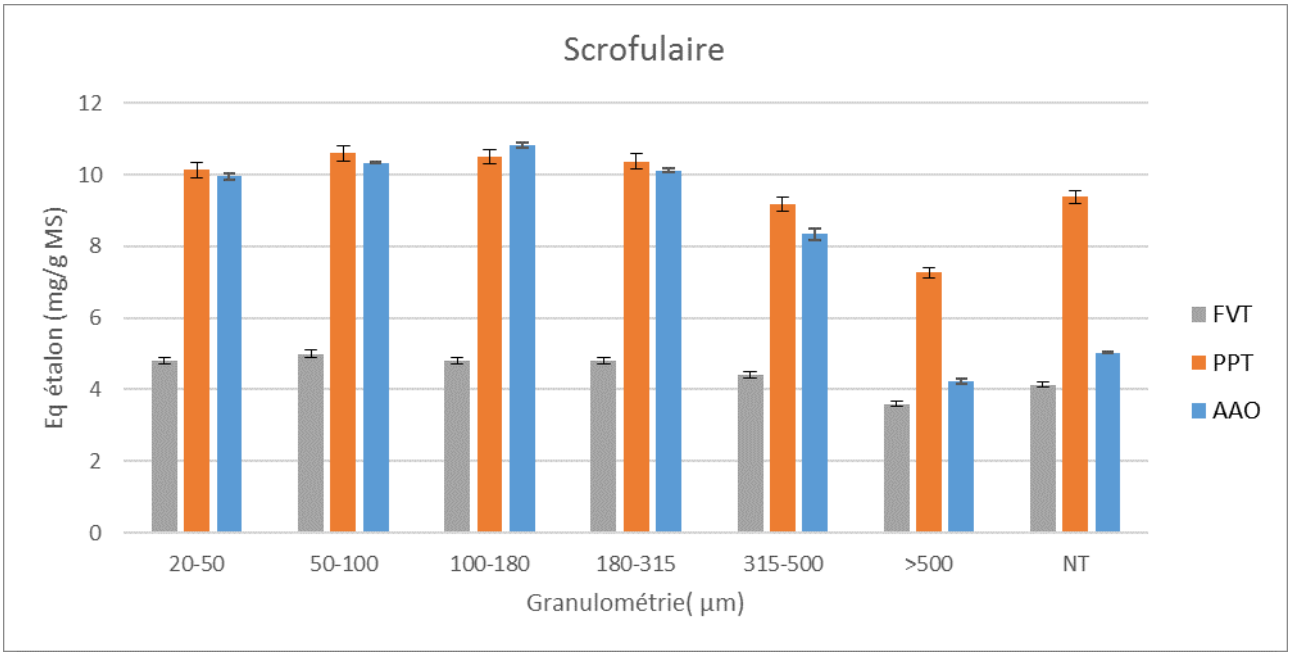


Figure 43: Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

Les résultats enregistrés indiquent que les quantités de polyphénols et de flavonoides totaux sont relativement faible, de même que l'activité antioxydante. Cependant, l'histogramme montre que la teneur en polyphénols totaux des différentes fractions de poudres comprises entre 20 µm et 315 µm ne varie pas (environ 10 mg EAG/ MS) et que la fraction >500 µm contient toujours la plus faible quantité. Le procédé PTC ne semble pas efficace dans le cas des parties aériennes de la scrofulaire noueuse.

4.2.2.12 Rosier des chiens

Les parties utilisées pour la production des poudres sont les fruits, aspect des poudres obtenues est très fibreux.

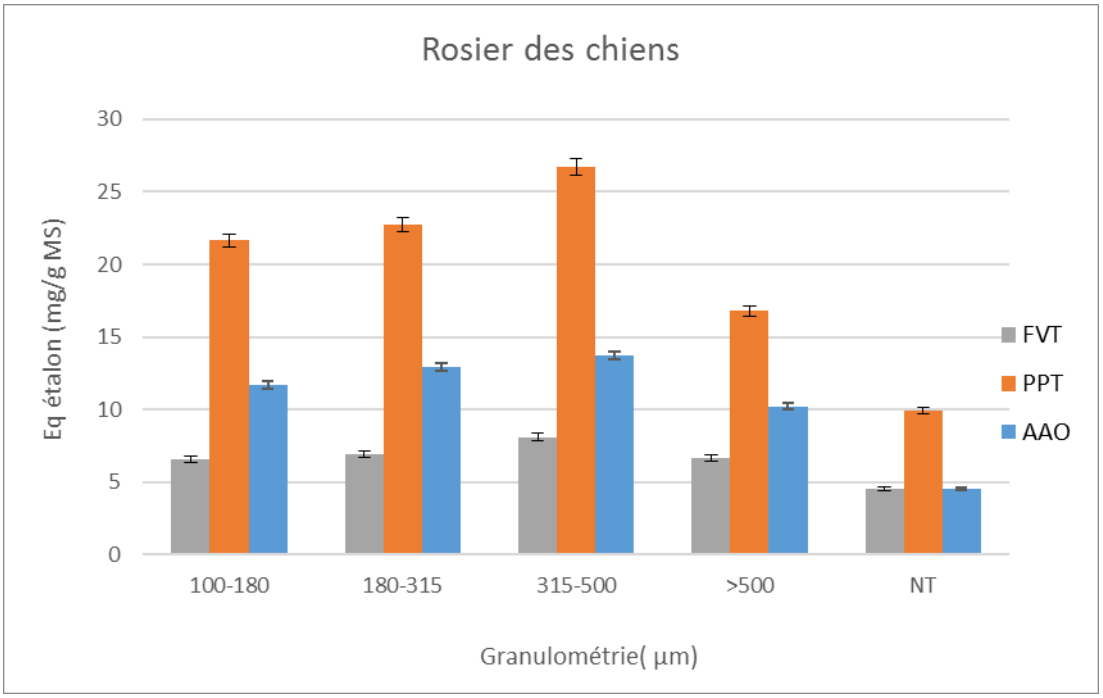


Figure 44 : Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante des fractions granulométriques.

L'histogramme indique clairement que le procédé PTC enrichit de manière significative les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux ce qui entraine également une importante augmentation de l'activité antioxydante. Dans le cas de la fraction 315-500 µm l'activité antioxydante est 3 fois plus élevée que celle de la fraction non tamisée, ce qui montre l'intérêt du fractionnement différentiel PTC.

4.2.3 Conclusion

L'analyse de l'ensemble des données obtenues par les dosages des polyphénols, des flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de la granulométrie permet de mettre en évidence l'action du fractionnement différentiel.

Les valeurs obtenues pour chaque classe granulométrique ont été comparées avec celles obtenues pour les plantes non tamisées afin de montrer l'efficacité du procédé PTC sur les teneurs en polyphénol et l'activité antioxydante.

Le tableau 2 rassemble les classes granulométries qui ont permis d'obtenir les meilleurs résultats en termes de teneur en polyphénols, en flavonoïdes totaux et en activité antioxydante.

Tableau 2: activités antioxydantes, teneurs en flavonoïdes, teneurs en polyphénols totaux et granulométrie.

Plantes	partie du plante	Aspect	FVT mg ECat/g	PPT mgEAG/g	AAO mg Eq Trolox/g	Granulométrie (µm)	%Enrichissement
Reine des près	fleurs	granuleux	23.11	66.69	55.19	50-100	20.19
Millepertuis	fleurs	fibreux	21.09	125	42.18	100-180	33.27
Millefeuille	fleurs	fibreux	22.5	45	31.99	100-180	14.45
Houblon	fleurs et feuilles	fibreux	2.34	25	16.88	50-100	45.02
Basilic	feuilles	granuleux	19.63	22.25	27.43	315-500	11.60
Lierre grimpant	feuilles	granuleux	8.62	28.32	23.52	180-315	60.77
Piloselle	parties aériennes	fibreux	11.84	27.9	22.49	180-315	87.89
Ortie	parties aériennes	granuleux	2.31	3.65	5.93	50-100	17.38
Scrofulaire noueuse	parties aériennes	granuleux	4.8	10.51	10.82	100-180	114.94
Rosier des chiens	fruits	fibreux	8.09	26.71	13.73	315-500	203.09
Fenouil	fruits (grains)	granuleux	6.75	7.2	11.75	100-180	161.69
Saule blanc	écorce	fibreux	10.17	52.66	24.07	50-100	35.22

Le tableau 2 montre que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux les plus faibles sont enregistrées pour le fenouil l'ortie la scrofulaire noueuse et le rosier des chiens en accord avec les résultats du screening.

La reine-des-prés, le basilic et le saule blanc ont les activités antioxydantes les plus

élevées. Le millefeuille, le lierre, la piloselle et le houblon possèdent également une forte activité antioxydante. Le rosier des chiens, l'ortie, le fenouil et la scrofulaire noueuse ont en revanche les activités les plus faibles.

L'activité antioxydante des fractions intermédiaires comprise entre 100 µm et 315 µm augmente significativement comparée à celle de la fraction non tamisée, sauf pour l'ortie, le houblon, le saule blanc et la reine des prés pour lesquels les granulométries les plus fines ont la meilleure activité antioxydante.

Les fractions dont la taille de particules sont inférieures à 500 µm contiennent toujours plus de polyphénols, que l'échantillon de la plante non tamisée. On a obtenu dans toutes les plantes un enrichissement mais avec des proportions différentes ce qui valide l'intérêt d'utilisé cette procédure pour l'extraction différentiel des flavonoïdes et des polyphénols par voie sèche.

Dans ce tableau, il est important de noter que lorsque le rapport de la teneur en flavonoïdes totaux sur la teneur en polyphénols totaux est supérieur à 70%, l'activité antioxydante diminue dans les fractions granulométriques inférieures à 100 µm. Ce phénomène pourrait être dû à la sensibilité des flavonoïdes au contact de l'oxygène de l'air, comme dans le cas des catéchines décrites dans les travaux de Hu et al.,2012 ; Neilson et al., 2007 qui montrent une chute de l'activité antioxydante des catéchines suite à leur exposition directe à l'air.

Plus récemment, un résultat expérimental qui va dans le même sens, a été signalé dans les travaux de Zhu et al., (2013), qui révèlent que l'activité de piégeage des radicaux DPPH diminue après un broyage superfin du marc de raisin. Ce qui est en accord avec les résultats enregistrés pour le millepertuis, le basilic, le lierre, l'achillée millefeuille, la piloselle, le rosier de chien.

Cette diminution de l'activité antioxydante des poudres superfines inférieures à 20 µm et à 50 µm, peut aussi être due à l'augmentation de la température induite lors du broyage. Cette température qui est plus élevée pour la production des poudres dont la taille de particule est faible pourrait conduire à une dégradation partielle des polyphénols comme le mentionnent Sólyom et al., (2014) et Liazid et al., (2007).

A l'inverse, dans le cas des fractions granulométriques supérieures à 500 µm cette diminution de l'activité antioxydante serait due à une forte proportion en fibres, comme le rapporte nos travaux antérieurs sur le millepertuis et le millefeuille (Zaiter et al). En effet, les

fibres sont plus dures à broyer en particules fines. De plus, les liasons covalentes qui lient les polyphénols aux carbohydrates qui constituent les fibres ne sont pas cassées dans les fractions de 500 µm (Van Craeyveld et al., 2009).

Par rapport aux autres plantes comme la reine de près, le saule blanc, le houblon, l'ortie, et la scrofulaire noueuse, on remarque que les poudres superfines dont la classe granulométrique est comprise entre 50 µm et 100 µm contiennent les teneurs maximales en polyphénols et en flavonoïdes. Ces derniers résultats sont en accord avec l'étude de Zhu et al., (2010) qui montre que la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante du son de blé augmentent avec le broyage superfin. Le rapport teneur en flavonoïdes sur teneur en polyphénols dans ces plantes est toujours plus petit que 70%.

De plus, on sait que les métabolites secondaires comme les composés phénoliques se trouvent dans les vacuoles ou dans des vésicules, étant ainsi protégés par des macromolécules tels que les polysaccharides qui constituent la membrane cellulaire. Le broyage modifie ou détruit la matrice, provoquant la libération ou l'exposition de certains composés phénoliques (Zhu et al., 2015).

Un calcul du pourcentage de gain de l'activité antioxydante des fractions obtenues par PTC par rapport aux fractions non tamisées révèle que dans tous les cas le procédé améliore cette activité. Notamment, dans le cas de la fraction 315-500 µm de l'échantillon du rosier des chiens pour lequel le gain est deux fois plus grand que la fraction non tamisée.

Chapitre II : Analyses par chromatographie

1 Matériel et méthode

1.1 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Pour chaque plante une méthode propre a été développée. La séparation des composés repose sur un gradient d'élution adapté à chaque échantillon. La séparation est effectuée sur une colonne Gemini C18 de taille de particules 3 µm de longueur 150 mm et de diamètre interne 4,6 mm. La phase mobile est un mélange d'acide formique à 0,5% dans une solution aqueuse (A) et d'acétonitrile (B). Le volume d'injection est de 20 µL et le débit de pompe est fixé à 0,6 mL/min. La colonne est thermostatée à 30 °C dans le four.

Le gradient d'élution suivant est utilisé :

- de 0 à 22,5 min : gradient linéaire de 90:10 (A: B) à 50:50;
- de 22,5 à 23 min : gradient linéaire de 50:50 à 10:90;
- de 23 à 29 min : élution à 10:90;
- de 29 à 29,5 min : gradient linéaire de 10:90 à 90:10;
- de 29,5 à 35 min : élution à 90:10 (étape de rééquilibration).

Ce gradient a été adapté à chaque échantillon pour optimiser la séparation des composés ciblées afin d'obtenir la meilleure séparation possible. Plusieurs gradients sont expérimentés pour arriver à établir un profil des extraits qui exprime une bonne séparation. Pour détecter nos composés dans les extraits de plantes un détecteur UV PDA (détecteur à barrette de photodiodes) et un spectrophotomètre de masse sont utilisés.

Les réglages du spectrophotomètre de masse sont identiques pour tous les échantillons. La source opère en mode négatif, le débit de gaz de nébulisation est réglé à 1,5 L/min et le débit de gaz de séchage à 15 L/min. La température du bloc source est fixée à 350 °C et la ligne de désolvatation à 250 °C. La tension d'électrospray est de -4000 V. Afin d'éviter la contamination de la source, les extraits de plantes ont été dilués.

L'identification et la caractérisation des composés actifs dans les extraits de plantes est basée sur les analyses de leur étalon respectif, confrontant les temps de rétention (t_R) et les rapports *m/z* des ions $[M-H]^-$ (dans la plupart des cas le mode négatif étant utilisé).

Pour effectuer les quantifications, une courbe d'étalonnage à cinq niveaux est réalisée suite à l'injection (3 répétitions) de concentrations connues des étalons. Ces courbes d'étalonnage ont été établies pour l'ensemble des principes actifs disponibles commercialement.

La sensibilité de la méthode est évaluée en déterminant les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ), définie comme étant respectivement 3 fois et 10 fois la valeur du bruit du fond.

Les formules utilisées pour le calcul sont les suivantes : LOD=3σ/a et LOQ=10σ/a

Avec : $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(Y-Y_i)^2}{n-1}}$;

- a : pente de la courbe de calibration des aires en fonction de la concentration ;
- Y : aire moyenne ;
- Y_i : aire moyenne recalculée avec les coefficients de la droite de la régression ;
- *n* : est le nombre des dilutions réalisés.

A noter que ces calculs sont automatisés grâce à la méthode d'analyse utilisée pour chaque plante et les analyses sont réalisées en trois répétition.

1.2 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

L'appareil GC-MS Shimadzu de modèle GCMS-QP2010 a été utilisé pour les travaux de cette thèse. La colonne ZB-5MS utilisée a les caractéristiques suivantes : 30 mètres de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 mm d'épaisseur de film.

Les conditions d'analyse GC-MS sont les suivantes :

- débit du gaz vecteur (hélium) : 1 mL/min
- volume injecté : 2 µL
- injection en mode split
- température de l'injecteur : 300 °C
- gradient de température : 60 °C pendant 3 min ; rampe de 10 °C/min jusqu'à 300°C maintenue pendant 3 min (30 min au total)
- ionisation par impact électronique (IE) à 70 eV
- température de source : 200 °C

Dans ces conditions, l'ionisation conduit à la détection d'ions radicalaires $M^{\bullet+}$.

Les spectres de masse des composés étudiés sont comparés automatiquement à ceux de la bibliothèque (*Mass spectral Library NSIT 11 SHIMADZU*) présente dans le GC-MS.

2 Résultats

2.1 Reine-des-prés

2.1.1 LC-PDA/MS

Le chromatogramme ci-dessus (figure 45) indique la présence dans l'extrait de la rutine, de l'hypéroside et du spiraéoside comme composés principaux.

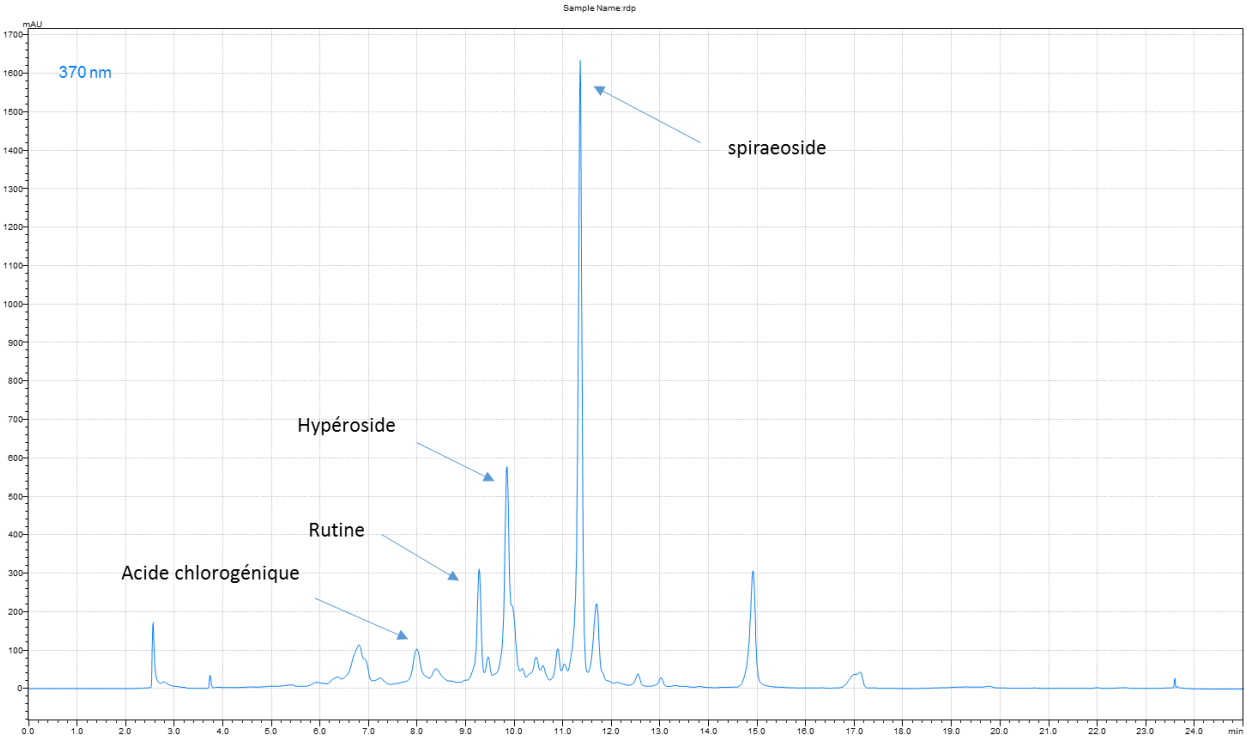


Figure 45 : Chromatogramme UV de la fraction 315-500 µm.

Pour l'hypéroside, il est difficile de réaliser sa quantification à cause d'un phénomène de coélution, malgré l'optimisation du gradient d'élution. Pour résoudre cette difficulté la spectrométrie de masse a été utilisée. La figure 46 montre le chromatogramme de l'hypéroside et du spiraéoside, qui sont les composés majoritaires dans la reine-des-prés.

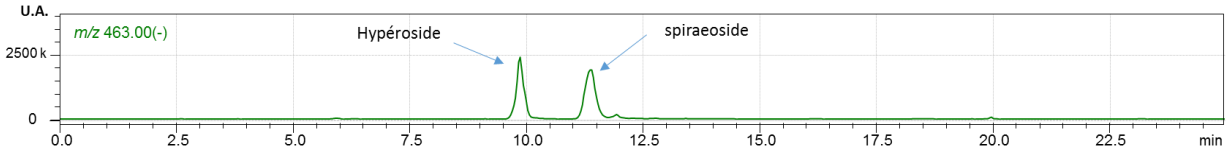
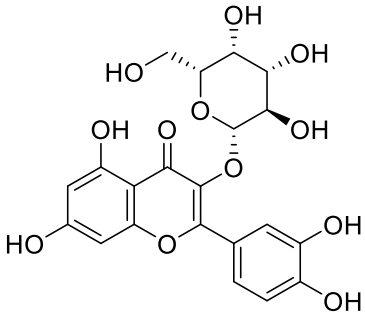
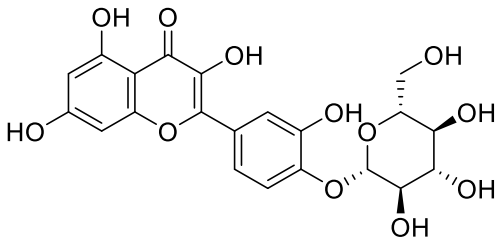


Figure 46 : chromatogramme de l'hypéroside et le spiraéoside en mode négatif, analyse LC-ESI / MS de la fraction 315-500 µm.

L'hypéroside et la spiraéoside apparaissent au même rapport de masse *m/z* 463. Une bonne séparation est observée entre eux, l'hypéroside est élué en premier avec un temps de rétention t_R = 9,82 min, puis le spiraéoside avec un temps de rétention t_R = 11,57 min.



Hypéroside



Spiraeoside

Pour la reine-des-prés, l'extraction hydroalcoolique a permis de détecter en outre l'acide chlorogénique et férulique ainsi que 2 autres flavonoïdes : le kaempférol-4'-glucoside et la rutine. Le tableau 4 montre les résultats de quantification pour ces 6 composés pour chaque extrait de poudres. Les valeurs en gras indiquent la teneur la plus élevée pour un composé donné, parmi les différentes classes granulométriques.

Tableau 3: teneurs des marqueurs identifiés par LC-MS au sein des extraits des poudres de la reine-des-prés.

				Concentrations (mg/g de matière sèche)				
Composé actif (*m/z*)	Famille	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé	solvant d'extrac
acide ferulique (193)	acide phénolique	**0.51**	0.39	0.26	0.38	0.27	0.41	Méthanol/Eau
acide chlorogenique (353)	acide phénolique	0.92	1.11	0.95	**1.67**	1.56	1.37	Méthanol/Eau
kaempférol-4'-glucoside (447)	flavonoide	**0.70**	0.58	0.35	0.46	0.56	0.53	Méthanol/Eau
hyperoside (463)	flavonoide	4.21	5.31	5.08	**8.81**	8.00	6.32	Méthanol/Eau
spiraéoside (463)	flavonoide	**5.49**	5.34	3.74	4.65	4.85	5.00	Méthanol/Eau
rutine (609)	flavonoide	2.89	4.45	4.42	**6.67**	5.67	5.22	Méthanol/Eau

Les teneurs en polyphénols les plus élevées sont atteintes pour le kaempférol-4'-glucoside et la rutine. Pour les polyphénols tels que la rutine, l'hypéroside et l'acide chlorogénique, ils sont concentrés dans la fraction 315-500 µm. En revanche, l'acide férulique, le kaempférol-4'-glucoside et le spiraéoside se retrouvent dans la fraction granulométrique 50-100 µm. On remarque que la concentration dans la fraction non tamisée est parmi les faibles concentrations ce qui valide qu'il y a une séparation différentielle.

2.1.2 GC-MS

L'extraction au dichlorométhane a permis d'obtenir 2 salicylates qui sont caractérisés par GC-MS et sont reportés dans le tableau 5 : salicyle-aldéhyde, et le méthylsalicylate. Pour les salicylates l'enrichissement a eu lieu dans la fraction > 500 µm.

Tableau 4: teneurs des marqueurs identifiés par GC-MS au sein des extraits des poudres de la reine-des-prés.

				Concentrations (mg/g de matière sèche)			
Composé actif (M•+)	Famille	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
salicyle aldéhyde	salicylate	0.0010	0.0010	0.0012	0.0016	**0.0022**	0.0011
méthyl salicylate	salicylate	0.0011	0.0009	0.0010	0.0014	**0.0026**	0.0010

Pour les composés actifs présents dans cette plante, on remarque que le comportement des salicylates est à l'inverse des polyphénols qui sont concentrés dans les poudres dont la taille de particule est plus faible.

2.2 Millepertuis

Pour le millepertuis les résultats reportés dans cette partie ont été publiés (Becker, Zaiter et al., 2016) annexe 2. La figure 47 montre le chromatogramme UV obtenue pour un extrait hydroalcoolique des parties aériennes du millepertuis.

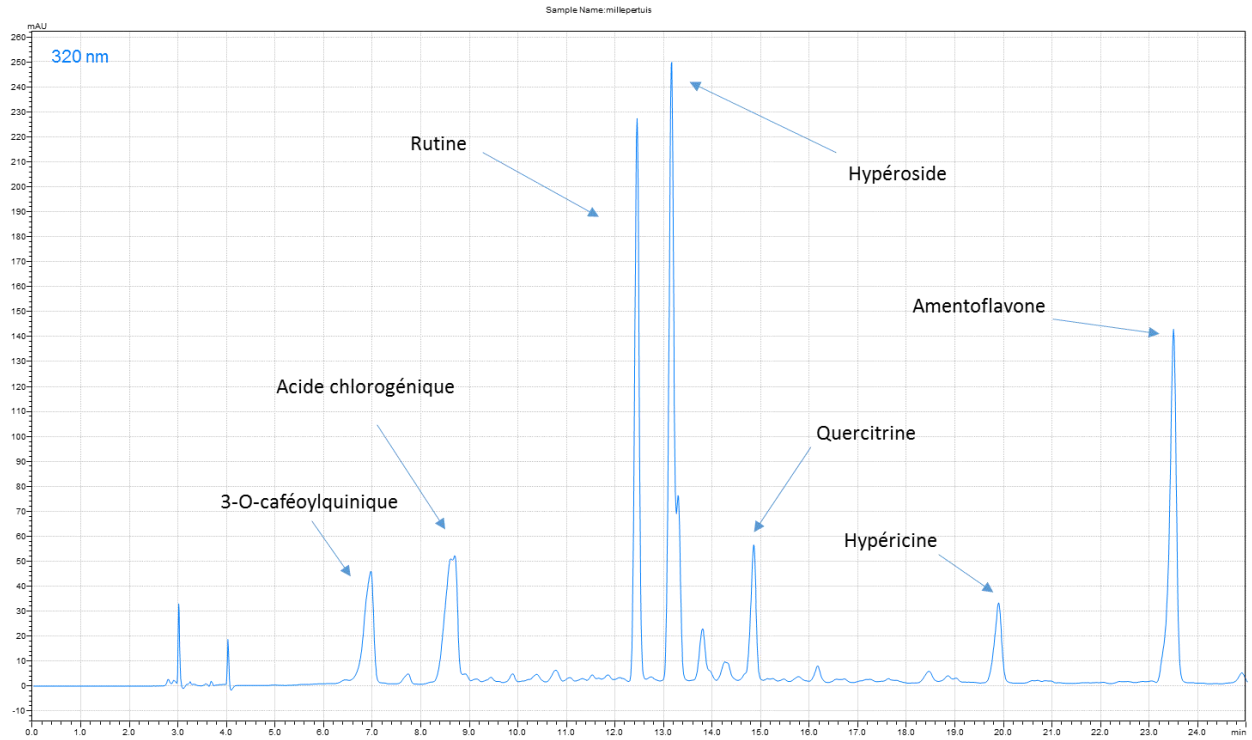
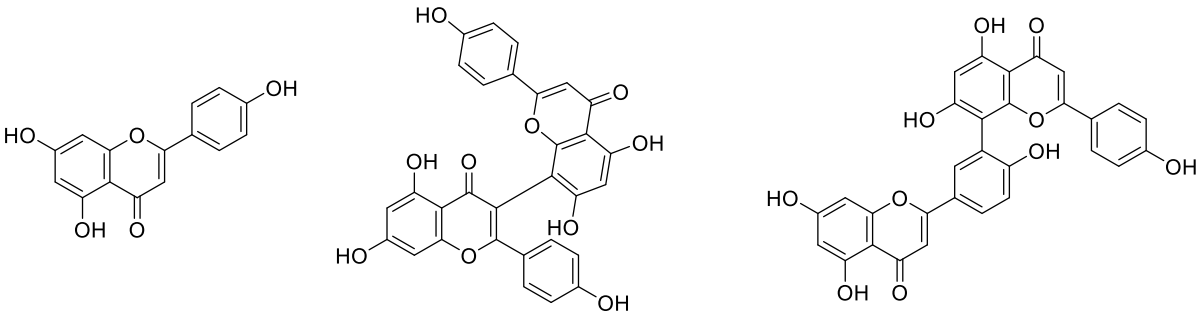


Figure 47 : Chromatogramme UV de la fraction 100-180 µm.

A 20 min l'hypéricine est éluée en même temps que hyperforine qui n'apparait pas sous UV car il ne contient pas de chromophore (figure 48), d'où l'importance de la spectrométrie de masse pour le détecter et le caractériser. Pour l'acide chlorogénique un chevauchement est également observé au niveau de son signal. Cependant, il est caractérisé par spectrométrie de masse. Un autre acide phénolique a été identifié et caractérisé : l'acide 3-O-caféoylquinique. Parmi les flavonoïdes, il y a l'épicatéchine, la rutine, la I3, II8-biapigénine, la I3', II8- biapigénine (amentoflavone), la quercitrine et hypéroside, ont été identifiés dans *H. perforatum*.



Le chromatogramme ci-dessous montre le spectre de l'hypéricine et l'hyperforine qui ont des rapports de masse différents m/z 503 et 535 respectivement, des composés spécifiques du millepertuis (figure 48).

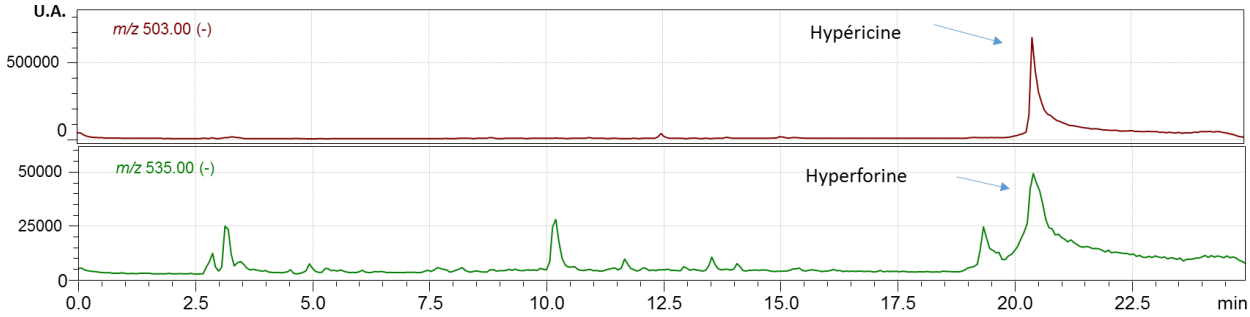


Figure 48 : Hypéricine et Hyperforine, analyse LC-ESI / MS en mode négatif, fraction 100-180 µm.

Malgré la coélution des deux composés, on peut les distinguer par leur rapport *m/z.* leurs étalons sont également injectés pour vérifier leurs temps de rétention respectifs.

La figure 49 représente le spectre de masse des mêmes extraits et au temps de rétention t_R = 20,47 min où les deux molécules sont éluées.

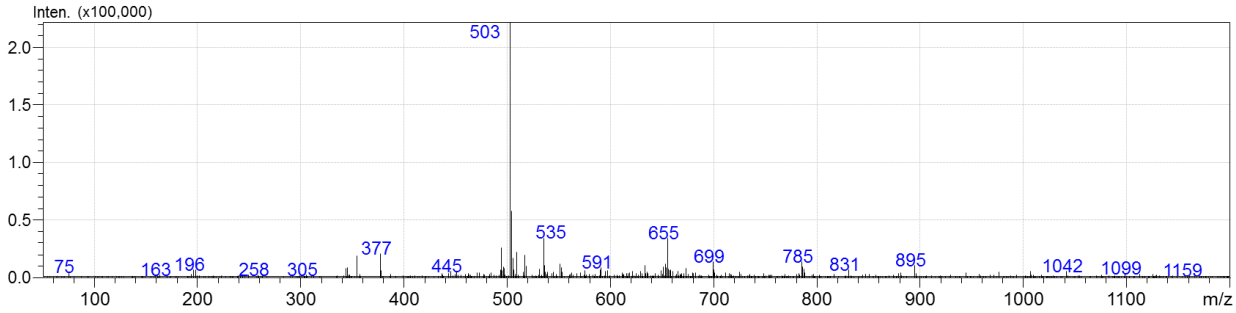


Figure 49 : spectre de masse en mode négatif au temps de rétention t_R = 20,47 de la fraction 100-180 µm.

Le spectre de masse montre que le rapport *m/z* 503 que l'ion *m/z* 535 est beaucoup plus intense, dû à la concentration plus importante de l'hypéricine, confirmée par les dosages.

Tableau 5: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres du millepertuis.

	Concentrations (mg/g de matière sèche)							
Composé actif (*m/z*)	Famille	20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	NT
acide 5-O-caféoylquinique (	acide phénolique	3.76	3.71	**5.11**	**5.43**	3.62	1.22	3.11
acide chlorogénique (*353*)	acide phénolique	3.75	3.77	**5.09**	**4.64**	4.29	1.52	3.33
hyperforine (*535*)	dérivé phloroglucinol	0.01	0.01	**0.01**	0.01	0.01	0.01	0.01
hypéricine *(503)*	naphtodianthrone	0.02	0.02	**0.02**	0.02	0.02	0.02	0.01
épicatéchine (*289*)	flavonoïde	2.82	**3.25**	**3.32**	2.76	2.59	1.73	2.31
hypéroside (*463*)	flavonoïde	22.72	23.31	**26.94**	**26.90**	20.57	9.77	15.55
rutine (*609*)	flavonoïde	7.35	7.37	**9.01**	**9.35**	7.19	2.89	4.81
I3,II8-biapigenin (*537*)	flavonoïde	1.54	1.43	**1.75**	1.38	0.77	0.28	0.42
amentoflavone *(537)*	flavonoïde	0.85	0.80	**0.91**	0.71	0.39	0.15	0.28
quercitrine *(447)*	flavonoïde	6.41	6.44	**6.97**	5.49	3.20	1.00	2.85

Dans les extraits analysés, les plus hautes teneurs en composés bioactifs sont observés pour les classes granulométriques compris entre 100-180 et 180-315 µm. L'hypéroside et la I3, II8-biapigénine présentent la plus haute teneur dans la fraction 100-180 µm : 26,94 et 1,75 mg / g MS, respectivement. Le teneur en rutine est remarquable (9.01 et 9.35 mg / g MS) dans les classes granulométriques intermédiaires (100-180 µm et 180-315 µm) respectivement. Un dérivé phloroglucinol et un naphtodianthrone : l'hyperforine et l'hypéricine respectivement ont été identifiés. Des différences significatives sont présentes pour toutes les molécules excepté l'hyperforine qui se détecte sous forme de trace dans les différentes fractions de poudres. Dans le tableau 5 on trouve la quantification des principaux composés dans des extraits du millepertuis, les valeurs en gras montrent les teneurs maximales des composés dans les extraits.

2.3 Saule blanc

Le profil du chromatogramme (figure 50) de l'extrait du saule blanc ne montre pas de pics suffisamment résolus. Une coélution de la salicyline et de la gallocatéchine est observée. Le couplage LC spectrométrie de masse a permis de lever cette indétermination.

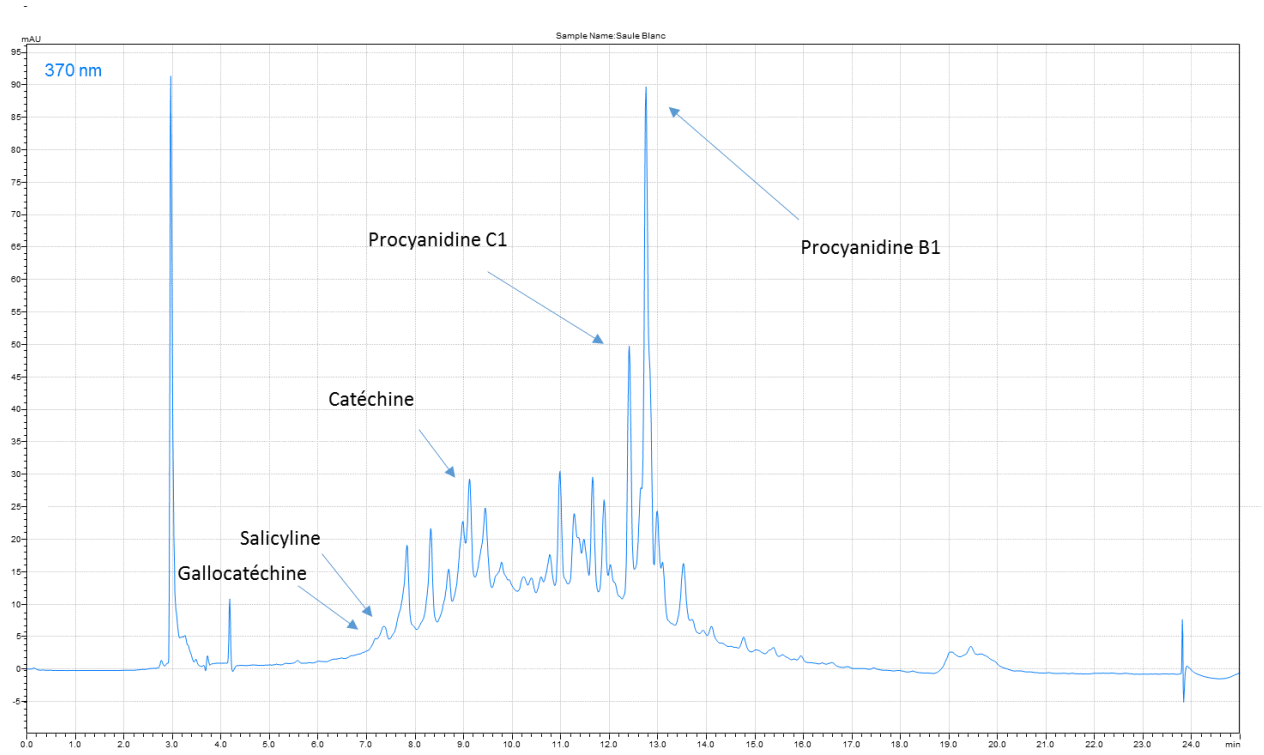


Figure 50 : Chromatogramme UV de la fraction 20-50 µm.

La figure 50 indique clairement les temps de rétention proches de la salicyline (t_R : 7,62 min) et de la gallocatéchine (t_R :7,5 min). Leur rapport de masse respectif : m/z 331 et m/z 305, d'où par la suite leurs séparations de signal est faite par spectrométrie de masse (figure 51).

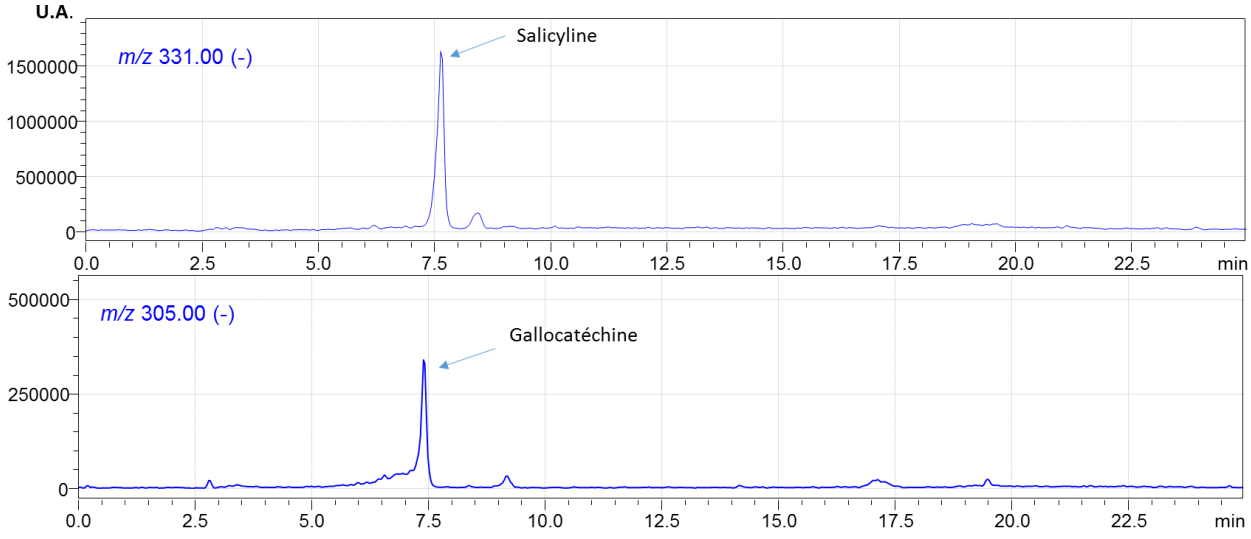
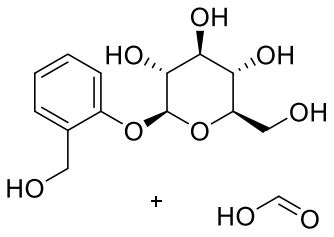


Figure 51 : Chromatogramme Salicyline et Gallocatéchine, analyses LC-ESI / MS en SIM négatif (20-50 µm).

On trouve deux pics avec la même masse ionique *m/z* 331, l'identification de la salicyline a été faite par comparaison avec son standard qui se signale à un temps de rétention t_R = 7,62 min. A noter que ce composé est détecté sous la forme d'un adduit d'acide formique $[M+HOO]^-$ qui vient du solvant d'élution, soit avec + 46 unités de masse, salicyline + adduit = *m/z ;* 285 + 46 = 331.



salicyline + adduit

Les composés identifiés dans les extraits des fractions des différentes poudres sont deux flavonoïdes (catéchine, épicatéchine), un acide phénolique (acide chlorogénique) et trois tannins condensés (procyanidine B1, procyanidine B2 et procyanidine C1) quantifié en fonction de leurs granulométries dans le tableau 6.

La teneur la plus élevée est déterminée pour la procyanidine B1 5,9 mg / g de MS pour les tailles de particules 50-100 µm. Les quantités en procyanidine B2 et en procyanidine C1 sont de 3,4 et 1,8 mg / g de MS respectivement. La teneur en catéchine dans les extraits de poudre est trois fois plus élevée que celle en gallocatéchine d'où un enrichissement plus important de la teneur en catéchine. L'acide chlorogénique aussi présente un enrichissement dans les granulométries des poudres les plus fine (0,18 mg / g de MS) dans l'écorce du saule blanc.

Tableau 6: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres du saule blanc.

			Concentrations (mg/g de matière sèche)						
Composé actif *(m/z)*	Famille	< 20 µm	20-50µm	50-100µm	100-180µ	180-315µ	315-500µ	>500µm	Non tamisé
gallocatéchine *(305)*	catéchine	0.65	**0.78**	0.72	**0.78**	0.73	0.67	0.43	0.54
catéchine (289*)*	catéchine	1.75	3.31	**3.60**	3.14	2.25	2.12	1.62	1.74
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	0.14	**0.18**	**0.18**	0.16	0.15	0.12	0.11	0.13
salicyline *(331)*	salicylate	**1.84**	**1.84**	1.68	1.52	1.47	1.15	1.18	1.45
procyanidine B2 (*577)*	tannin	3.28	3.15	**3.42**	3.24	2.83	2.15	1.42	2.29
procyanidine B1 *(577)*	tannin	5.15	5.07	**5.87**	4.93	3.79	2.82	2.25	3.48
procyanidine C1 *(865)*	tannin	1.79	1.73	**1.81**	1.43	1.20	0.84	0.74	1.07

L'influence de la classe granulométrique sur la catéchine, la gallocatéchine, les procyanidines et l'acide chlorogénique est similaire : les teneurs maximales sont observées pour les fractions granulométriques entre 20 et 180 µm et la teneur la plus faible pour la fraction > 500 µm. Dans le cas de l'écorce du saule blanc suite aux opérations de broyage et de tamisage nous avons obtenu des fractions granulométriques inférieures à 20 µm et comprises entre 20 et 50 µm en quantités suffisantes. Il est important de noter que, contrairement aux autres composés détectés la teneur (1.84 mg/g MS) en salicyline qui est le composé actif majeur du saule blanc augmente dans la fraction superfine inférieure à 20 µm. Pour l'écorce du saule blanc, un enrichissement important en principes actifs est observé pour les fraction les plus fines soit entre 20 et 100 µm. Ce composé n'est pas un flavonoïde, son comportement en fonction de la granulométrie est différent des autres molécules (catéchines, procyanidines).

2.4 Basilic

2.4.1 LC-PDA/MS

La figure ci-dessous représente le profil du chromatogramme des extraits hydroalcooliques du basilic. Il montre une bonne séparation de tous les composés à l'exception de l'acide rosmarinique et l'acide chicorique qui se chevauchent (figure 52).

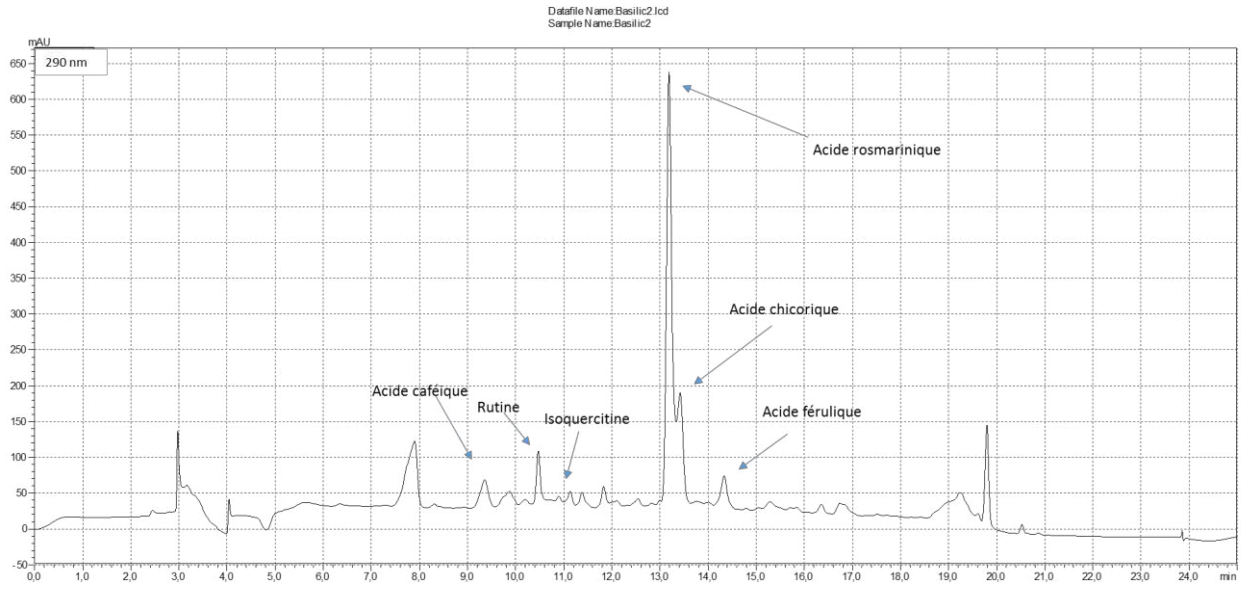
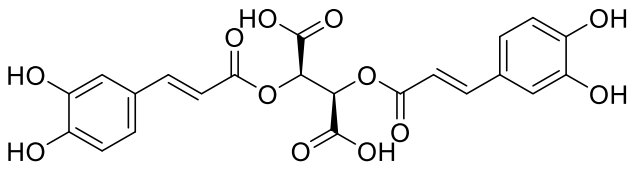
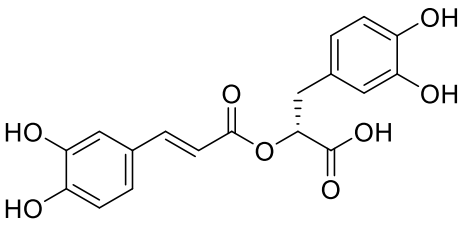


Figure 52 : Chromatogramme UV de la fraction 100-180 µm.



Acide chicorique



Acide rosmarinique

Nous avons identifié trois acides phénoliques : l'acide caféique, l'acide rosmarinique, et l'acide férulique, ainsi que trois flavonoïdes : l'apigénine, l'isoquercétine et la rutine. L'analyse et la quantification de ces composés sont réalisé par LC-MS.

Ci-dessous est illustré de chromatogramme l'acide rosmarinique avec le chicorique qui présente la même masse moléculaire, le composé majoritaire du basilic (figure 53).

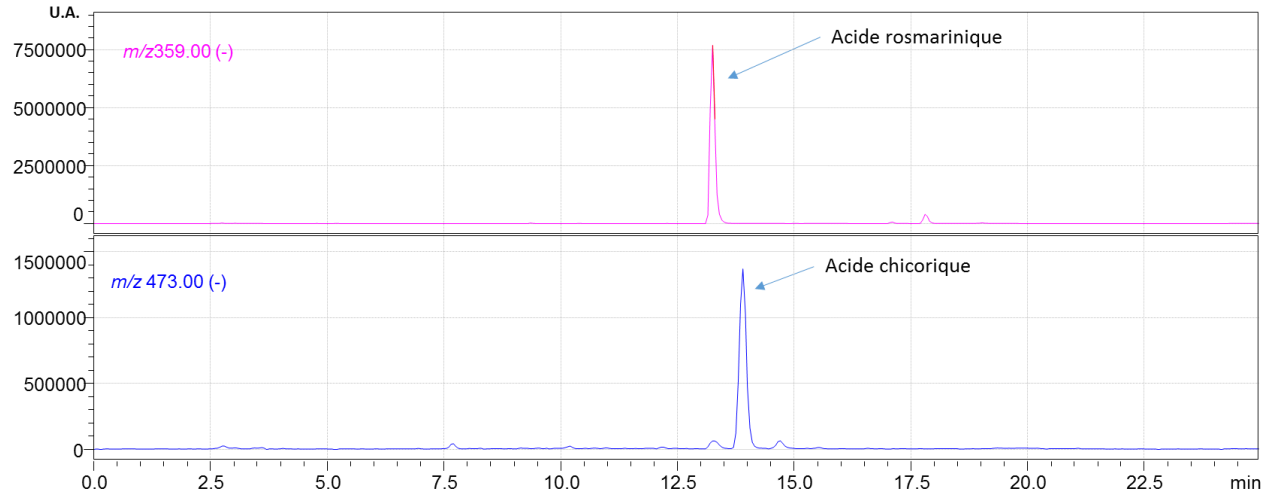


Figure 53 : Chromatogramme Acide rosmarinique et Acide chicorique, LC-ESI / MS en mode négatif (NT).

Les composés recueillis dans les extraits hydroalcoolique de feuilles de basilic sont présentés en tableau 7. Les teneurs observées montrent que le basilic est très riche en acide rosmarinique et en rutine. Les classes granulométriques n'ont pas d'effet significatif sur les teneurs en apigénine ainsi que sur l'acides caféique, férulique, et rosmarinique. Cependant, elles influent sur les teneurs en isoquercétine et en rutine. Tandis que pour la rutine et l'isoquercétine la fraction 180-315 µm est la plus riche avec 6,28 et 1,11 mg/g MS respectivement.

Tableau 7: Teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits hydro-méthanoliques des poudres du basilic.

Composé actif (*m/z*)	Famille	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé	solvant d'extraction
acide caféique (179)	acide phénolique	0.21	0.23	0.25	**0.26**	**0.26**	**0.26**	Méthanol/Eau
acide férulique (194)	acide phénolique	0.70	**0.74**	0.61	0.61	0.60	0.67	Méthanol/Eau
apigenine (269)	flavonoïde	0.06	**0.07**	0.05	0.04	0.04	0.05	Méthanol/Eau
acide rosmarinique (359)	flavonoïde	7.01	7.63	8.09	8.14	8.69	**8.75**	Méthanol/Eau
isoquercitine (463)	flavonoïde	0.67	0.72	**1.11**	1.08	1.01	1.03	Méthanol/Eau
rutine (609)	flavonoïde	3.85	3.99	**6.28**	5.98	6.09	5.76	Méthanol/Eau

2.4.2 GC-MS

Pour les composés terpéniques, notamment responsables du caractère odorant de la plante, ils sont extraits au dichlorométhane puis analysé par GC-MS. Le basilic contient 4 terpénoïdes que nous avons identifiés. Pour les fractions granulométriques 315-500 et > 500 µm les teneurs en composés terpéniques sont plus grandes avec 1,1 ; 1,7 ; 1,2 et 1,2 µg/g MS pour l'eucalyptol, le linalool, l'estragole, et l'eugénol, respectivement. Ces résultats montrent que la taille de particules idéale pour l'extraction des huiles essentielles, se situe entre 315 et 500 µm. Tandis que pour les tailles de particules plus fines on note des teneurs en terpénoïdes inférieures à celle du non tamisé.

Tableau 8: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits dichlorométhane des poudres du basilic.

		Concentrations (µg/g de matière sèche)						
Composé actif (M•+)	Famille	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé	solvant d'extractio
Eucalyptol	terpénoïde	0.59475	0.63027	0.95621	**1.08866**	**1.04656**	0.91382	Dichlorométhane
Linalool	terpénoide	1.31828	1.30589	1.58385	**1.69560**	1.61674	1.46224	Dichlorométhane
Estragole	terpénoide	0.81771	0.85506	1.05303	**1.20822**	**1.22643**	1.00366	Dichlorométhane
Eugénol	terpénoide	0.97985	0.97181	1.14102	**1.18996**	1.05454	0.98988	Dichlorométhane

2.5 Houblon

Le chromatogramme (figure 54) montre une coélution du desméthylxanthohumol et de la 8-prénylnarginine.

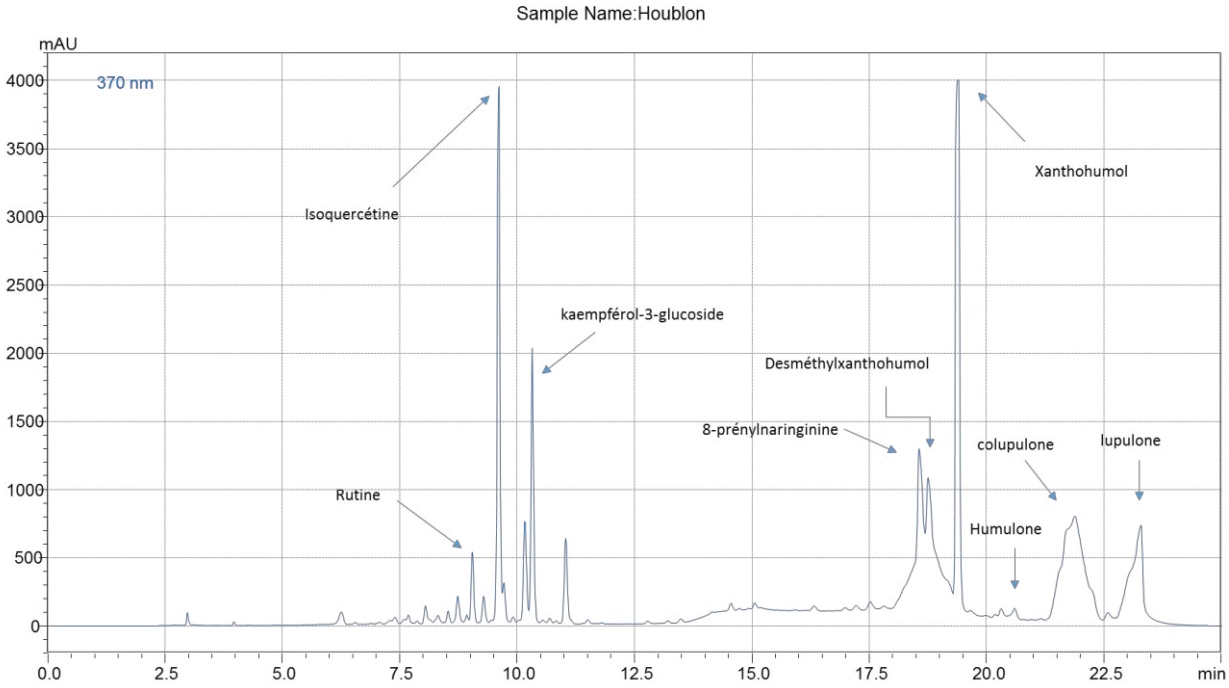


Figure 54 : Chromatogramme UV de la fraction 50-100 µm.

Ce problème est résolu par une caractérisation en spectrométrie de masse de chaque composé identifié. On remarque que les composés propres au houblon, éluent tardivement par rapport aux flavonoïdes. En effet pour cette plante, le gradient d'élution a été modifié pour que ces composés spécifiques éluent en un temps raisonnable. Le pourcentage d'acétonitrile a été augmenté ainsi que sa durée.

Le composé majoritaire du houblon est le xanthohumol (t_R= 19,32) (figure 55) de rapport *m/z* 353. L'extrait méthanolique de la fraction 50-100 µm montre un fort signal du xanthohumol.

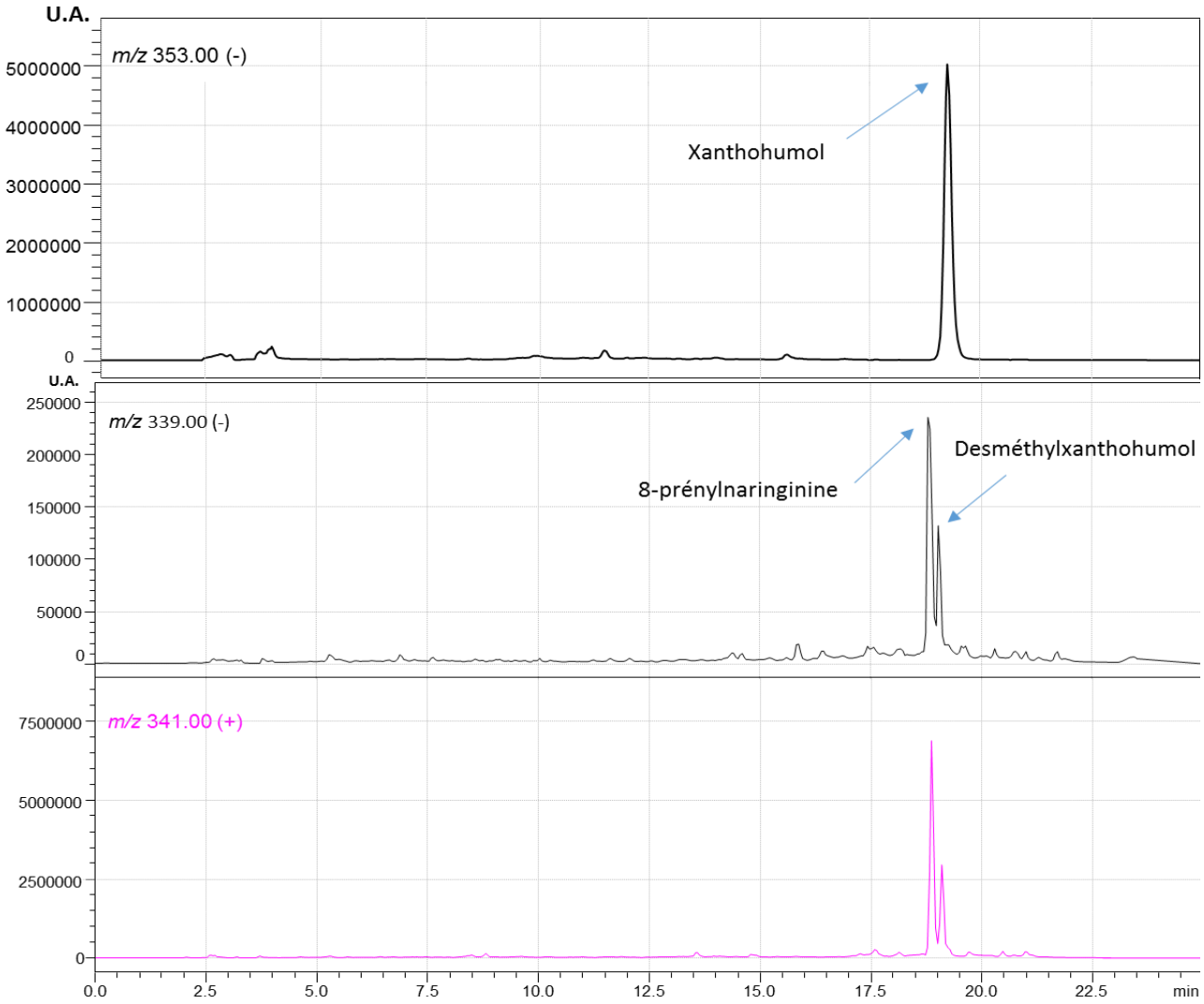
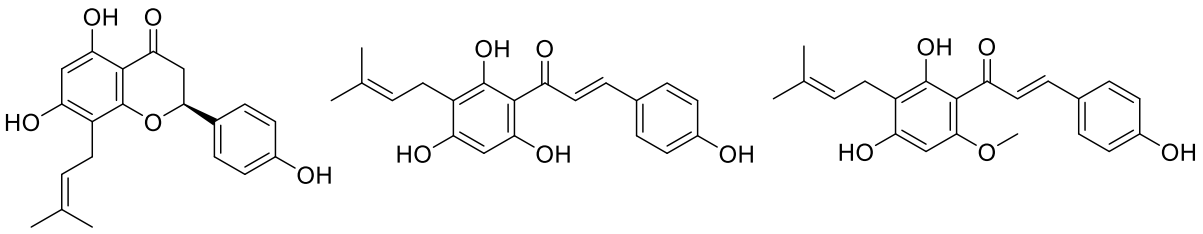


Figure 55 : Chromatogrammes Desméthylxanthohumol et la 8-Prénylnarginine, LC-ESI / MS en mode négatif et en mode positif, Xanthohumol en mode négatif de la fraction 50-100 µm.

La desméthylxanthohumol et la 8-prénylnarginine donnent une signal plus intense en mode positif. Tandis que le xanthohumol en mode négatif, tous ces composés sont quantifiés par rapport à leurs standards.



8-prénylnarginine

Desmethylxanthohumol

Xanthohumol

L'extrait méthanolique des échantillons des poudres nous ont permis d'identifier plusieurs composés (tableau 9). Parmi eux, 5 flavonoïdes : l'épicatéchine, l'isoquercétine, le kaempférol-3-glucoside, la rutine et le 8-prénylnaringinine. En outre, 6 acides amers (en anglais nommés « *bitter acids* ») ont été détectés. Ces composés confèrent au houblon son amertume bien connue. Ces acides ont été identifiés grâce à leur rapport *m/z* et non par comparaison avec leurs étalons correspondant à l'exception de la colupulone pour laquelle l'étalon est commercialisé. La présence et les teneurs des autres acides, des isomères structurellement proches de la colupulone, ont été quantifiés suivant cette dernière ils viennent de la même famille moléculaire. Les valeurs obtenues sont exprimées en mg équivalent de la colupulone par gramme matière sèche dont l'étalon commercialisé.

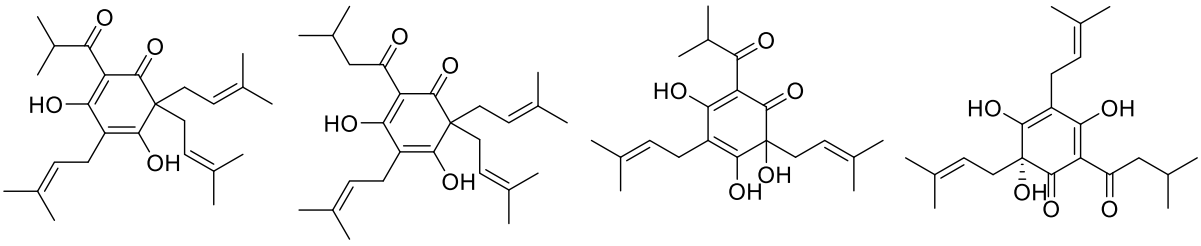


*Tableau 9: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres du houblon. * : mode positif*

Composé actif *(m/z)*	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)					
		50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non broyé
xanthohumol (m/z 353)	chalconoïdes prénylé	**1.76**	**1.65**	0.88	0.42	0.77	1.41
8-prénylnaringinine *(m/z 341*)*	prénylflavonoïde	**0.20**	**0.23**	0.13	0.08	0.16	0.15
desméthylxanthohumol *(m/z 341*)*	chalconoïde prénylé	**0.20**	**0.27**	0.14	0.06	0.12	0.12
cohumulone *(m/z 347)*	acide α	**0.16**	**0.15**	**0.13**	0.04	0.06	0.06
n -humulone *(m/z 361)*	acide α	**1.79**	**1.68**	1.48	1.25	1.54	1.42
ad humulone *(m/z 361)*	acide α	**0.50**	**0.46**	0.36	0.27	0.38	0.40
colupulone *(m/z 399)*	acide β	**1.80**	**1.82**	1.63	1.40	1.41	0.96
n -lupulone *(m/z 413)*	acide β	**1.20**	**1.27**	**1.22**	0.93	0.66	0.42
adlupulone *(m/z 413)*	acide β	**0.54**	0.46	0.36	0.27	0.38	0.40
épicatéchine *(m/z 289)*	catéchine	**0.097**	**0.094**	0.071	0.057	0.058	0.052
isoquercétine *(m/z 463)*	flavonoïde	**1.91**	1.42	1.31	1.40	1.30	1.71
kaempférol-3-glucoside *(m/z 447)*	flavonoïde	**0.98**	0.76	0.64	0.61	0.63	0.85
rutine *(m/z 609)*	flavonoïde	**0.32**	0.27	0.21	0.19	0.18	0.24
resvératrol *(m/z 227)*	stilbène	**0.022**	0.012	0.008	0.015	0.014	0.016

La teneur en colupulone passe ainsi de 0,96 pour l'échantillon non tamisé à 1,82 mg/g MS pour les fractions granulométriques inférieur à 180 µm. Un comportement similaire est observé pour les autres composés.

Il apparaît clairement que le PTC conduit à un enrichissement important chez le houblon pour les 2 classes granulométriques (50-100 µm et 100-180 µm). Le comportement

de chacun des composés varie, par exemple les chalconoïdes et les acides amers atteignent leurs teneurs maximales dans les fractions entre 50 et 180 µm, tandis que les flavonoïdes et le stilbène sont plus concentrés dans la fraction 50-100 µm.

2.6 Lierre grimpant

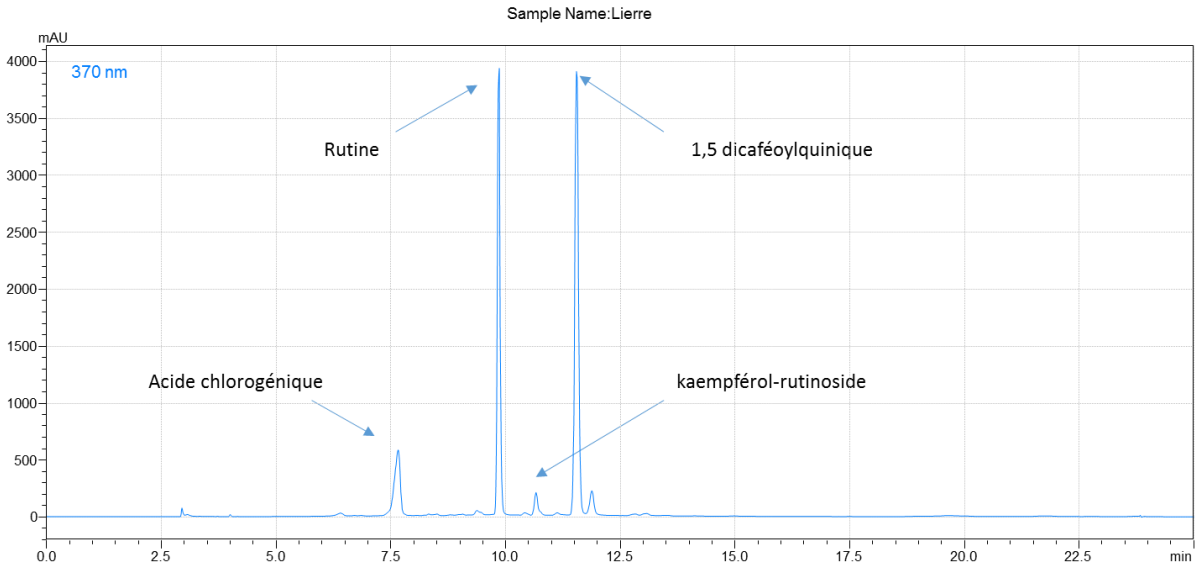
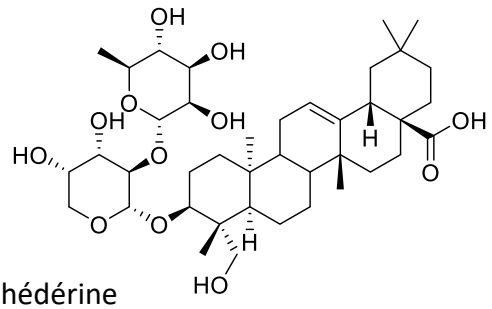


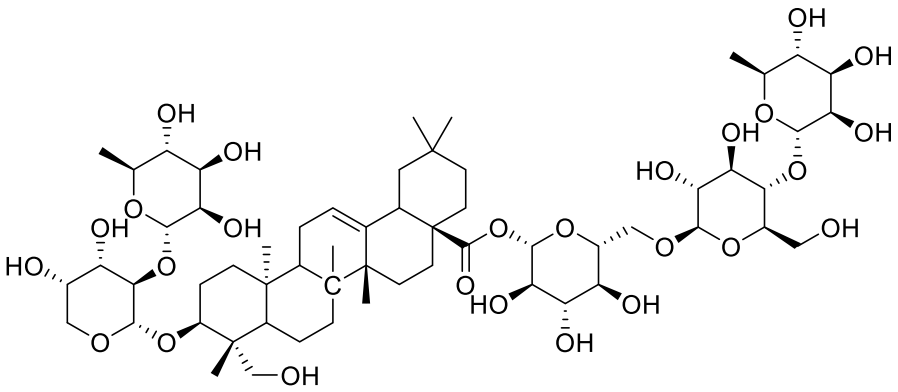
Figure 56 : Chromatogramme UV de la fraction 50-100 µm.

Le chromatogramme (figure 56) montre peu de composés dans l'extrait du lierre. L'absence de chromophore sur les composés de la famille des saponines ne permet pas de les détecter par PDA, d'où la nécessité de la spectrométrie de masse pour caractériser ces composés.

Le chromatogramme ci-dessous montre les composés dans l'extrait hydro-méthanolique du lierre pour la fraction 20-50 µm. L'α-hédérine est caractérisée par sa masse ionique *m/z* 749, obtenue par le spectre de masse (figure 58). La quantification des différents composés est étudiée par rapport aux standards.



α-hédérine



Hédéracoside C

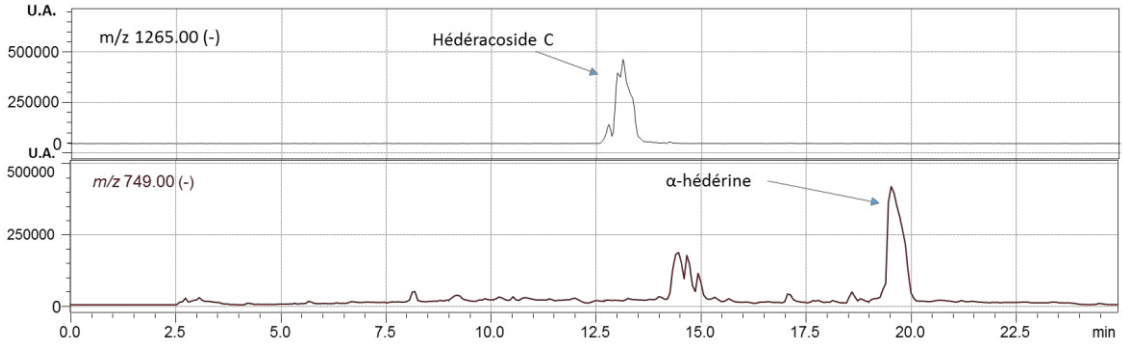


Figure 57 : Chromatogrammes de l'α-hédérine et de l'hédéracoside C en mode négatif de la fraction 50-100 µm.

Le chromatogramme montre plusieurs pics intenses, on peut vérifier l'α-hédérine soit pas discrimination avec les autres pics en UV soit par le temps de rétention de l'étalon spécifique.

Six composés actifs du lierre ont été dosés, ils sont reportés dans le tableau 10. Les familles des acides phénoliques, des flavonoïdes et des triterpènes saponines.

Tableau 10: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres du lierre

Composé actif (*m/z*)	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)						
		20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	**1.99**	1.87	1.86	1.73	1.76	1.55	1.57
acide 1.5 dicaféoylquinique (515)	acide phénolique	**2.83**	2.55	2.54	2.31	2.27	2.07	1.82
kaempférol-rutinoside (593)	flavonoïde	0.16	**0.22**	**0.22**	0.20	0.17	0.14	0.14
rutine (609)	flavonoïde	0.70	**0.82**	**0.86**	0.79	0.73	0.65	0.63
α-hédérine (749)	triterpène saponin	**1.21**	1.04	**1.15**	1.10	1.11	0.96	0.49
hédéracoside C (1219)	triterpène saponin	3.22	**3.99**	**4.11**	3.45	3.05	2.21	1.59

Pour les acides phénoliques (acide chlorogénique et acide dicaféoylquinique) et l'α-hédérine, la fraction 20-50 µm conduit aux teneurs les plus élevées. Les flavonoïdes (kaempférol-rutinoside et rutine) et l'hédéracoside C ont une tendance similaire à celle de l'activité antioxydante avec un maximum au niveau granulométrie 100-180 µm (figure). La plante non tamisée conduit systématiquement aux valeurs les plus faibles. Enfin, la fraction > 500 µm donnent les résultats les plus faibles pour les poudres. Un enrichissement différentiel est observé pour le lierre. Suivant le composé sélectionné, les classes granulométriques 20-50 µm, 50-100 µm et 100-180 µm conduisent aux teneurs les plus élevées. L'hédéracoside C est détecté sous la forme d'un adduit d'acide formique $[M+HOO]^-$ d'où l'apparition dans le spectre de masse du rapport m/z avec un valeur de 1265 au lieu du 1219 en mode négatif.

2.7 Achillée millefeuille

La figure 58, montre le profil des différents composés, dont l'identification de quelques-uns d'entre eux est validée à l'aide de leurs standards.

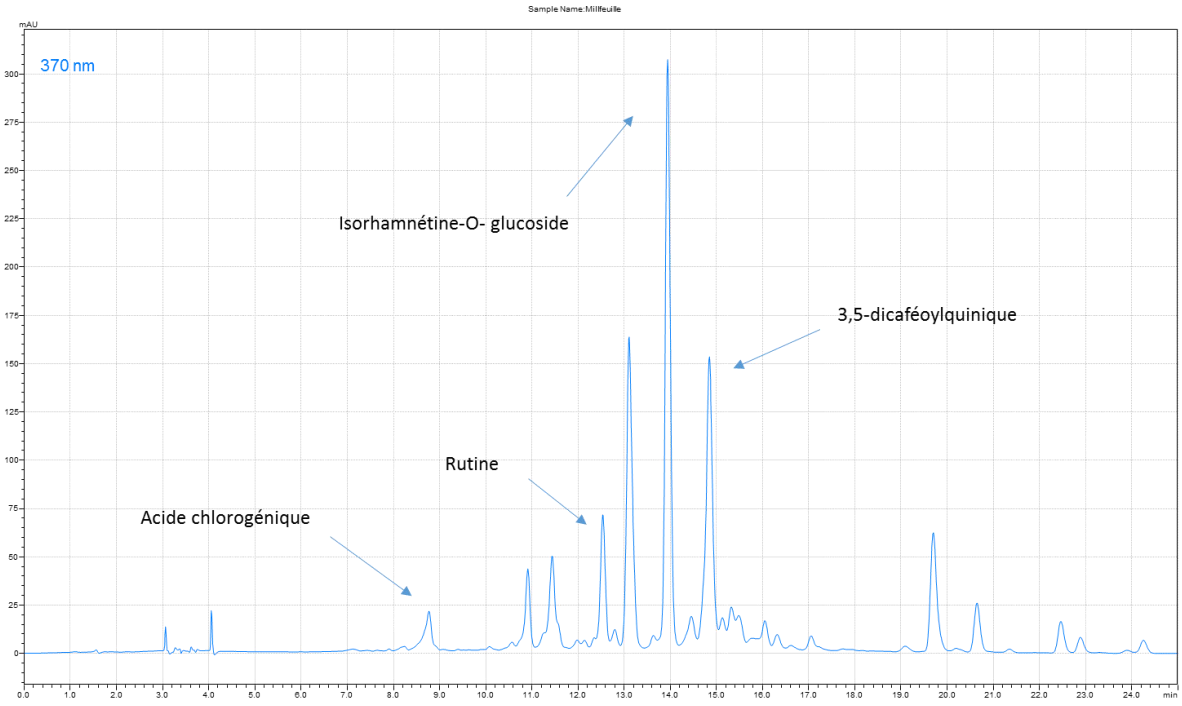
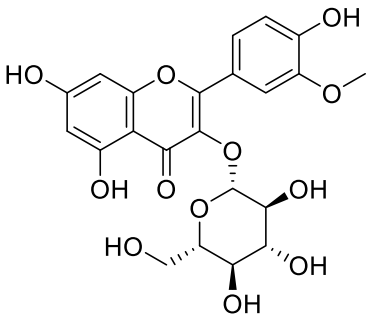
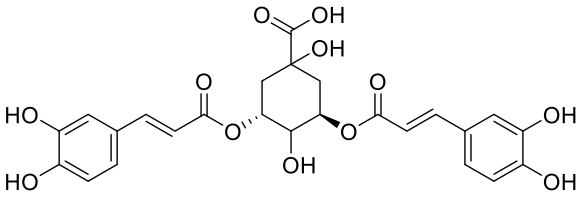


Figure 58 : Chromatogramme des analyses UV de la fraction 180-315 µm.

Le spectre de masse dans le cas des extraits des parties aériennes du millefeuille sert pour la caractérisation et la quantification des composés.



Isorhamnetine-3-O-glucoside



Acide 3,5-dicaféoylquinique

L'un des composés majeurs du millefeuille est l'acide 3,5-dicaféoylquinique caractérisé par spectrométrie de masse.

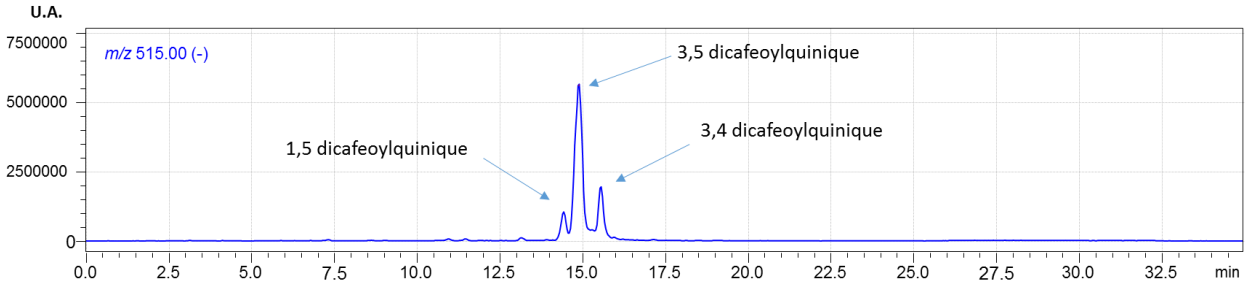


Figure 59 : chromatogramme Acide 3,5 dicaféoylquinique, LC-ESI / MS en mode négatif de la fraction 180-315 µm.

Le chromatogramme montre 3 signaux à la masse *m/z* 515 qui sont les isomères 1,5 et 3,4 de l'acide 3,5 dicaféoylquinique. Les étalons ont permis de confirmer que le signal le plus intense est celui de l'acide 3,5-dicaféoylquinique.

Les résultats des composés actifs du millefeuille sont rassemblés dans le tableau 12.

Tableau 11 : teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres de l'achillée millefeuille.

		Concentrations (mg/g de matière sèche)						
Composé actif (*m/z*)	Famille	20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	2.12	1.95	2.29	**2.81**	2.45	2.37	2.65
acide 3.5 dicaféoylquinique (515)	acide phénolique	6.80	7.05	7.16	**7.97**	7.36	6.54	7.63
lutéoline-7-O-glucoside (447)	flavonoïde	3.75	4.40	**5.49**	**5.90**	5.82	4.55	5.52
apigénine-7-O-glucoside (431)	flavonoïde	2.03	3.24	4.81	**5.21**	4.65	4.44	4.61
rutine (609)	flavonoïde	1.64	1.64	**2.16**	1.93	1.83	1.46	1.71
isorhamnétine-O-glucoside (477)	flavonoïde	6.55	8.08	**10.52**	9.98	9.29	7.73	8.67

Pour l'achillée millefeuille, le PTC enrichit principalement les classes granulométriques : 100-180 µm et 180-315 µm. Le tableau 12 révèle que la 3-méthylquercétine-O-glucoside encore appelée isorhamnétine-O-glucoside est le composé majoritaire chez le millefeuille. La

teneur de cette molécule est maximale (10,52 mg/g MS) dans la fraction 100-180 µm. La fraction non tamisée et la fraction supérieure à 500 µm donnent des valeurs plus faibles. La fraction 20-50 µm contient la plus faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

2.8 Piloselle

La figure ci-dessous montre le profil PDA spécifique des extraits hydro-méthanolique des parties aériennes de la piloselle.

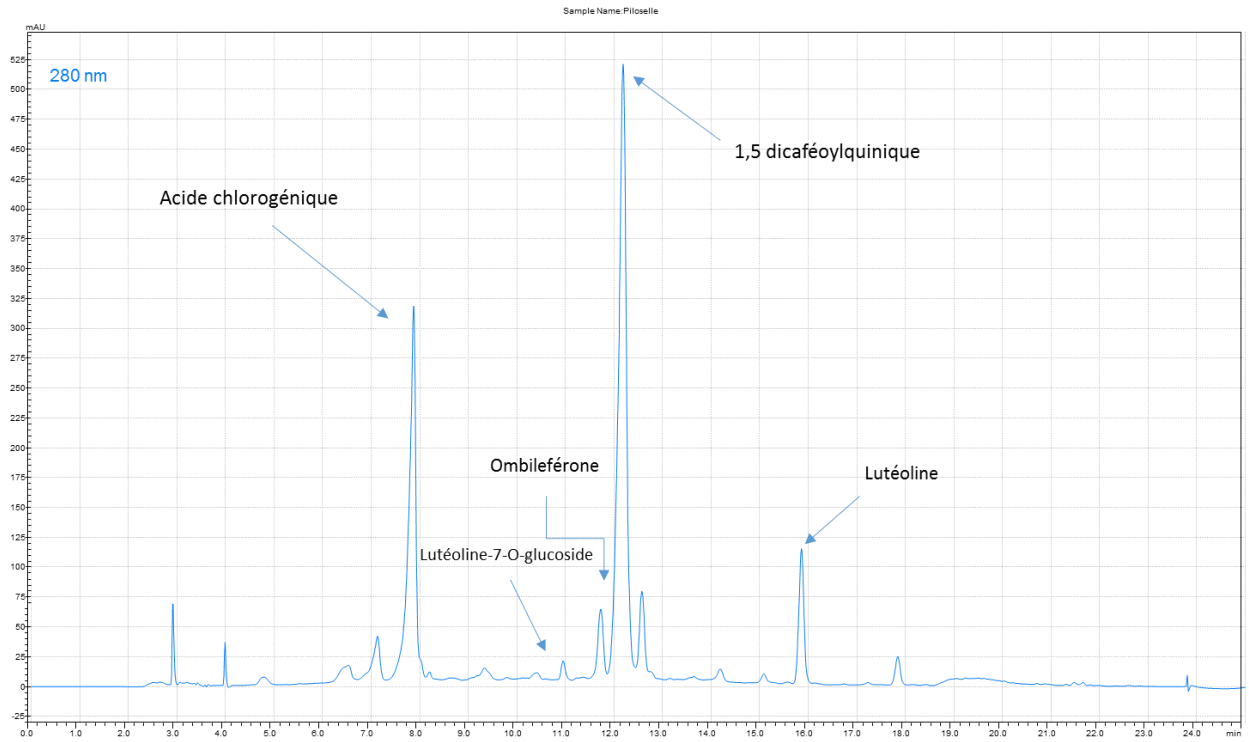


Figure 60 : Chromatogramme des analyses UV de la fraction 180-315 µm.

Ce chromatogramme en plus des polyphénols et des flavonoïdes, met en évidence la présence de l'ombelliférone qui appartient à la famille des coumarines. Cette dernière est caractérisée et quantifiée par spectrométrie de masse. La lutéoline est éluée bien plus loin que la lutéoline-7-O-glucoside, qui correspond à sa forme hétéroside. L'absence du glucose abaisse fortement la polarité ce qui a pour effet d'augmenter son temps de rétention.

L'ombelliférone est le composé caractéristique de la piloselle. Le chromatogramme ci-dessous montre un signal intense pour la fraction granulométrique 180-315 µm pour le temps de rétention 12,2 min (figure 61). Cette molécule est caractérisée par la masse ionique *m/z* 161 en mode négatif.

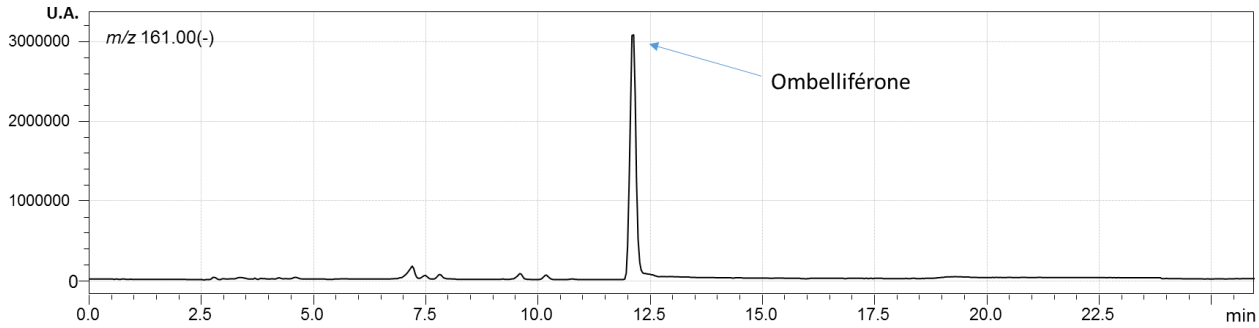
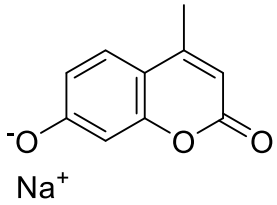


Figure 61 : Chromatogramme Ombelliférone, LC-ESI / MS en mode négatif de la fraction 180-315 µm.



Ombelliférone

Tableau 12: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres de la piloselle.

Composé actif *(m/z)*	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)						
		20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	5.49	5.68	5.82	6.51	**7.78**	7.56	5.64
acide 1.5 dicaféoylquinique (515)	acide phénolique	5.64	5.76	5.70	6.39	**6.97**	6.35	3.45
ombelliférone (161)	coumarine	1.01	0.92	0.95	**1.46**	**1.36**	0.95	0.87
lutéoline (285)	flavonoïde	1.82	1.95	1.93	**2.67**	**2.72**	2.11	1.61
lutéoline-7-O-glucoside (447)	flavonoïde	0.45	0.48	0.48	**0.62**	**0.68**	0.49	0.41
quercitrine (447)	flavonoïde	0.23	0.28	**0.30**	**0.32**	**0.30**	0.26	0.22

Les fractions dont la granulométrie entre 180 et 500 µm donnent les concentrations les plus élevées. La teneur en ombelliférone, composé spécifique de la piloselle, augmente de 56% et 68% dans les fractions 315-500 µm et 180-315 µm respectivement. Ces résultats montrent également un fort enrichissement de la teneur en acide 1,5 dicaféoylquinique quel que soit la fraction granulométrique choisie, cette teneur passe de 3,45 mg/g MS à 6,97 mg/g MS.

2.9 Fenouil

2.9.1 LC-MS

Le chromatogramme UV (figure 62) du fenouil montre la séparation des différents composés phénoliques des extraits des graines de fenouil.

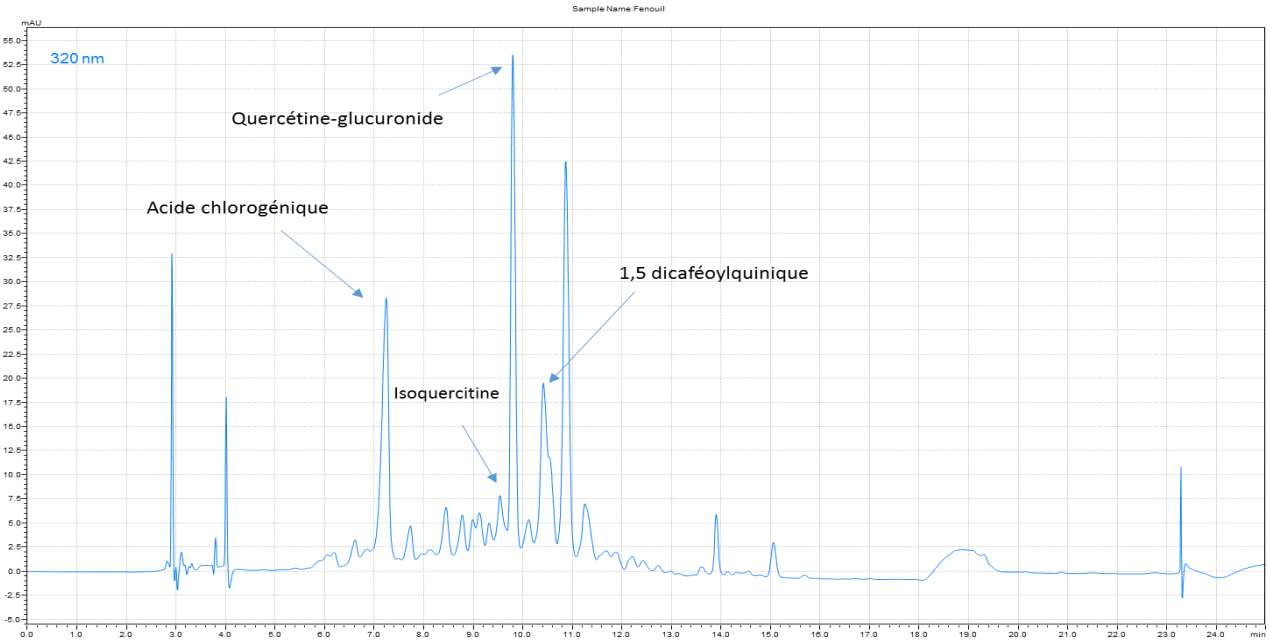
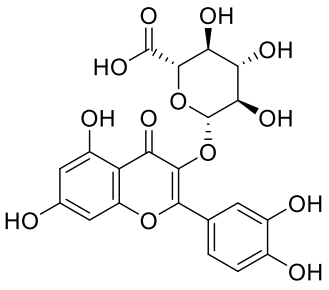
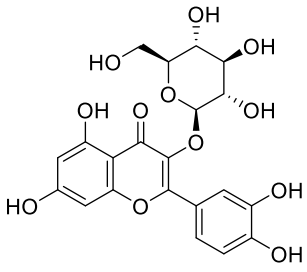


Figure 62 : Chromatogramme UV de la fraction 100-180 µm.

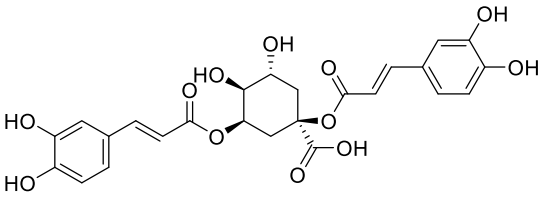
Le composé majoritaire identifié est l'acide quercétine-glucoronide. Le profil du chromatogramme indique la présence en faible quantité de l'acide chlorogénique, de l'isoquercitine et de l'acide 1,5 dicaféoylquinique.



Quercétine-O-glucuronide



Isoquercitine



Acide 1,5-dicaféoylquinique

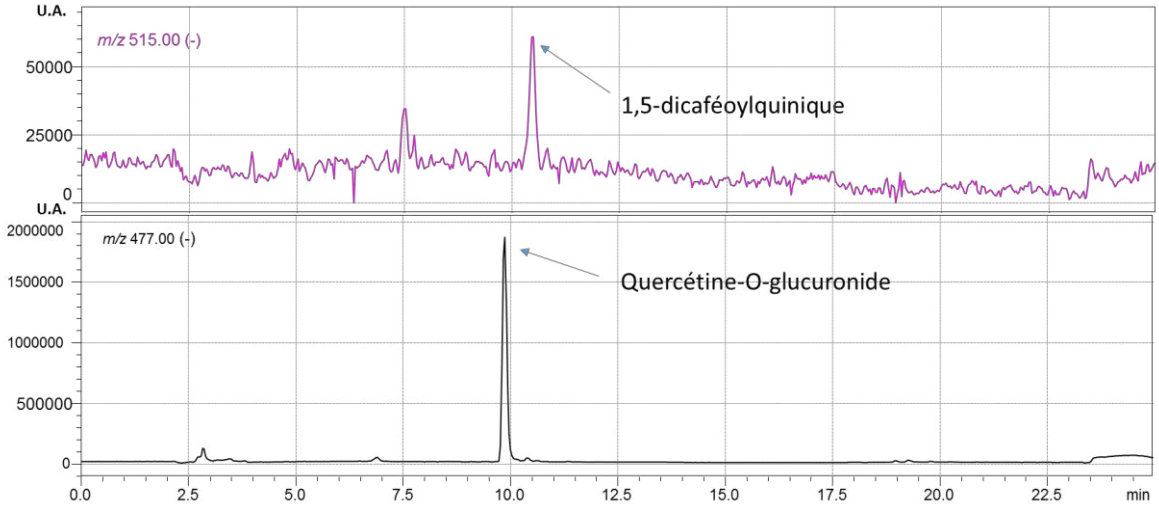


Figure 63 : Chromatogramme Quercétine-O-glucuronide LC-ESI / MS en mode négatif de la fraction 100-180 µm.

Le chromatogramme de la figure 63 montre que la quercétine-O-glucuronide est élué à 9,85 min et l'acide dicaféoylquinique est 10,5 min. Le spectre de masse et le spectre UV sont comparés aux standards correspondants pour leur quantification. Le chromatogramme qui caractérise ce composé montre l'apparition d'un signal intense en mode négatif pour le rapport de masse *m/z* 477, qui correspond au quercétine-O-glucuronide.

L'acide 1,5-dicaféoylquinique est l'isomère le plus intense dans ces extraits. Les composés dosés sont reportés dans le tableau 13.

Tableau 13: teneurs des marqueurs identifiés par LC-MS au sein des extraits des poudres du fenouil.

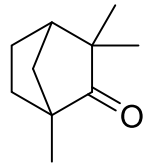
Composé actif (*m/z*)	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
		100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	0.01	**0.02**	0.01	0.01	0.01
acide 1.5 dicaféoylquinique (515)	acide phénolique	**0.48**	**0.47**	0.35	0.14	0.30
quercétine-glucuronide (447)	flavonoïde	**2.10**	**1.92**	1.48	0.59	1.33
isoquercétine (463)	flavonoïde	**0.23**	**0.23**	0.17	0.07	0.14

Les teneurs associées au fractionnement supérieur à 500 µm ne représentent que 30 à 35 % des teneurs maximales. De plus, elles sont inférieures à celles de la fraction non tamisée. Hormis la fraction supérieure à 500 µm le fractionnement par voie sèche permet d'obtenir une meilleure extraction comparée à la plante non tamisée.

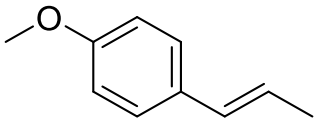
2.9.2 GC-MS

Tableau 14: teneurs des terpènes identifiés par GC-MS au sein des extraits des poudres du fenouil.

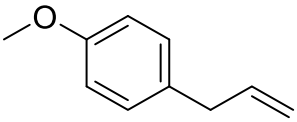
Composé actif (M•+)	Concentration (µg/g de matière sèche)			
	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
D-Limonène	3.19	**5.11**	4.60	3.97
Fenchone	0.84	**0.97**	0.73	0.71
Estragole	17.10	**17.90**	15.90	14.90
Anéthole	0.52	**0.57**	0.48	0.43



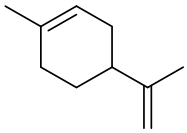
Fenchone



Anéthole



Estragole



Limonène

Les résultats obtenus par les analyses GC-MS montre que la plus grande quantité de terpènes est isolée dans la fraction granulométrique 315-500 µm. A l'inverse des polyphénols et des flavonoïdes où le maximum était contenu dans les poudres plus fines.

2.10 Ortie

Le profil du chromatogramme PDA (figure 65) des extraits hydroalcoolique des parties aériennes de l'ortie montre la présence de l'acide chlorogénique, de l'acide caféoylmalique, de la quercétine-O-glucoside et de l'acide férulique

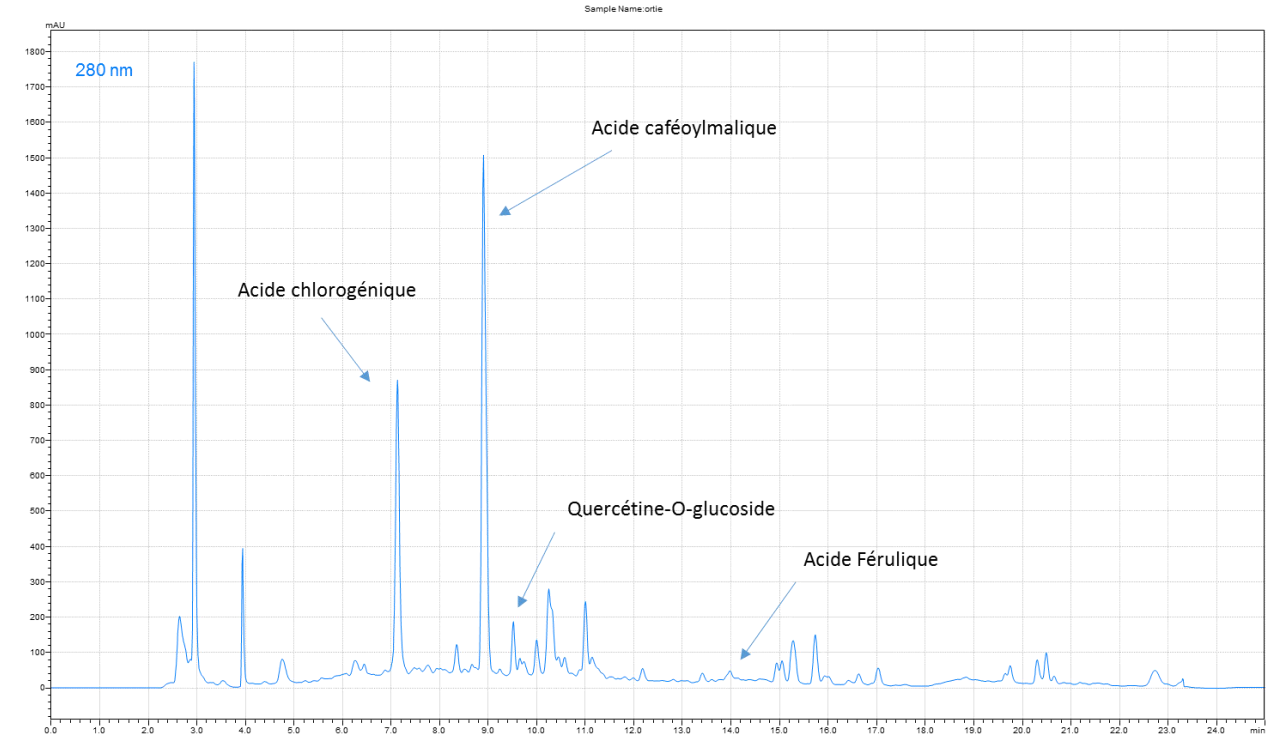
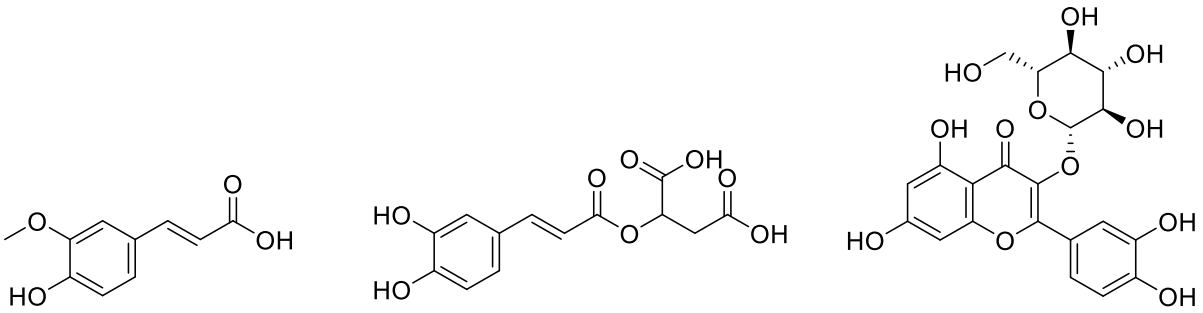


Figure 64: Chromatogramme UV de la fraction 180-315 µm.



Le composé spécifique de l'ortie est l'acide férulique qui est enrichi dans les fractions granulométriques comprises entre 180 µm et 500 µm. Plusieurs pics apparaissent pour le rapport masse sur charge *m/z* 193 (figure 66), mais l'acide férulique est identifié par son temps de rétention à 14,2 min, équivalent à celui de son étalon.

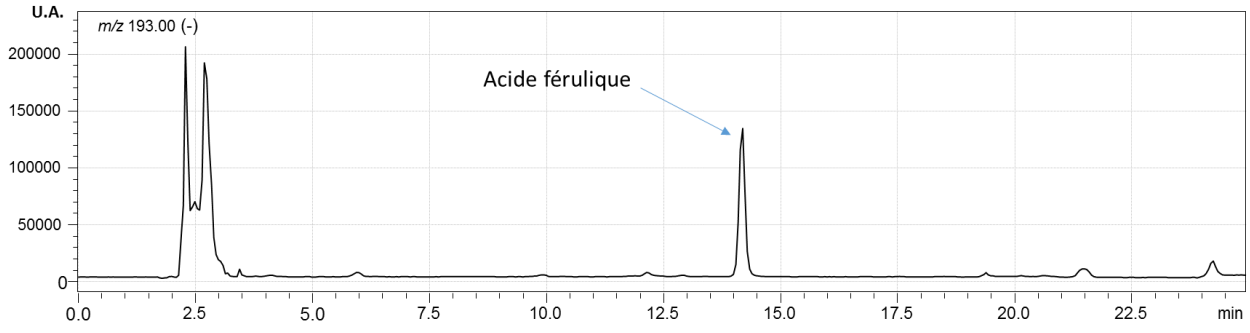


Figure 65 : Chromatogramme Acide férulique des analyses LC-ESI / MS en mode négatif de la fraction 180-315 µm.

On remarque que l'ortie est une plante qui ne contient pas de nombreux composés phénoliques. Cependant, par spectrométrie de masse, 9 composés ont été caractérisés : l'acide caféique (*m/z* 179), l'acide férulique (*m/z* 194), l'acide chlorogénique (*m/z* 353) l'acide p-coumarique (*m/z* 163), l'acide caféoylmalique (*m/z* 295), le quercétine-O-glucoside (*m/z* 463), le kaempférol-rutinoside (*m/z* 593) et la rutine (*m/z* 609), et l'isorhamnétine-rutinoside (*m/z* 623) mais tous en faible quantité. Plusieurs pics apparaissent pour le rapport masse sur charge *m/z* 193 mais l'acide férulique est caractérisé son temps de rétention, équivalent à celui de son étalon.

Tableau 15: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres de l'ortie.

Composé actif (*m/z*)	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)						
		20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
acide férulique (194)	acide phénolique	0.230	0.240	0.310	**0.340**	**0.350**	0.270	0.260
acide caféique (179)	acide phénolique	0.012	0.010	0.011	0.012	0.012	**0.012**	0.010
acide chlorogénique (353)	acide phénolique	0.402	0.431	0.500	**0.549**	**0.564**	0.521	0.421
acide *p*- coumarique (163)	acide phénolique	0.079	0.083	0.106	**0.112**	**0.109**	0.096	0.099
acide caféoylmalique (295)	acide phénolique	0.810	0.840	0.940	**1.010**	**1.050**	0.960	0.840
quercétine-O-glucoside (463)	flavonoïde	1.170	0.960	0.960	1.060	**1.080**	0.990	0.610
kaempférol-rutinoside (593)	flavonoïde	0.065	0.055	0.052	0.058	**0.064**	**0.064**	0.043
rutine (609)	flavonoïde	0.470	0.460	0.420	0.460	**0.510**	**0.540**	0.240
isorhamnétine-rutinoside (623)	flavonoïde	0.190	0.180	0.200	**0.220**	**0.230**	0.210	0.160

Ce tableau montre un enrichissement de 20% et 25%, en acide caféoylmalique pour les fractions 180-315 µm et 315-500 µm respectivement. Le procédé de fractionnement différentiel permet d'augmenter les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de la fraction 315-500 µm.

2.11 Scrofulaire noueuse

La figure 67 représente les signaux observés pour les différents composés contenus dans les extraits hydro-méthanoliques des parties aériennes de la scrofulaire noueuse.

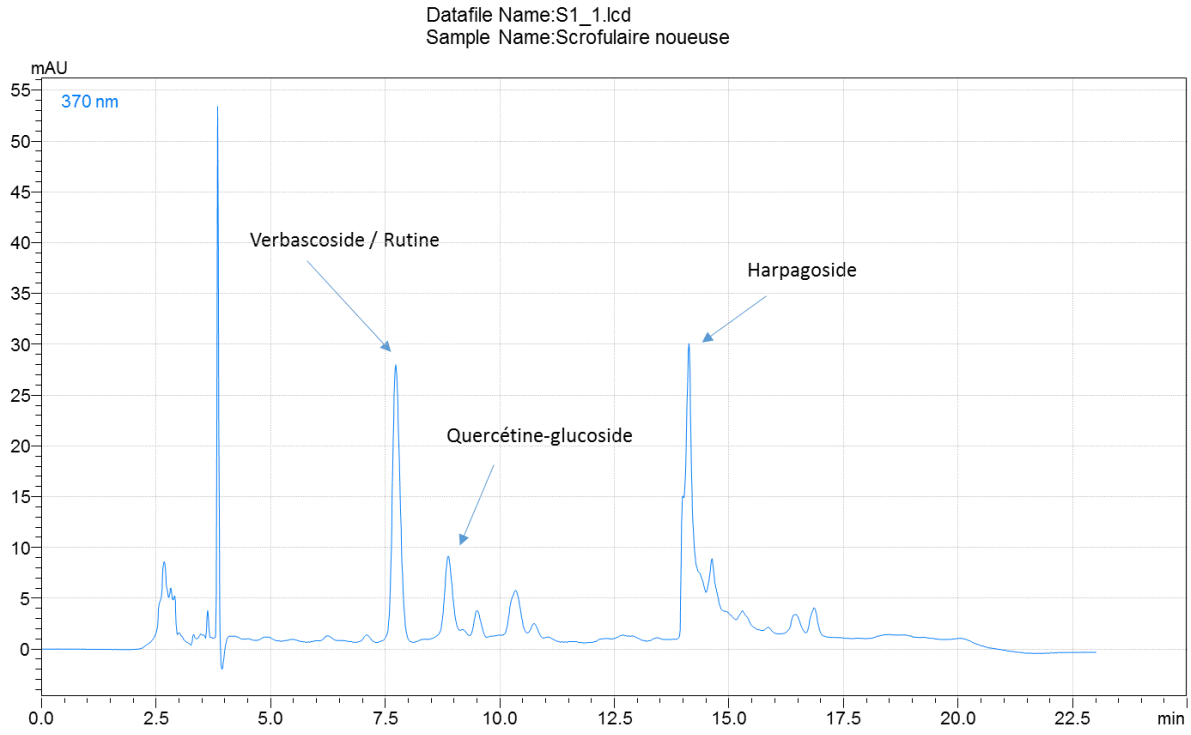


Figure 66 : Chromatogramme UV de la fraction 50-100 µm.

Ce chromatogramme montre qu'il est difficile d'identifier certains composés à cause d'une coélution. En effet, la rutine et la verbascoside, deux composés majeurs de cette plante sont élués avec le même temps de rétention à 7,9 min, pour les différencier on utilise la spectrométrie de masse.

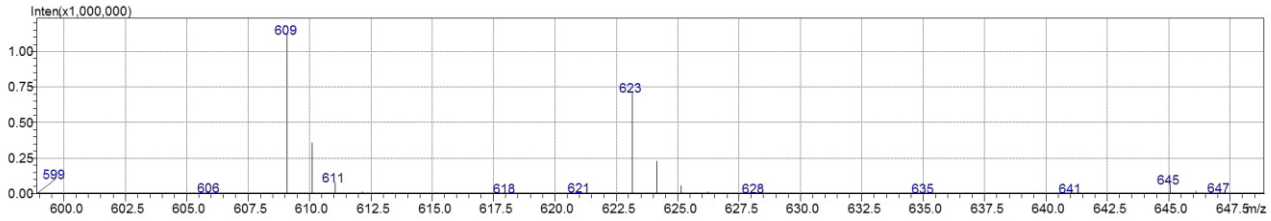
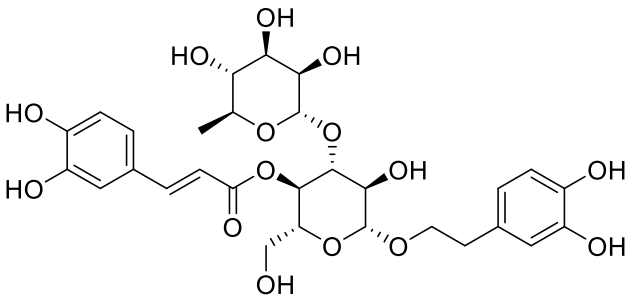
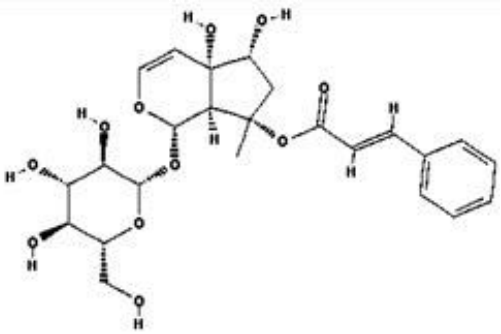


Figure 67 : Spectre de masse de la rutine et du verbascoside qui sont élués en même temps.

Le spectre de masse au temps de rétention 7,9 min (figure 67) montre effectivement la présence de la rutine (*m/z* 609) et du verbascoside (*m/z* 623). Dans le chromatogramme MS (figure 68), le verbascoside apparait ainsi seul au rapport *m/z* 623. Un autre signal est observé à 15,5 min, l'analyse de l'étalon a permis de valider son identification au temps 7,9 min.



Verbacoside



Harpagoside

La figure ci-dessous montre le signal obtenu MS pour le rapport de masse *m/z* 439 d'où on remarque que l'harpagoside sort sans coélution avec d'autre composé à cette masse. Tandis que, dans le cas de la verbacoside, plusieurs traces d'isomères avec la même masse moléculaire m/z 623 apparaissent, mais la verbacoside est identifié par son standard.

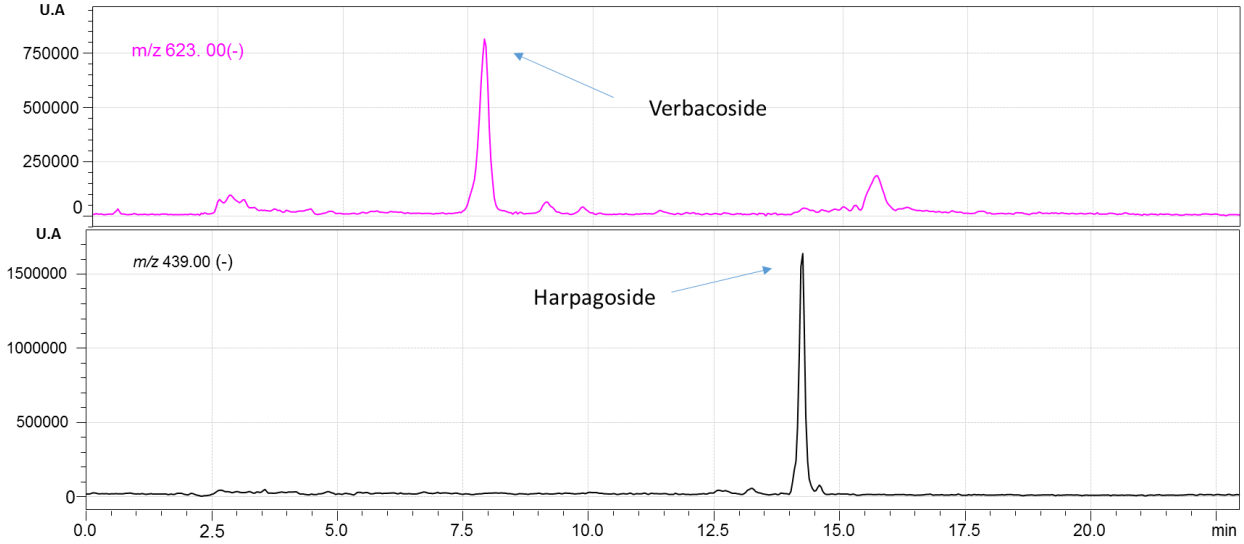


Figure 68 : Chromatogrammes Verbacoside et Harpagoside LC-ESI / MS en mode négatif (50-100 µm).

Trois familles moléculaires sont représentées pour cette plante lors des analyses LC-PDA/MS : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les iridoïdes. Les résultats des dosages de 4 molécules actives présentes chez la scrofulaire noueuse sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres de la scrofulaire.

Composé actif (*m/z*)	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)					
		20-50µm	50-100µm	100-180µm	180-315µm	315-500µm	Non tamisé
acide caféique (179)	acide phénolique	0.037	0.039	**0.044**	0.041	0.041	0.038
quercétine-O-rhamnoside (447)	flavonoïde	0.041	0.041	**0.052**	0.049	0.032	0.027
quercétine-O-glucoside (463)	flavonoïde	0.191	0.211	**0.258**	**0.262**	0.184	0.146
rutine (609)	flavonoïde	0.517	0.608	**0.625**	**0.628**	0.485	0.393
harpagoside (493)	iridoïde glycoside	27.640	**29.320**	**28.560**	25.170	23.220	25.620
verbascoside (623)	iridoïde glycoside	3.910	4.360	**5.050**	4.470	4.240	3.300

La scrofulaire noueuse contient spécifiquement de l'harpagoside, en quantité importante et de la verbacoside, composés qui appartiennent à la famille des iridoïdes. Le PTC a permis une augmentation de 14% de la teneur en harpagoside.

Pour cette plante, les concentrations les plus faibles sont mesurées systématiquement pour les parties de plante non tamisées. Les 6 composés étudiés suivent la même tendance. Les fractions qui permettent d'obtenir la plus grande quantité de composés sont avec des granulométries comprises entre 100-180 µm et 180-315 µm. Pour la quercétine-glucoside et la rutine, le rendement d'extraction est légèrement supérieur pour la fraction 180-315 µm que pour celle de 100-180 µm.

2.12 Rosier des chiens

Le chromatogramme en figure 70 montre la séparation des différents composés polaires identifiés dans les fruits du rosier des chiens. Le signal le plus intense est relatif à l'hypéroside temps de rétention t_R= 12,2 min. Des traces de catéchine, de rutine et de quercétine-O-glucoronide.

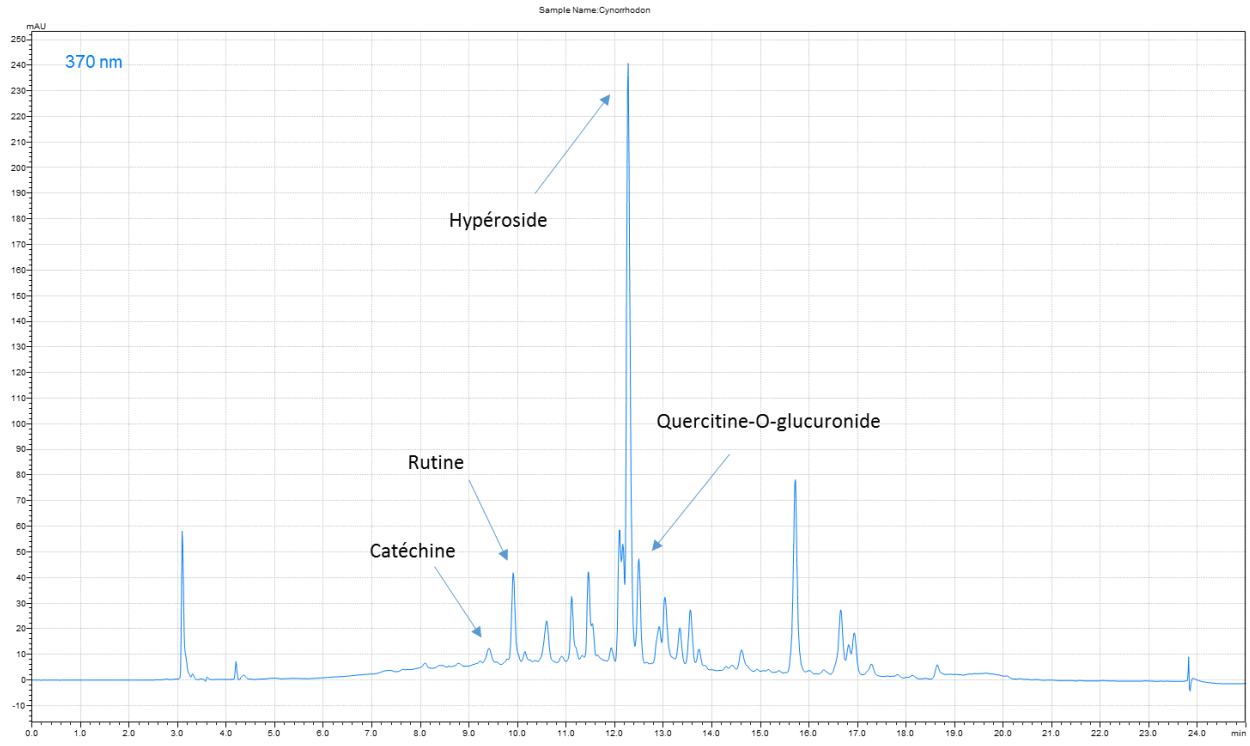
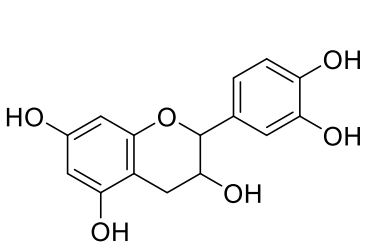
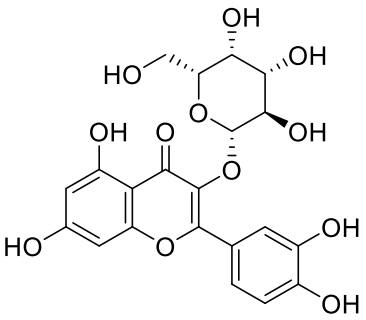


Figure 69 : Chromatogramme UV de la fraction 180-315 µm



catéchine



Hypéroside

Le chromatogramme extrait pour les masses 463 et 289 (figure 70) indique le signal relatif à l'hypéroside et à la catéchine respectivement.

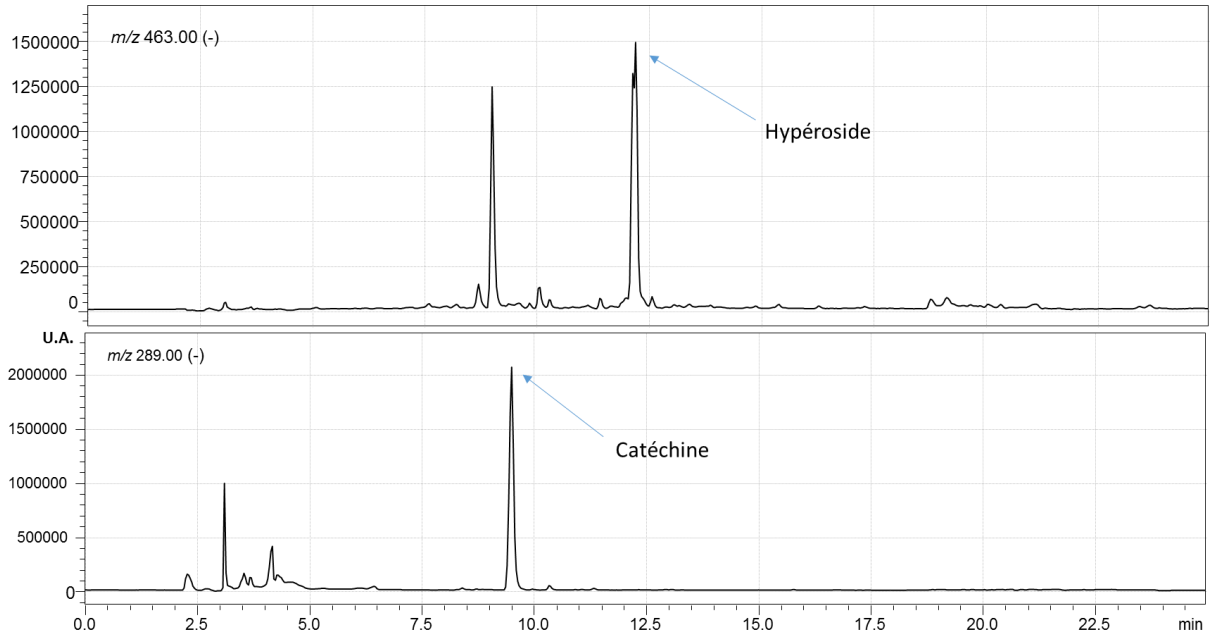


Figure 70 : Chromatogrammes Hypéroside et Catéchine LC-ESI / MS en mode négatif de la fraction 180-315 µm.

Le pic le plus intense au temps de rétention t_R = 9,57 min est définie comme associé à la catéchine, d'après les caractéristiques du spectre UV et au temps de rétention du standard.

Tableau 17: teneurs des marqueurs identifiés au sein des extraits des poudres du rosier des chiens.

Composé actif (*m/z*)	Famille	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
		100-180µm	180-315µm	315-500µm	>500µm	Non tamisé
catéchine (289)	flavonoïde	**0.128**	**0.130**	0.079	0.036	0.025
hypéroside (463)	flavonoïde	0.155	**0.196**	0.169	0.153	0.122
quercétine-O-glucuronide (477)	flavonoïde	0.082	**0.125**	0.113	0.113	0.107
rutine (609)	flavonoïde	0.006	**0.009**	**0.008**	0.008	0.009
acide gallique (169)	acide phénolique	0.100	**0.110**	0.080	0.040	0.040
procyanidine B2 (577)	tannin	0.200	**0.210**	0.100	0.030	0.020
procyanidine B1 (577)	tannin	1.130	**1.090**	0.570	0.140	0.080

Pour les fruits du rosier des chiens, un acide phénolique, 2 tannins et 4 flavonoïdes ont été quantifiés. Tout comme la catéchine, ils sont plus concentrés dans les fractions 100- 180 µm et 180-315 µm.

2.13 Conclusion

L'ensemble des résultats montre que, comparé aux échantillons de plantes non tamisés, le procédé de séparation différentiel améliore la concentration des composés analysés quel que soit la plante étudiée. Ceci confirme l'hypothèse de Baudelaire E., (2013) en ce qui concerne l'aptitude du procédé de broyage / tamisage successif pour séparer les composés bioactifs situés dans la matrice végétale.

Les analyses LC-ESI/MS ont permis d'observer une distribution différentielle des composés bioactifs selon la taille de particules. Les petites granulométries ainsi que les granulométries intermédiaires selon les cas sont les plus intéressantes. La granulométrie > 500 µm est la seule qui conduit systématiquement à une baisse significative des valeurs. A l'aide d'images SEM (scanning electron microscope) Zhao et al., (2015) rapporte que la cellule végétale est détruite lors du processus de broyage superfin. Un autre exemple montre que l'acide férulique est piégé dans la matrice de la paroi cellulaire dans le cas du son de blé. La destruction de la paroi cellulaire augmente l'accessibilité de acide férulique, et donc d'améliore sa capacité antioxydante (Rosa et al., 2013). Les molécules bioactives sont expulsées à l'extérieur de la cellule végétal lors du broyage et dans l'étape suivante de tamisage lors du procédé PTC une répartition différentielle des composés bioactifs se ferait en fonction de la granulométrie.

Enfin, les analyses GC-MS ont confirmé la présence de terpènes chez le basilic et le fenouil. Toutefois, les poudres les plus fines contiennent moins d'huiles essentielles que les fractions intermédiaires et les grandes granulométries. Ceci peut être due à la physiologie végétale, en effet, ces composés sont présents à l'intérieur des vésicules et pourraient se dégrader lors durant le processus du PTC.

Chapitre III : Activité anti-acétylcholinestérase

1 Test d'Ellman

1.1 Mode opératoire

L'étude de l'activité anti-AChE est réalisée selon la méthode développée par Ferreira et al. (2006), Amessis-Ouchemoukh et al. (2014) et Ouchemoukh et al (2014). Ainsi, nous avons introduit successivement dans chaque tube : 650 µL d'une solution tampon de tris-HCl (50 mM d'hydroxymethyl aminomethane à pH = 8), 50 µL de l'extrait méthanolique de la plante à différentes concentrations et 5 µL de la solution enzymatique contenant 0,26 unités/mL et préparée dans la solution tampon de Tris-HCl à pH = 8.

Ensuite, les tubes incubent durant 15 minutes à 25 °C. La réaction est déclenchée par l'ajout de 75 µL de la solution d'ATCI à 15 mM (Acétylthiocholine iodide) et de 250 µL de réactif d'Ellman, le DTNB à 3 mM (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate). Dix minutes plus tard, l'absorbance du mélange est déterminée à 405 nm. Le contrôle négatif est réalisé de la même manière avec du méthanol à la place de l'extrait de plante.

Une courbe étalonnage est réalisée au préalable à partir de la galanthamine, le contrôle positif.

1.2 Résultats

Dans cette partie nous donnons les résultats obtenus lors des travaux expérimentaux réalisés par le test d'Ellman. Ce dernier a montré des activités anti-acétylcholinestérases faibles pour l'ensembles des 11 plantes, excepté pour le saule blanc, montrant des valeurs d'activité proches de celle de la galantamine. En effet, les résultats du test d'Ellman des extraits des poudres du saule blanc ont montré des valeurs significatives. L'activité anti-acétylcholinestérase des différentes classes granulométriques est rapportée dans la figure 71.

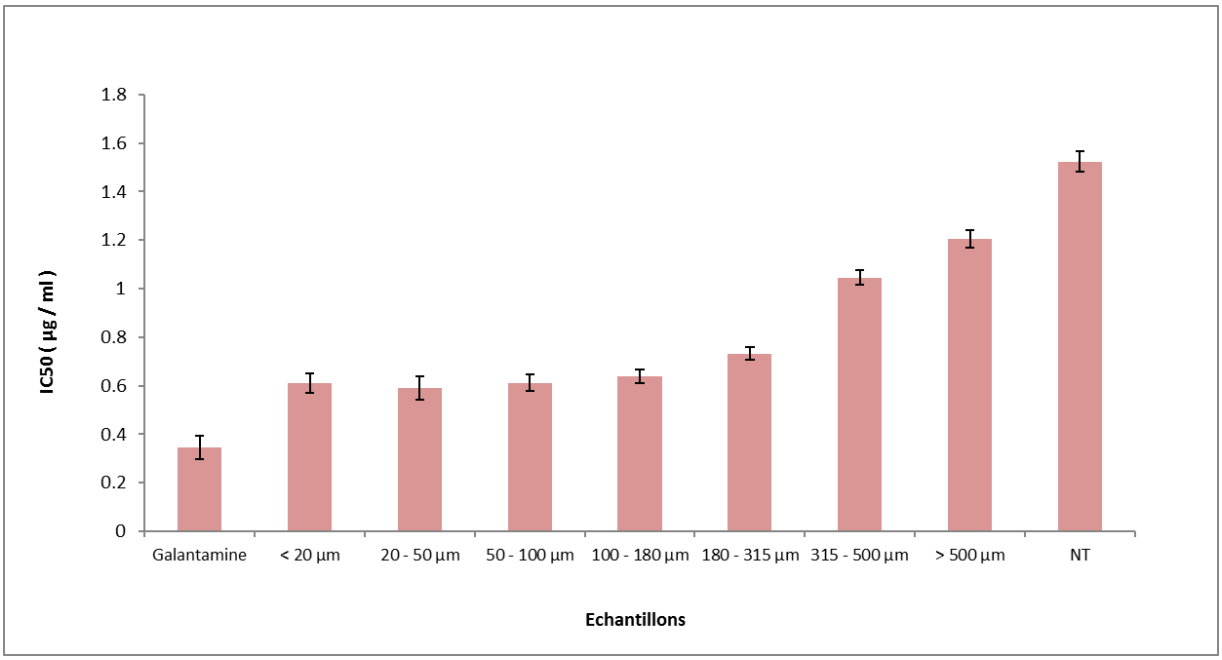


Figure 71 : Anti-AChE (CI50) des différentes classes granulométriques de l'écorce du saule blanc et galantamine.

Les poudres superfines donnent une activité anti-AChE plus grande avec un IC50 de 0.6 µg/mL et la plus faible activité anti-AChE (IC50 = 1,52 µg/mL). Même si l'échantillon contrôle de référence, la galantamine, a montré une inhibition plus forte de l'AChE (IC50 = 0,34 µg/mL), il reste un médicament synthétique, nos extraits étant obtenus à partir de matériel végétal. La valeur IC50 maximale des extraits hydroalcooliques est très importante, en comparaison avec les meilleures valeurs obtenues par (Gomathi & Manian, 2015) pour l'écorce du Scolopia de crenata, IC50 = 9,20 µg/mL et par (Erdogan-Orhan, Altun, Sever-Yilmaz, & Saltan, 2011) pour l'extrait Viburnum de lantana, avec une valeur de IC50 = 50 µg/mL. Ces extraits des poudres de *Salix alba* (L.) constituent une alternative naturelle potentielle pour le traitement des effets neurologiques de la maladie d'Alzheimer. En outre, une forte corrélation a également été remarqué entre l'activité anti-AChE (IC50) et le teneur en polyphénols totaux avec un coefficient de Pearson de -0.77, montrant une forte corrélation négative : quand le teneur en polyphénols augmente dans les poudres, l'activité anti-AChE augmente). Cette dernière information permet de relier la présence de la salicine et des polyphénols à l'activité anti-acétylcholinestérase. Cela a été confirmé par d'autres corrélations obtenues entre les valeurs IC50 anti-AChE et les teneurs en composés bioactifs (coefficients de Pearson de -0.74 avec la salicine, -0.64 avec la catéchine, -0.76 avec la gallocatéchine et -0.60 avec l'acide chlorogénique), ce qui renforce l'importance d'identifier et de quantifier les composés bioactifs dans les extraits étudiés. Ces fortes corrélations montrent qu'il pourrait y avoir un

effet synergique entre la salicine et polyphénols pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Erdogan-Orhan et al. (2011) ont rapporté que la salicine et les extraits au méthanol de Viburnum inhibent l'AChE. Dérivé de la salicine, le salicylate, inhibe de manière irréversible l'activité enzymatique par l'intermédiaire de son site anionique catalytique (CAS), par interaction avec la sérine (Choi et al., 2015). Etant donné que le site catalytique de l'AChE possède plusieurs sérines et il se pourrait que la salicine inhibe son action enzymatique par une liaison hydrogène avec la serine. Pour visualiser ces liaisons nous avons choisi d'utiliser des outils de modélisation moléculaire.

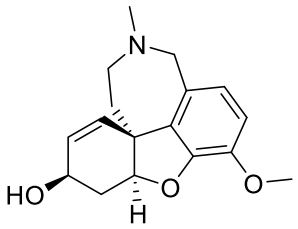
2 Criblage virtuel par Docking moléculaire

2.1 Principe du Docking

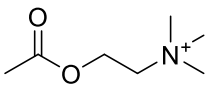
Le Docking moléculaire joue un rôle primordial pour définir les acides aminés qui interviennent dans le processus de reconnaissance du ligand et de l'identification du site actif.

Ces techniques mettent en jeu des structures cristallographiques d'enzymes disponibles en 3D et à l'aide de la modélisation, la molécule peut être choisi pour être adapté au site actif à condition que l'interaction molécule-enzyme soit maximale.

Notre but est d'utiliser le Docking moléculaire pour prévoir la capacité de certains de nos composés à inhiber l'activité de l'AChE. Parmi les molécules capables d'inhiber l'AChE, nous avons choisi comme modèle la galantamine. En effet cette dernière est un alcaloïde qui est déjà utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En effet, la galanthamine est connue pour sa capacité à augmenter le taux d'acétylcholine et à diminuer sa dégradation en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton et al., 2006).



Galanthamine



Acéthylcholine

Les logiciels de Docking sont des outils largement utilisés en chimie, biologie, pharmacie et en médecine où la plupart des principes actifs sont des petites molécules qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique

(récepteur). Il est utilisé pour Comprendre comment un ligand s'attache ou interagit avec une cible protéique (AChE) afin de l'inhiber ou l'activer est d'une importance capitale dans la recherche et l'industrie pharmaceutique (Krid, 2008).

Dans l'étude actuelle, les logiciels utilisés sont Autodock vina 1.0.3 (Trott and Olson, 2010), et Pymol « The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, L » (PyMOL). Autodock vina 1.0.3 est utile pour l'amarrage flexible, dans lequel toutes les obligations de base rotatives de ligands sont autorisées à subir une rotation libre (Trott and Olson, 2010).

Les composés avec plusieurs liaisons hydrogène et leurs longueurs qui ne dépassent pas 3,2 A° sont considérées comme fortes (Rajagopal and Vishveshwara, 2005). Plus, l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la molécule est faible, plus le potentielle d'interaction.

Le docking moléculaire est utilisé pour rationaliser les liaisons entre un ligand et un récepteur. Comme a rapporté Reddy et al. (2016), une évaluation de l'accueil approfondie est appliquée pour détecter la meilleure stratégie de réception en utilisant plusieurs programmes d'accueil différents : AutoDock 4 (Morris et al., 2009), AutoDock Vina (Trott and Olson, 2010), VEGA ZZ, et Pymol. Ce dernier est le programme de visualisation préférable, il montre la meilleure performance pour lier un composé analogue à l'acétylcholine, confirmant sa capacité à prédire la liaison d'un composé (ligand) dans la protéine (enzyme), validant ainsi sa fixation (Derabli, 2016).

L'enzyme avec son ligand sont apportés à partir d'une banque de données PDB (Protein Data Bank, http://www.pdb.org). La structure cristalline de l'enzyme acétylcholinestérase est téléchargé à partir PDB ID : 3SV6. Toutes les molécules d'eau sont enlevées et le ligand natif est supprimé pour le rendre prêt pour la modélisation. Les composés moléculaires sont conçus en 3D par VEGA ZZ 3.0.5 (Vistoli et al., 2010), ce dernier permet également d'ajuster le champ de force de la molécule « AMBER », la charge atomique appliquée « Gasteiger » et la minimisation de l'énergie utilisée « MOPAC ». Autodock vina 1.0.3 (Trott and Olson, 2010) est appliqué pour l'amarrage de toutes les molécules et PyMol, pour la visualisation et l'étude des liaisons hydrogènes.

2.2 Résultats théoriques *in silico* : modélisation par le Docking

2.2.1 Interaction galantamine – AChE

La figure 72 obtenue via le logiciel PyMol montre une forte interaction entre l'acétylcholinestérase et la galanthamine, notre composé de référence. La figure 72 montre un chevauchement intégral des données PDB et de la galanthamine *re-docked*, ce qui indique la précision de notre modélisation.

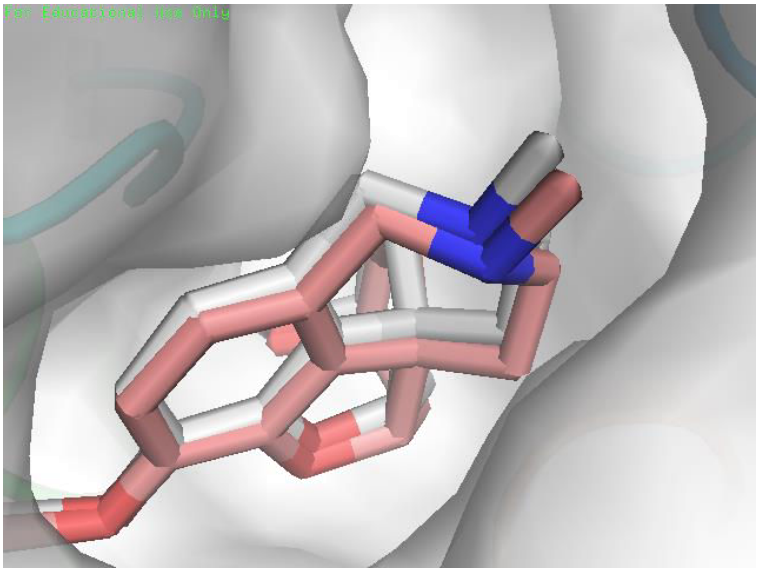


Figure 72: ligand Co-cristallisée (rose), re-docked ligand (blanc). (Pymol)

Comme mentionné avant, la galantamine est prise comme référence, nos résultats sont comparés à cette molécule qui est connue comme inhibiteur très actif pour l'AChE. En réalisant l'amarrage moléculaire « Docking » avec des logiciels spécifiques, ces derniers nous ont permis d'avoir un complexe formé par les deux entités la galantamine et l'AChE dont l'énergie d'interaction est de -10,5 Kcal /mol montrant ainsi la stabilité du complexe visualisé par PyMOL. Les figures 73 et 74 illustrent les interactions entre la galanthamine et la protéine. La première montre que la galantamine est fixée dans le site anionique catalytique (CAS). La deuxième montre cinq liaisons d'hydrogène dans le site actif entre la galantamine et l'AChE. Ce qui confirme l'efficacité de la galantamine dans l'inhibition de la dégradation de l'acétylcholine. En effet, ce dernier ne peut plus se fixer dans cette gorge de l'enzyme comme le montrent les figures 73 et 74.

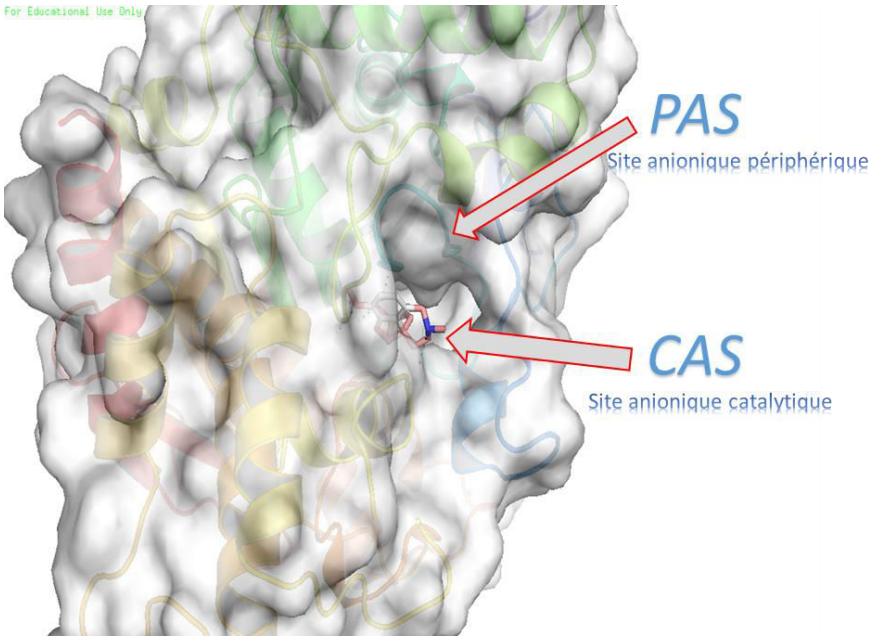


Figure 73: Interaction AChE – Galantamine (rose et bleu) dans le site actif de l'enzyme. (Pymol)

Le ligand a été relié dans la partie la plus profonde du site actif de l'enzyme (CAS). La gorge du site actif de l'acétylcholinestérase est de 20 Å comprend plusieurs acides aminés parmi eux il y a le Glutamate, l'Histidine, le Serine (figure 74).

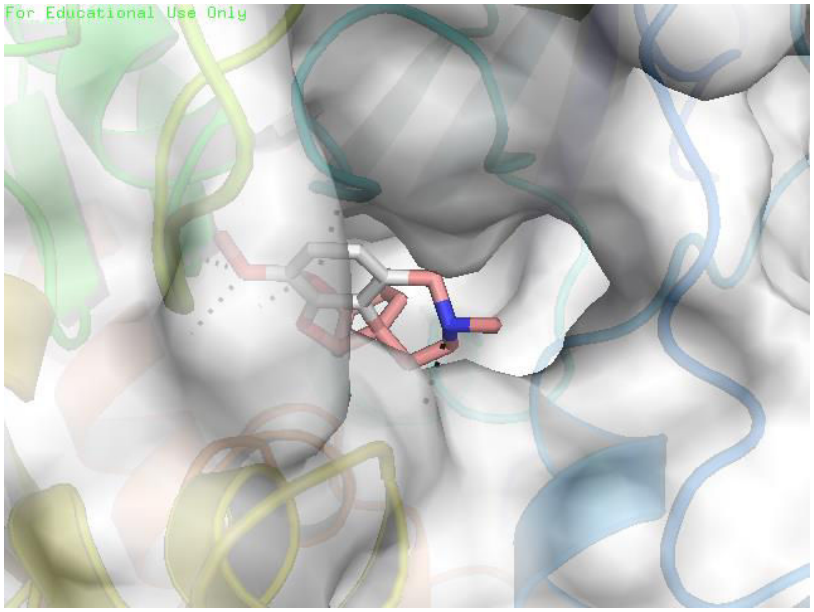


Figure 74: Représentation des liaisons d'hydrogènes formées entre la molécule galantamine et l'AChE en noire. (Pymol)

Les résultats des calculs issus de cette modélisation sont reportés dans le tableaux 18.

Tableau 18: différents paramètres de liaison hydrogène entre l'enzyme (AChE) et la galantamine.

Galantamine		Nombres des liaisons H = 5	
acide aminée	Type de liaison H	Longueur de liaison H (Å)	Angle de liaison H (°)
Tyrosine 337	accepteur	2,8	109,2
Glutamine 202	accepteur	2,1	122,4
Serine 203	donneur	2,5	102,3
Glycine 121	donneur	2,4	121,4
Histidine 447	donneur	3,3	77,2

On remarque qu'à l'exception d'histidine 447, toutes les liaisons hydrogènes sont considérés comme fortes car elles respectent les critères de stabilité.

2.2.2 Interaction catéchine – AChE

Après réalisation du criblage moléculaire entre la catéchine et l'AChE on remarque une forte affinité avec une énergie d'interaction de -9.2 Kcal /mol ce qui montre la stabilité du complexe.

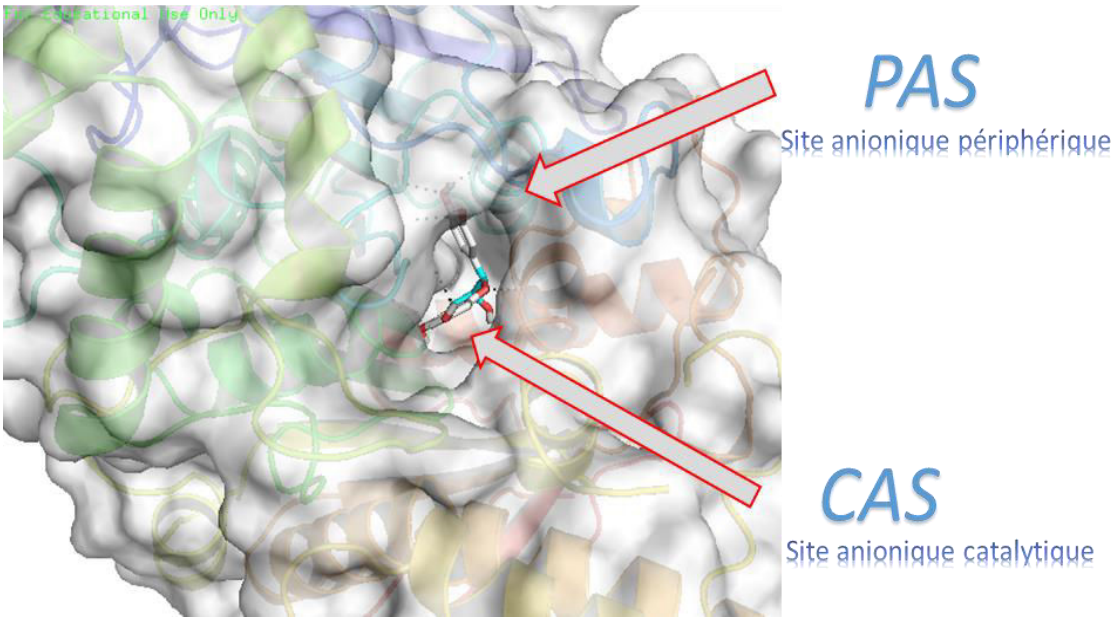


Figure 75: Interaction AChE - catéchine (rouge et bleu) dans le site actif de l'enzyme. (Pymol)

La figure 76 nous montre l'amarrage moléculaire résulte la fixation de la catéchine dans le site anionique catalytique (CAS) du site actif de la protéine. Tous ces résultats sont obtenus avec les mêmes processus utilisés pour la galantamine.

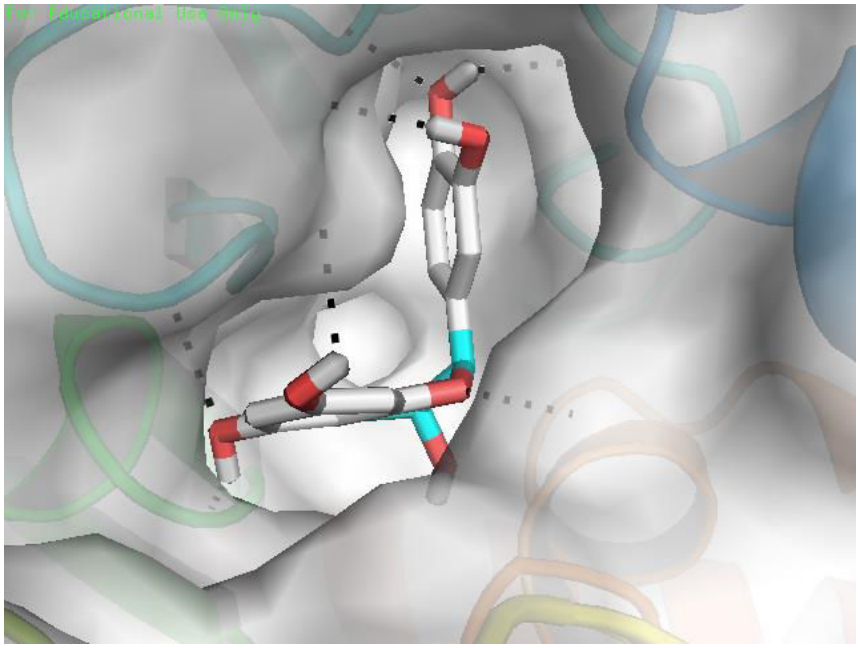


Figure 76: Représentation des liaisons hydrogènes formées par la molécule catéchine avec l'enzyme en noire. (Pymol)

La catéchine présente une forte interaction avec le site catalytique anionique (CAS) dans le gorge de l'ACHE, avec sept liaison hydrogènes. Dans le tableau ci-dessous on voit les différents paramètres obtenus d'après l'étude de criblage « Docking ».

Tableau 19 : différents paramètres des liaison d'hydrogène entre l'enzyme (AChE) et la catéchine.

Catéchine		Nombres des liaisons H = 7	
acide aminée	Type de Liaison H	Longueur de liaison (Å)	Angle de liaison H (°)
Tyrosine 337	accepteur	3,3	91,9
Tyrosine 124	donneur	2,7	120,3
Tryptophane 86	donneur	2,4	111,3
Serine125	donneur	2,4	134,0
Serine 203	donneur	2,2	145,2
Glycine 122	accepteur	2,1	154,7
Glycine 126	accepteur	2,0	138,2

On remarque que les liaisons hydrogène respectent toutes les critères de stabilité sauf dans le cas de la tyrosine 337 pour laquelle, longueur de la liaison est supérieure à 3 A° et l'angle dièdre est inférieur à 180°. Ce qui fait de la catéchine un bon candidat inhibiteur de l'ACHE.

2.2.3 Interaction salicine – AChE

L'étude de criblage moléculaire in silico continue sur la salicine qui est reporté par Erdogan-Orhan et al. en 2011 comme un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Le Docking montre aussi une bonne interaction entre l'enzyme et la salicine avec une énergie de - 7,7 Kcal /mol un peu moins forte que l'interaction trouvé avec la catéchine. Le même processus est utilisé pour comparer les différents résultats obtenus.

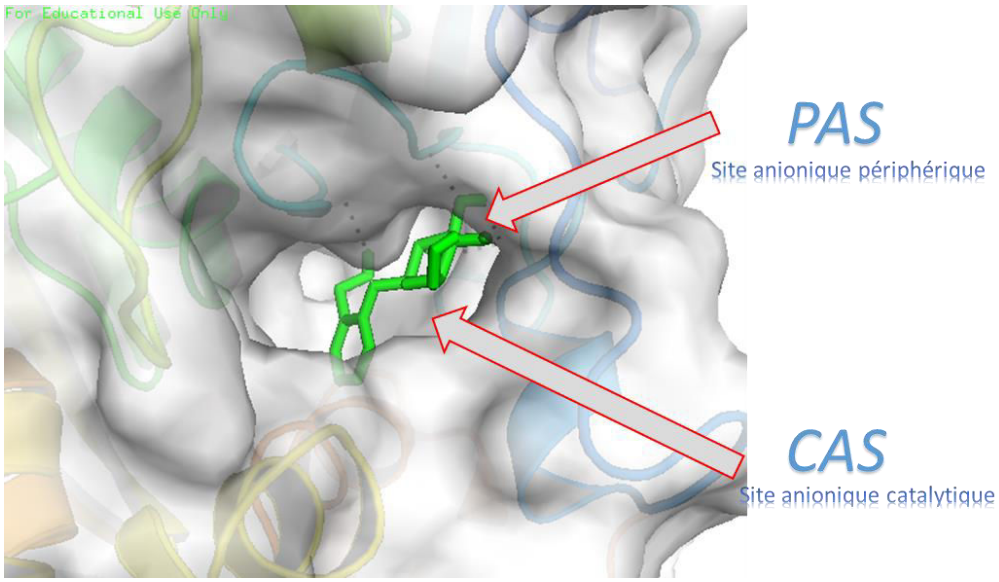


Figure 77: interaction AChE - salicine (vert) dans le site actif de l'enzyme. (Pymol)

La salicine présentait une forte interaction avec l'ACHE dans la gorge spécifique de l'acétylcholine, l'énergie d'interaction -7.7 Kcal /mol.

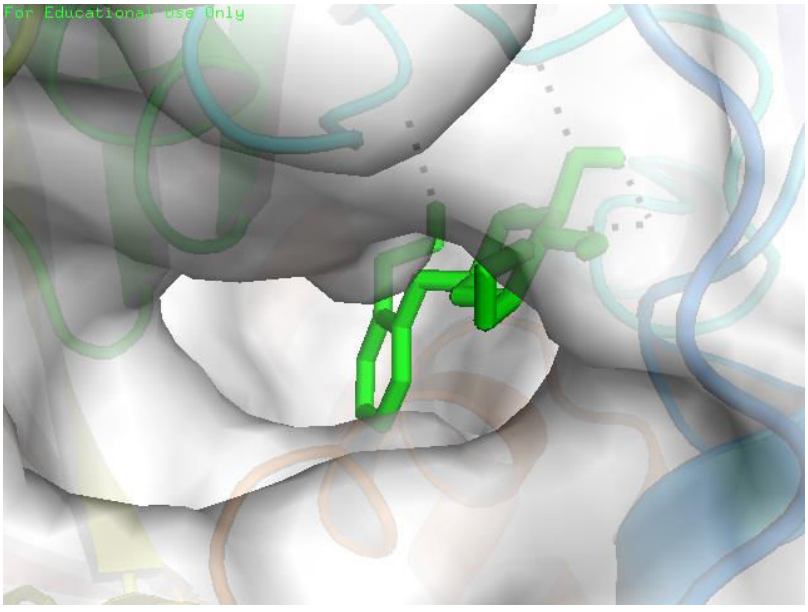


Figure 78: représentation des liaisons hydrogène formées par la molécule salicin et l'enzyme en noire. (Pymol)

Le nombre de liaisons hydrogène est de cinq, les acides aminées accepteurs d'hydrogène dans les ces liaisons sont : la sérine 203, et le tyrosine 337, tandis que les donneurs sont : la glycine 122, la glycine 121, et le tryptophane 86. Dans le tableau ci-dessous la longueur et l'angle dièdre de chacune des liaisons sont reportés.

Tableau 20: montre les différents paramètres des liaison d'hydrogène entre l'enzyme (AChE) et la salicine.

Salicine		Nombres des liaisons H = 5	
acide aminée	Type de liaison H	Longueur de liaison H (Å)	Angle de liaison H (°)
Tyrosine 337	accepteur	2,2	137,1
Tryptophane 86	donneur	2,6	143,8
Serine 203	donneur	2,4	155,7
Glycine 121	donneur	2,6	128,8
Glycine 122	donneur	2,0	164,3

Ce tableau montre des liaisons hydrogène fortes entre les acides aminés du site actif de l'enzyme et la salicine. Faisant de la salicine un inhibiteur de l'AChE de troisième classe après la galantamine et la catéchine.

La modélisation moléculaire *in silico* des composés actifs des extraits des poudres du saule blanc montre que la catéchine et la salicyline sont des bons inhibiteurs de l'enzyme (AChE). Ils empêchent l'acétylcholine de se fixer dans le site catalytique CAS. La règle de sommation de la pharmacologie peut être appliquée dans le cas où l'effet de deux composés ensembles résulte comme la somme de leurs effets. Mais on ne peut pas ignorer l'hypothèse de synergie, très courant dans les activités enzymatiques. Ce qui explique la bonne activité anti-acétylcholinestérase des extraits de l'écorce du saule blanc qui contiennent des fortes concentrations en catéchine et en salicyline.

Références

Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L.V., Serralheiro, M.L., and Araújo, M.E.M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Ind. Crops Prod. *53*, 6–15.

Baudelaire E. (2013). Brevet WO2013057379A1 - Procede ptc pour l'extraction par voie seche des principes actifs naturels.

Becker, L., Zaiter, A., Petit, J., Zimmer, D., Karam, M.-C., Baudelaire, E., Scher, J., and Dicko, A. (2016). Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of Hypericum perforatum and Achillea millefolium powders using successive grinding and sieving. Ind. Crops Prod. *87*, 116–123.

Butler, L.R.P., and Laqua, K. (2009). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-IX. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation of optical radiation (IUPAC Recommendations 1995). Pure Appl. Chem. *67*, 1725–1744.

Chen, G., and Chen, H. (2011). Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. Food Chem. *126*, 1934–1938.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., and Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. Food Chem. *194,* 135–142.

Derabli, C. (2016). Thèse: Synthèse et caractérisation de poly-hétérocycles bioactifs : Les quinolones, les quinazolines et les analogues fonctionnalisés de la Tacrine (Université Constantine 1 (Algérie).

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem. *97*, 654–660.

Erdogan-Orhan, I., Altun, M.L., Sever-Yilmaz, B., and Saltan, G. (2011). Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of Viburnum opulus and Viburnum lantana and their total phenol and flavonoid contents. J. Med. Food *14*, 434–440.

Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., and Araújo, M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J. Ethnopharmacol. *108*, 31–37.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S.I., and Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J. Food Compos. Anal. *24*, 1043–1048.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., and Barroso, C.G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. J. Chromatogr. A *1140*, 29–34.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. *30*, 2785–2791.

Muanda, F., ois, Kon&#xe9, Donatien, Dicko, A., Soulimani, R., and Younos, C. (2011). Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts. Evid. Based Complement. Alternat. Med. *2011*, enep109.

Muchuweti, M., Ndhlala, A.R., and Kasiamhuru, A. (2006). Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of Uapaca kirkiana fruit. Food Chem. *94*, 415–419.

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

Nojavan, S., Khalilian, F., Kiaie, F.M., Rahimi, A., Arabanian, A., and Chalavi, S. (2008). Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of Rosa canina L. fruit. J. Food Compos. Anal. *21*, 300–305.

Paul, M.K., and Mukhopadhyay, A.K. (2004). Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. Int. J. Med. Sci. *1*, 101–115.

Rajagopal, S., and Vishveshwara, S. (2005). Short hydrogen bonds in proteins. FEBS J. *272*, 1819–1832.

Reddy, D.N., Ballante, F., Chuang, T., Pirolli, A., Marrocco, B., and Marshall, G.R. (2016). Design and Synthesis of Simplified Largazole Analogues as Isoform-Selective Human Lysine Deacetylase Inhibitors. J. Med. Chem. *59*, 1613–1633.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., and Khalel, K.I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare L.) and chamomile (Matricaria chamomilla L.). Ind. Crops Prod. *44*, 437–445.

Rosa, N.N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., and Micard, V. (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. J. Cereal Sci. *57*, 84–90.

Scalbert, A. (1992). Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues. In Plant Polyphenols, R.W. Hemingway, and P.E. Laks, eds. (Springer US), 259–280.

Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M.J., and Mato, R.B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. Food Chem. *159*, 361–366.

Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem. *31*, 455–461.

Van Craeyveld, V., Holopainen, U., Selinheimo, E., Poutanen, K., Delcour, J.A., and Courtin, C.M. (2009). Extensive Dry Ball Milling of Wheat and Rye Bran Leads to in Situ Production of Arabinoxylan Oligosaccharides through Nanoscale Fragmentation. J. Agric. Food Chem. *57*, 8467–8473.

Vistoli, G., Pedretti, A., Mazzolari, A., and Testa, B. (2010). In silico prediction of human carboxylesterase-1 (hCES1) metabolism combining docking analyses and MD simulations. Bioorg. Med. Chem. *18*, 320–329.

Wafa, G., Amadou, D., Larbi, K.M., and Héla, E.F.O. (2014). Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of Ricinus communis L. Ind. Crops Prod. *56*, 43–51.

Zaiter, A., Becker, L., Karam, M.-C., and Dicko, A. (2016). Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. J. Food Sci. Technol. *53*, 2025–2032.

Zhao, X., Zhu, H., Zhang, G., and Tang, W. (2015). Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. Powder Technol. *286*, 838–844.

Zhu, F.-M., Du, B., and Li, J. (2013). Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace. Food Sci. Technol. Int. *20*, 55-62.

Zhu, F.M., Du, B., and Xu, B.J. (2015). Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less barley) grown in Qinghai-Tibet Plateau, China. Journal of Cereal Science. *65*, 43-47.

Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., and Tang, T. (2009). Analysis of Flavonoids in Portulaca oleracea L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. Food Anal. Methods *3*, 90–97.

Zhu, K., Huang, S., Peng, W., Qian, H., and Zhou, H. (2010). Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. Food Res. Int. *43*, 943–948.

Conclusion et perspectives

Une méthodologie d'analyse a été développée afin de caractériser les poudres superfines produites par le procédé PTC. L'identification et la caractérisation des composés actifs ont été effectuées par des analyses LC-MS et GC-MS, l'activité antioxydante a été évaluée par le test DPPH, l'ensemble des résultats montre que la composition des poudres superfines dépend de leur granulométrie. Pour la plupart des plantes, il apparait que plus la taille des particules est petite, plus les teneurs en composés d'intérêt sont fortes.

Pour toutes les plantes étudiées, le procédé PTC induit clairement un enrichissement en composés actifs pour certaines classes granulométriques, confirmant ainsi l'efficacité de cette méthode d'extraction. En effet, le broyage permet une meilleure accessibilité aux composés et le tamisage induit une répartition différentielle des composés actifs en fonction de la taille de particules.

Pour l'ensemble des plantes étudiées, la combinaison des procédés de broyage et de tamisage permet d'obtenir des classes granulométriques dans lesquelles, l'activité antioxydante augmente significativement. Le gain par rapport aux échantillons non tamisés peut conduire jusqu'au double dans le cas des parties aériennes de la piloselle pour la fraction 180-315 µm et de la scrofulaire pour la fraction 100-180 µm, voire jusqu'à trois fois pour les fruits du rosier des chiens pour la fraction 315-500 µm.

Dans le cas de l'écorce du saule blanc, la salicine qui est moins sensible à l'oxydation de l'air, se concentre dans les fractions de poudres les plus fines conduisant à une élévation de l'activité anti-AchE. L'évaluation de cette activité comparée à celle de la galanthamine, utilisée comme référence montre que le procédé PTC permet de séparer par voie sèche ce composé bioactif qui est utilisé contre les effets de la maladie d'Alzheimer. La modélisation moléculaire des interactions entre l'AChE et la catéchine d'une part et entre l'AChE et la salicine d'autre part ont été réalisées. Ces résultats comparés à celui de la modélisation moléculaire de l'interaction entre l'AChE et la galanthamine montrent pour la première fois que la catéchine et la salicine se fixent sur les mêmes sites. Ce qui pourrait expliquer que leur mode d'action soit similaire à celui de la galanthamine.

Cette étude qui a porté sur douze plantes de la Région Lorraine ouvre la voie à la possibilité d'étendre l'application du PTC à d'autres matrices végétales afin d'en extraire les composés bioactifs sans utiliser de solvants contrairement aux méthodes usuelles. Cela montre l'intérêt de cette procédure qui peut s'inscrire dans le cadre du développement de la chimie verte par la suppression de l'usage des solvants organiques lors des extractions des produits actifs. Nos résultats montrent, compte tenu du nombre de plantes étudiées que l'application de cette procédure d'extraction est généralisable à d'autres plantes d'intérêt d'origines diverses.

Cette étude a montré que pour les plantes dont la teneur en flavonoïdes est élevée, une perte significative de l'activité antioxydante des fractions granulométriques inférieures à 100 µm. Ce qui pourrait s'expliquer soit par une oxydation des particules fines, soit par l'élévation de la température lors du broyage. Pour lever ces ambiguïtés, il serait intéressant que notre équipe partenaire du LIBio effectue la production des poudres superfines en milieu inerte et à basse température.

Toujours dans le cadre du projet et dans le but de la validation du procédé PTC notre équipe partenaire de l'URAFPA II doit réaliser des études biologiques et toxicologiques sur les extraits des plantes. Ce qui permettrait de mettre en évidence les corrélations entre nos analyses chimiques qui ont porté sur des poudres superfines et l'activité biologique.

Par ailleurs, l'utilisation de l'extraction par voie sèche associée à la chromatographie préparative pourrait être une méthode efficace qui permettrai d'isoler des molécules caractéristiques d'une plante. La mise en place de ce couplage : extraction par voie sèche et chromatographie préparative, est en cours de développement sur de différents échantillons de feuilles de lierre afin d'isoler et de caractériser quelques une de ces saponines.

Les résultats de ce travail de thèse ont montré l'efficacité du PTC, il serait intéressant d'amplifier l'application de ce procédé au stade industriel. Pour cela, dans le projet EXTRAPOLE prévoit l'installation d'un pilote pour la production de poudres superfines en grande quantité (plusieurs kilogramme), car l'objectif de ce projet est l'exploitation de la flore de la région Lorraine dans le domaine des industries alimentaire, neutraceutique, cosmétique et / ou médical.

ANNEXES

Annexe 1

Le travail présenté dans l'annexe 1 est réalisé par le LIBIO (laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules), laboratoire partenaire du projet « EXTRAPOLE ».

Propriétés physico-chimique des fractions granulométriques

Propriétés granulométriques

La distribution granulométrique des poudres a été caractérisée (Tableau 1) par la taille moyenne (D50) et la dispersion de taille (span). Le D50 varie entre les différentes plantes malgré que la fraction est la même.

Tableau 1 : Comparaison des paramètres granulométriques entre la fraction non tamisée et la fraction 180 - 315 µm : les valeurs caractérisées par un astérisque correspondent à des distributions bimodal

	Fraction non tamisée		**Fraction 180 - 315 µm**	
Plante	D_{50} (µm)	Span	D_{50} (µm)	Span
Cynorrhodon	818 ± 3	2,23 ± 0,13	275 ± 2	1,70 ± 0,06
Fenouil	498 ± 9	2,08 ± 0,01	156 ± 0	1,72 ± 0,01
Houblon	375 ± 1	1,87 ± 0,04	282 ± 2	1,38 ± 0,01
Lierre	300 ± 3	2,57 ± 0,08	279 ± 0	1,02 ± 0,01
Millefeuille	1143* ± 102	1,93 ± 0,14	349 ± 2	2,30 ± 0,03
Millepertuis	438 ± 11	2,72 ± 0,38	311 ± 1	1,28 ± 0,01
Ortie	242 ± 5	2,13 ± 0,08	259 ± 1	1,24 ± 0,01
Piloselle	342 ± 4	2,20 ± 0,03	315 ± 2	1,16 ± 0,03
Saule	451* ± 2	3,44 ± 0,47	323 ± 3	1,61 ± 0,03
Scrofulaire	350 ± 4	2,67 ± 0,06	263 ± 1	1,11 ± 0,01

Teneur en eau et a_w

Cette analyse prend en compte différentes matrices végétales, il est vraisemblable que pour une même plante ces deux paramètres sont interdépendants.la fraction non tamisée contient plus d'eau sauf dans le cas du saule blanc.

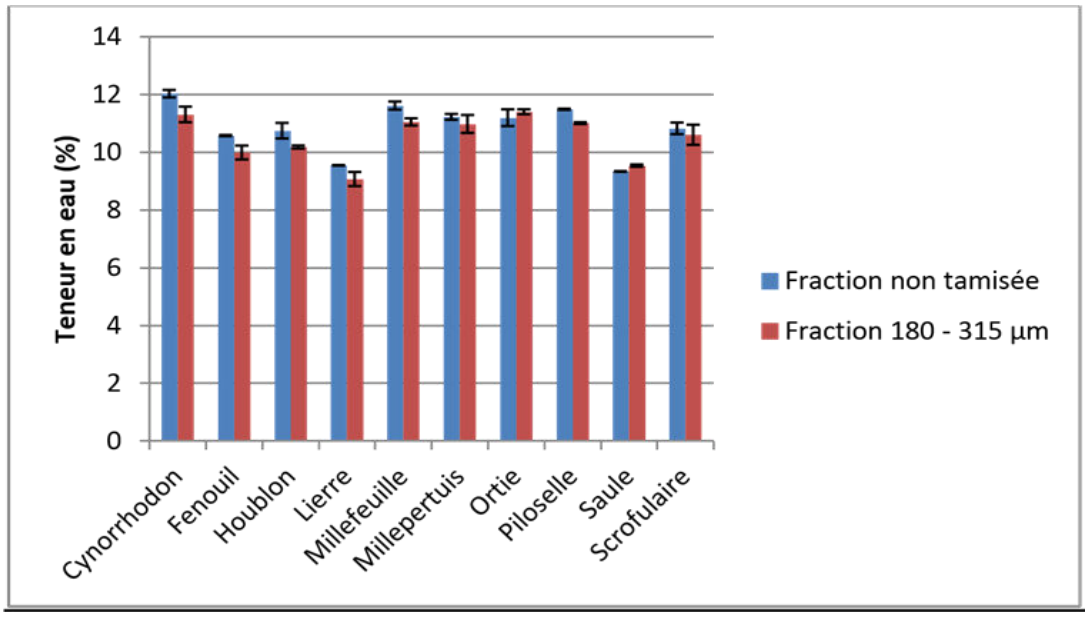


Figure 1 : Evaluation de la teneur en eau des fractions sélectionnées

Composition

Les poudres ont été caractérisées par leur composition en constituant principaux (protéines, lipides, minéraux et sucre) :

On voit des différences du teneur en protéines entre la fraction non tamisée et la fraction 180-315 µm d'où une augmentation dans le cas du cynorrhodon, du lierre, du millefeuille, du millepertuis, de l'ortie et de la scrofulaire tandis qu'une diminution dans les autres. Mais pas des résultats significatifs pour les teneurs en lipides, en cendres et en glucides (figure 2).

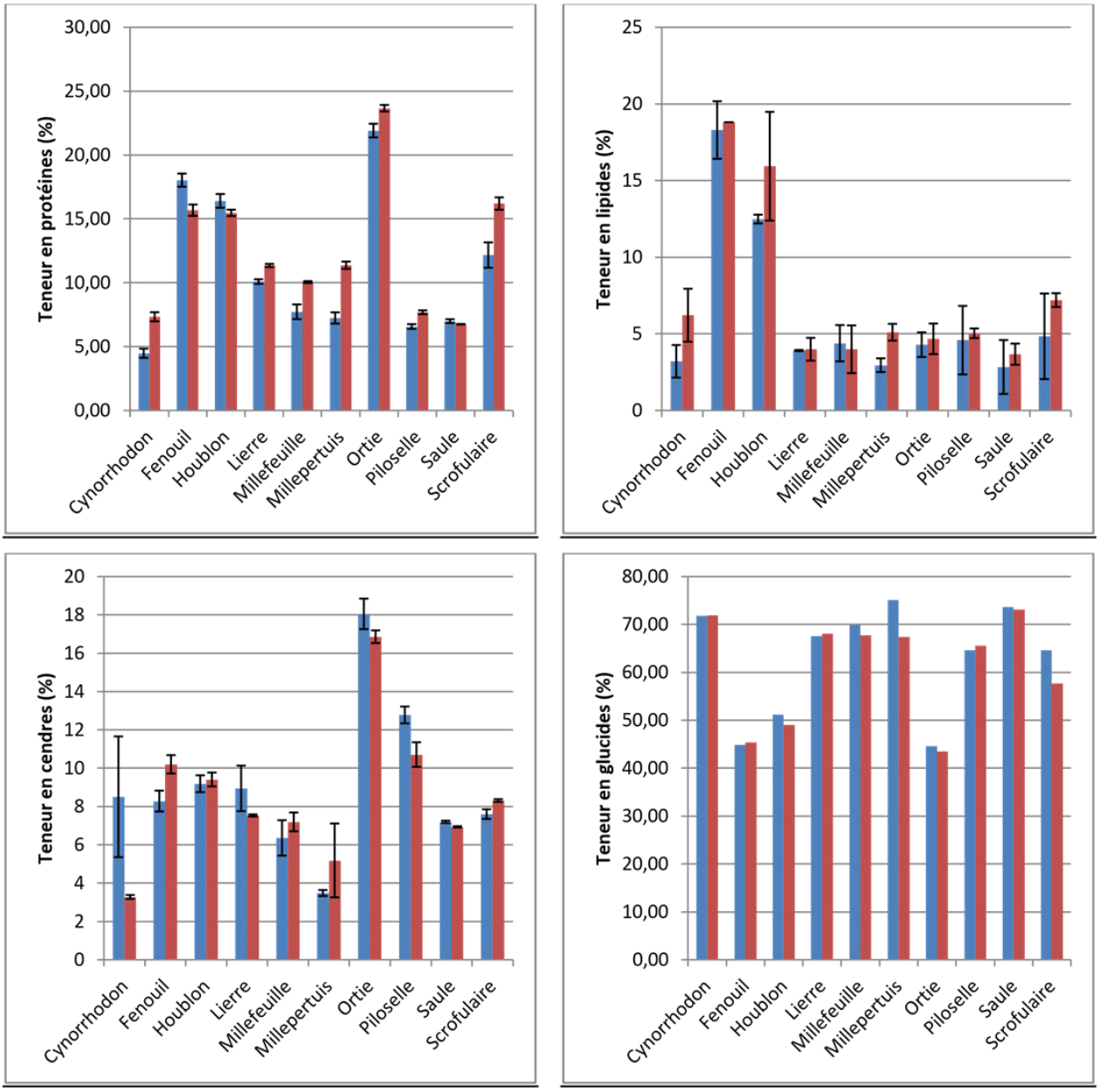


Figure 2: Evolution de la teneur en nutriments : fraction non tamisée en bleu ; fraction 180 – 315 µm en rouge

Annexe 2

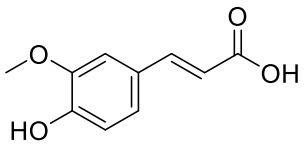
Liste des standards commerciaux de qualité grade analytique employés comme étalons.

Composé	***m/z***	**LOD (ppm)**	**LOQ(ppm)**
acide *p*- coumarique	163	2,3	7,7
acide gallique	169	2,1	7,0
acide caféique	179	2,1	6,8
acide férulique	193	2,2	7,4
acide *trans* -férulique	193	2,2	7,4
acide syringique	197	1,8	6,2
acide chlorogénique	353	2,2	7,0
acide rosmarinique	359	3,5	10,2
acide 3,5 dicaféylquinique	515	1,6	5,3
caféine	195	2,8	8,3
harpagoside	593	5,7	18,1
verbascoside	623	4,3	13,7
acide ellagique	301	2,1	6,3
catéchine	289	2,3	8,0
épicatéchine	289	1,9	6,4
épicatéchine gallate	441	5,0	18,0
épigallocatéchine	305	4,0	13,0
épigallocatéchine gallate	457	3,0	10,0
gallocatechin	305	3,9	12,1
procyanidine B1	577	3,4	10,5
procyanidine B2	577	3,5	10,6
procyanidine C1	865	4,1	12,4

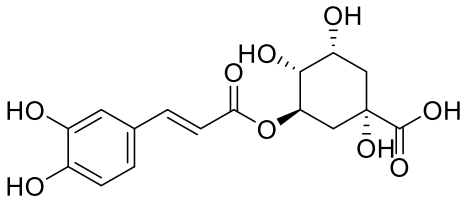
Composé	***m/z***	**LOD (ppm)**	**LOQ(ppm)**
resvératrol	227	7,5	23,2
ombelliférone	161	9,7	31,4
naringénine	271	2,7	7,9
quercétine	301	1,9	6,3
I3,II8-biapigenin	537	0,3	0,9
apigénine-7-glucoside	431	0,1	0,3
quercitrine	447	1,8	6,3
kaempférol-glucoside	447	2,1	6,8
lutéoline-7-glucoside	447	1,3	4,4
isoquercétine	463	1,1	2,3
hypéroside	463	0,3	0,9
amentoflavone	537	2,7	7,1
kaempférol-rutinoside	593	1,4	4,8
rutine	609	0,3	0,9
hypéricine	503	2,2	7,0
hyperforine	535	2,8	7,9
8-prénylnarginine	341	6,5	20,1
desméthylxanthohumol	341	9,2	28,7
xanthohumol	353	4,7	14,2
isoxanthohumol	353	3,1	10,5
colupulone	399	2,9	9,2
α-hédérine [HCOOH]-	795	15,4	48,7
hédéracoside C [HCOOH]-	1265	9,4	28,7

Structures moléculaires des composés étudiés

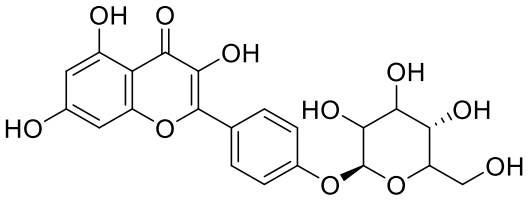
Acide férulique



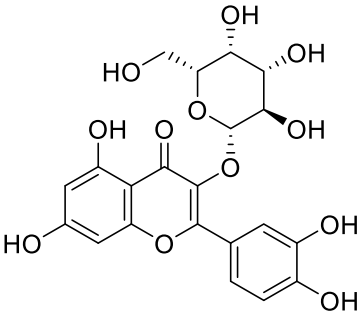
Acide chlorogénique



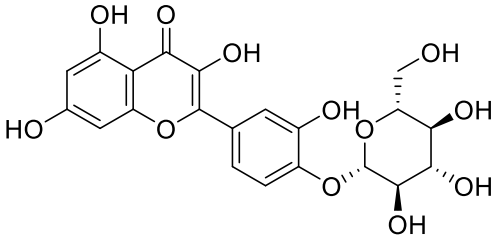
Kampférol-4’-glucoside



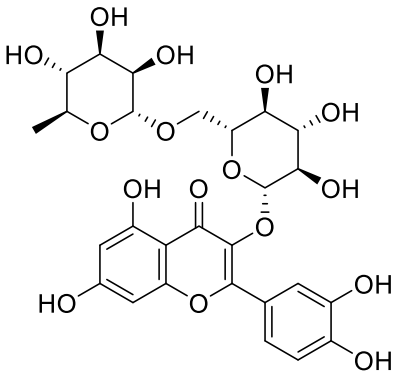
Hypéroside



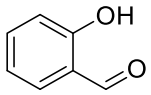
Spiraéoside



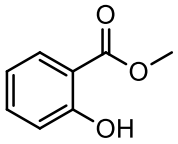
Rutine



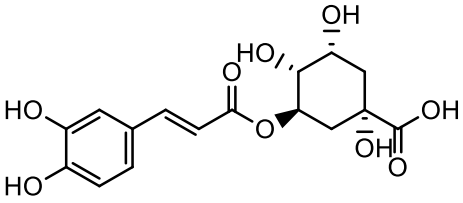
Salicyle aldéhyde



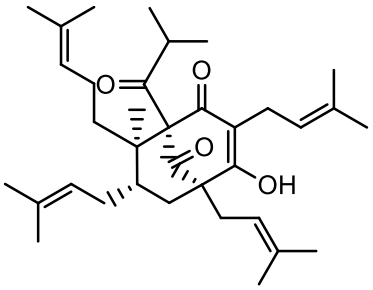
Methyl salicylate



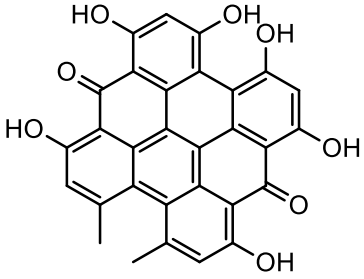
Acide 5-O-caféolquinique



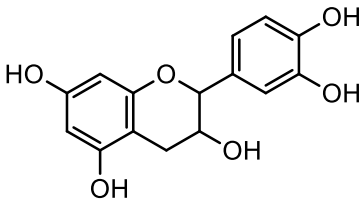
Hypérforine



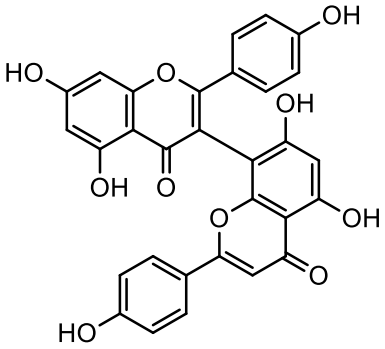
Hypericine



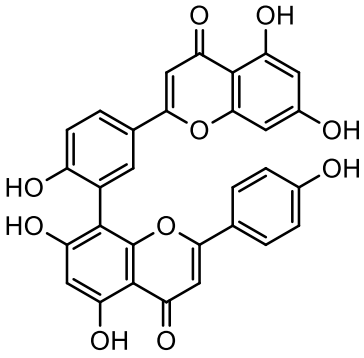
Epicatechine



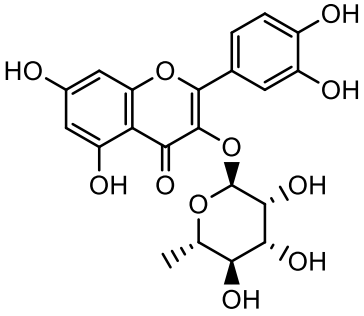
I3, II8 biapigenne



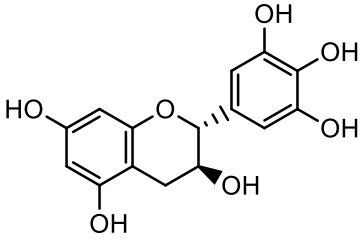
Ametoflavone



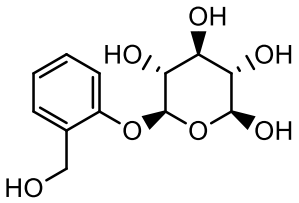
Quercitrine



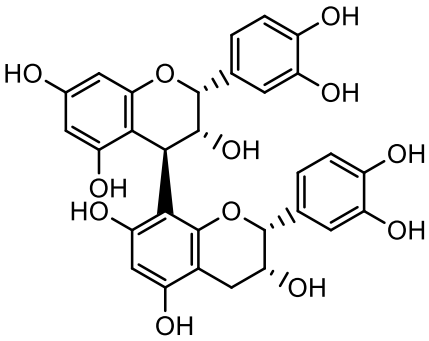
Gallocatechin



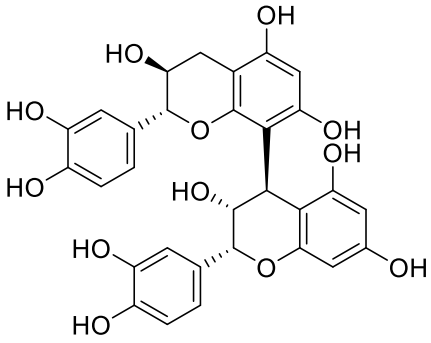
Salicyline



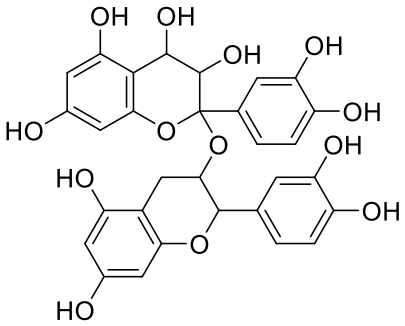
Procyanidine B2



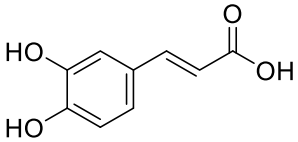
Procyanidine B1



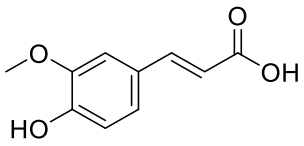
Procyanidine C1



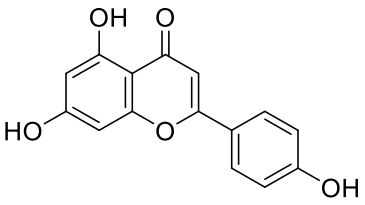
Acide caféique



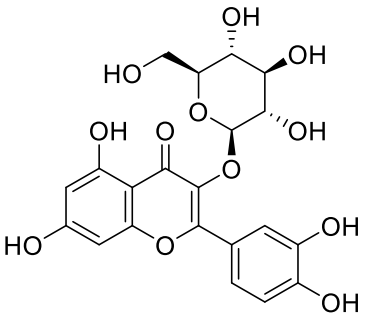
Acide férulique



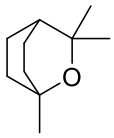
Apigénine



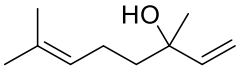
Isoquercitine



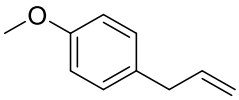
Eucalyptol



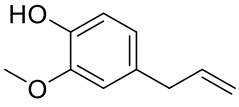
Linalool



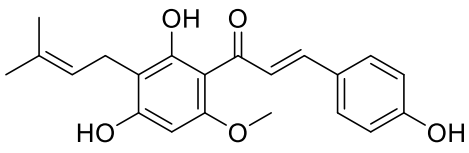
Estragole



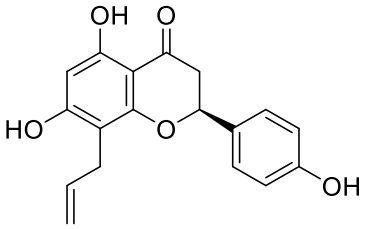
Eugénole



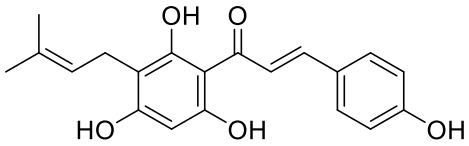
Xanthohumol



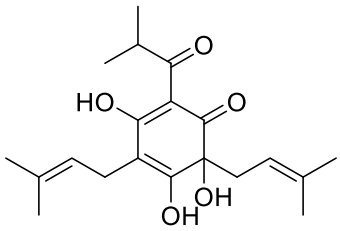
8-prénylnargénine



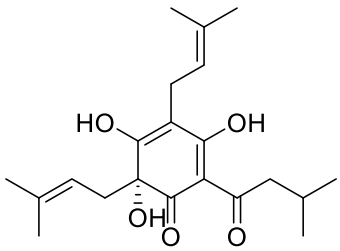
Desméthylxanthohumol



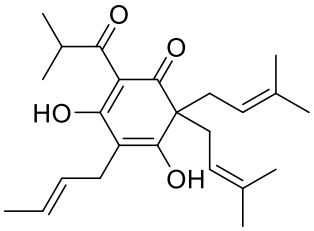
Cohumulone



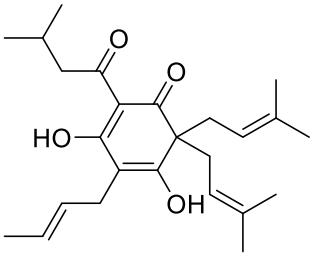
Humulone



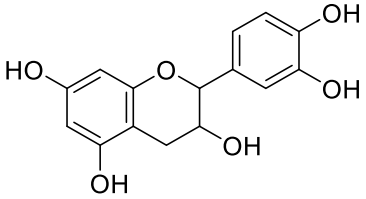
Colupulone



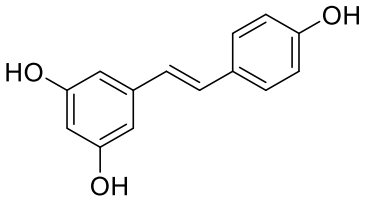
Lupulone



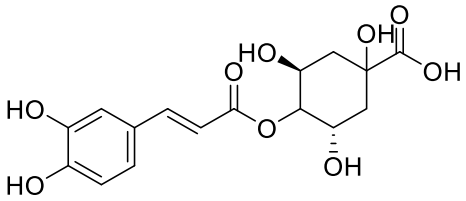
Epicatechine



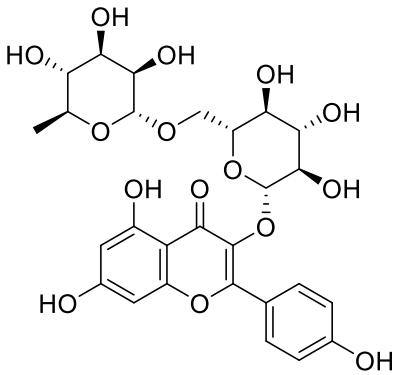
Resvératrol



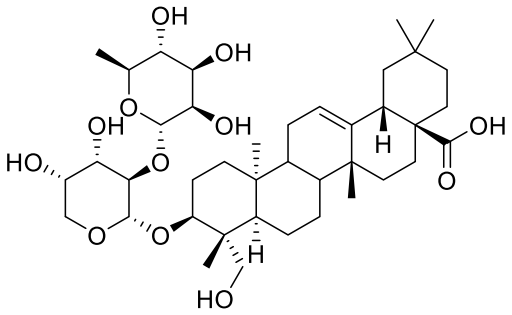
4-Dicaféoylquinique



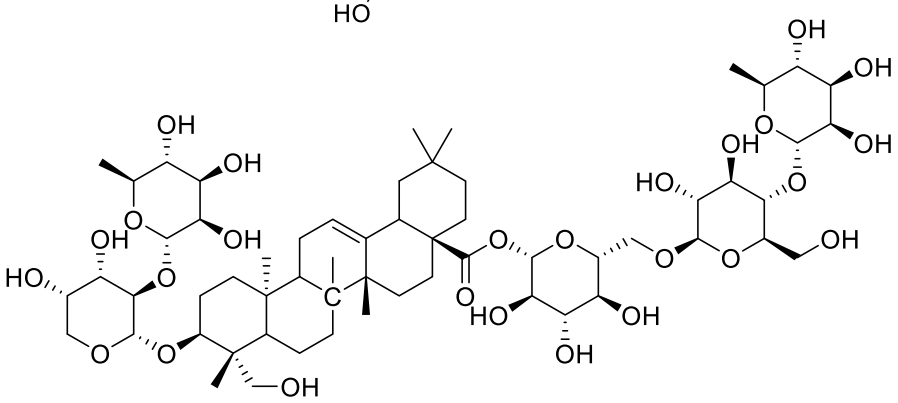
Kampférol-3-O-rutinoside



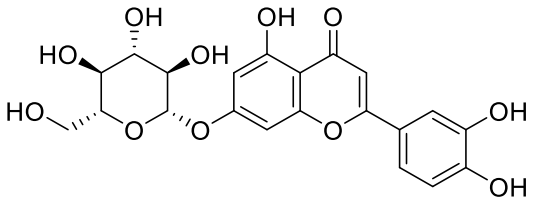
Alpha-hederine



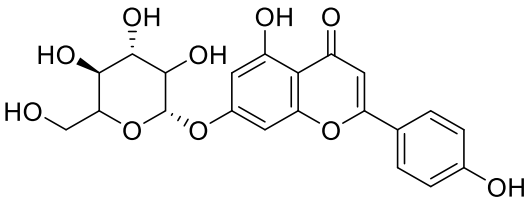
Hederacoside C



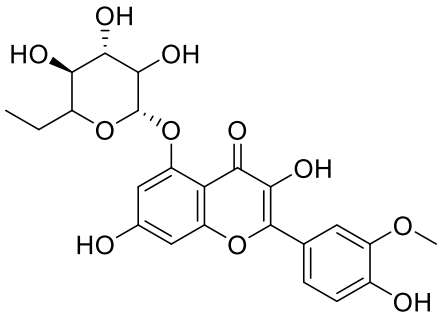
Lutéoline-7-O-glucoside



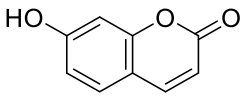
Apigenine-7-O-glucoside



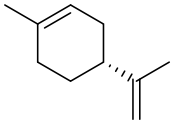
Isorhamnétine-5-O-glucoside



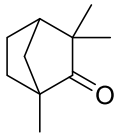
Ombelliférone



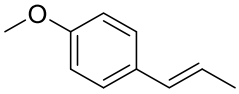
D-Limonène



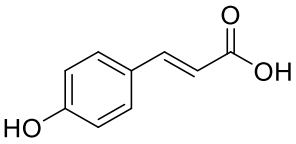
Fenchone



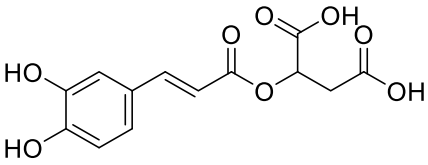
Anéthole



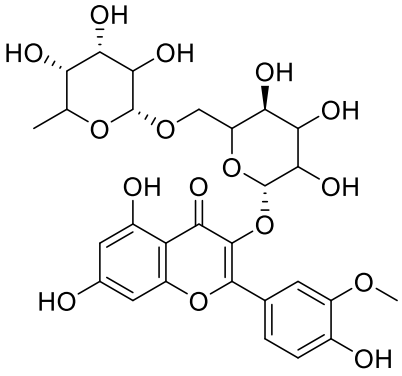
Acide coumarique



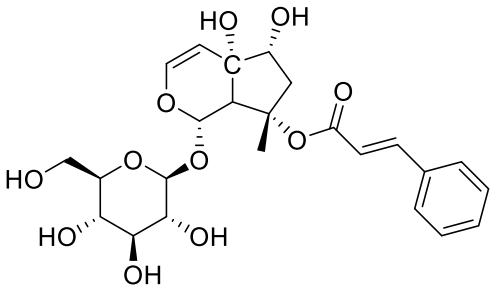
Acide caféoylmalique



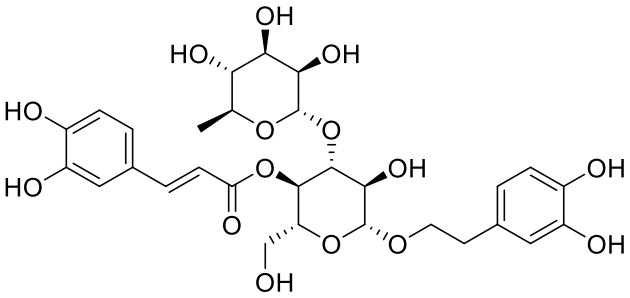
Isorhamnetine-3-O-rutinoside



Harpagoside



Verbacoside



Annexe 3

Liste des articles publiés :

1) Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders.

2) Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* powders usingsuccessive grinding and sieving.

3) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders.

Author's personal copy

J Food Sci Technol
DOI 10.1007/s13197-016-2201-4

ORIGINAL ARTICLE

Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders

Ali Zaiter[1] · **Loïc Becker**[1] · **Marie-Céleste Karam**[2] · **Amadou Dicko**[1]

Revised: 26 February 2016 / Accepted: 8 March 2016
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2016

Abstract This work evaluated the effect of grinding and sieving process of green tea leaves on particle size distribution and antioxidant activity. Granulometric classes ranging from 20 μm to 500 μm were studied. Hydroalcoholic extracts of green tea powders (GTPs) were analysed for total phenolic, total flavonoid, and catechin contents. The fraction of 100–180 μm ground at 6000 rpm showed the maximum catechin content with 33.5 mg/g dry matter (DM) and, the best antioxidant activity with IC50 values of 0.28 μg/mL and 0.13 μg/mL using DPPH and ABTS radical scavenging assays, respectively. However, antioxidant properties and catechin content decreased for particle of sizes less than 50 μm. Catechin content was higher for those ground at 6000 rpm as compared to at 18,000 rpm. The best grinding conditions and particle size were 6000 rpm and 100–180 μm.

Keywords Green tea powders · Fine grinding · Antioxidant activity · Catechins · LC-MS

✉ Loïc Becker
loic.becker@univ-lorraine.fr

[1] Unité de Recherche - Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Université de Lorraine, 1 Boulevard Arago, F-57078, Cedex 03 Metz, France

[2] LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules), Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction

Tea is viewed as an important member of the antioxidant food group, a source of pharmacologically active molecules, and a functional food endowed with beneficial health properties (Dufresne and Farnworth 2001). Indeed, several studies have reported that green tea extract has antioxidant, antibacterial, antiviral, anticarcinogenic, antimutagenic functions (Higdon and Frei 2003), and also diuretic properties (Jouad et al. 2001). Epidemiological reports show that the percentage of cardiovascular diseases decreases due to green tea consumption (Kuriyama 2008). The antioxidant properties of flavonoids, compounds significantly present in green tea, have been shown by Davis et al. (2009). Moreover, these compounds have anti-inflammatory, vasodilator, antithrombotic, antiatherogenic, antipyretic and analgesic properties (Cook and Samman 1996).

Among the bioactive constituents of green tea, polyphenols account for 25–35 % on dry matter. Important characteristics of tea polyphenols are provided by flavan-3-ols, or catechins, with 14–25 % content of dry tea (Yao et al. 2006). Catechins are the most important functional components of green tea. They present a wide range of functional activities, especially a strong antioxidant activity (Pastore and Fratellone 2006). Epigallocatechin gallate has been described by Murase et al. (2002) as the predominant flavan-3-ol in green tea. Catechin and epicatechin are also present in onion, endives, cruciferous vegetables, black grapes, red wine, grapefruits, apples, cherries and berries (Dufresne and Farnworth 2001). Catechins of green tea showed no toxic effects in animals (Chengelis et al. 2008) and can thus be used in various drinks and foods (Kurita et al. 2004; Lu et al. 2010).

Industrial extraction of polyphenolic compounds from tea is mainly based on maceration combined with agitation,

Published online: 18 April 2016

Author's personal copy

circulation, ultrasonic, microwave or enzymatic treatment (Lee and Lee 2008). A way to enhance compound extraction could be to grind plants. Indeed, fine grinding reduces particle size, thickens particle size distribution, and increases specific surface area, which lead to the improvement of material functionalities (Zhao et al. 2009; Zhang et al. 2012; Barnwal et al. 2015). However, grinding conditions have to be chosen carefully. Indeed, during grinding, temperature increases biochemical alterations of food materials and may result in modifications of their physicochemical properties (Maaroufi et al. 2000) like color alteration (Singh and Goswami 1999), which lowers their organoleptic properties (Murthy et al. 1999) and may cause bioactivity losses (Pesek et al. 1985).

To that purpose, a differential split method based on a recent patent (Baudelaire E. 2013) using grinding and sieving processes was used to increase the content of some bioactive compounds in powder extracts. Green tea powders (GTPs) were classified according to the following particle sizes: <20 μm, 20–50 μm, 50–100 μm, 100–180 μm, 180–315 μm, and 315–500 μm. Powders were produced at two grinding speeds, 6000 and 18,000 rpm. Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity were assessed for the different granulometric classes and non-ground tea leaves (NGT). The main flavan-3-ols contained in green tea were also quantified by LC-MS. This article aims at evaluating the effect of particle size and grinding speed on the antioxidant activity and catechin content of green tea extracts.

Materials and methods

Plant material and GTP production

Green tea leaves (*Camellia sinensis* (*L.*) O. Kuntze) were provided by Gunpowder tea (Zhejiang Province, China). About 1.5 kg of leaves were slowly ground (50 g plant for each batch) with the Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch France), operating by impact and shearing effects. Grinding was performed at room temperature (approximately 20 °C) using a 1 mm sieve with trapezoid holes. The grinding time was fixed to 2 min. Indeed, Hu et al. (2012) showed that concentrations of polyphenols, flavonoids and the antioxidant properties decrease when the grinding time increases. Two speeds were used for milling: 6000 rpm and 18,000 rpm. After grinding, plant powders were sieved with the vibratory sieve shaker Analysette 3 Spartan (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany) at 0.5 mm vibration amplitude for 10 min. 20 mm diameter sieves (Fritsch) were employed so as to obtain the following granulometric fractions: <20 μm; 50–100 μm; 100–180 μm; 315–500 μm; >500 μm. Powders were then stored under vacuum in sealed bags at 10 °C.

Chemicals

Chemicals Folin & Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, ABTS as diammonium salt, 2,2′-Azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), standards of (+)-catechin (C), (−)-epicatechin (EC), (−)-epigallocatechin (EGC), (−)-epicatechin gallate (ECG), (−)-epigallocatechin gallate (EGCG) were acquired from Sigma-Aldrich Corporation (Saint Quentin Fallavier, France). HPLC-grade acetonitrile, water, methanol and formic acid were purchased from Sigma Chemicals Co. (Saint Louis, MO). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride ($AlCl_3$), sodium nitrite ($NaNO_2$) and sodium hydroxide (NaOH) from Acros Organics (Geel, Belgium). Each standard (C, EC, EGC, ECG, and EGCG) was prepared in a methanol-water solvent 70–30 (*v*/v) at a concentration of 0.5 mg/mL.

Preparation of extracts

Extraction of polyphenols from GTPs were carried out according to the method of Kim et al. (2002), with some modifications. 2 g of dried leaves and 2 g of powdered dried leaves were macerated during 24 h under stirring, in 20 mL methanol/water 70/30 (*v*/v). Then, the methanol/water extract was centrifuged at 20,000 rpm for 20 min. The supernatant layer was filtered, brought to 15 mL and stored at 4 °C before analysis.

Total phenolic content

Total phenolic compounds (TPC) were determined according the protocol used by Muanda et al. (2011). 40 μL of samples was added to test tubes containing 3.16 mL of distilled water followed by an addition of 200 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1 N) and 600 μL of sodium carbonate (Na_2CO_3, 20 %). Samples and blank were thoroughly mixed and vortexed. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 725 nm. For the calibration curves, diluted solutions of gallic acid (solutions at 1 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL and 3 mg/mL) were used and total phenolic content was expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid per 100 g of dry matter (GAE/100 g DM). Absorbance measurements were carried out with UV–visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, California, USA).

Total flavonoid content

Total flavonoid compounds (TFC) were dosed by a colorimetric assay described by Chen and Chen (2011). 250 μL of sample were added to a volumetric flask containing 1 mL of distilled water. At 0 min, 75 μL of sodium nitrite ($NaNO_2$, 5 %) were added to the flask. After 5 min, 75 μL of aluminum

Author's personal copy

chloride ($AlCl_3$, 10 %) were added. After 6 min, 500 μL of sodium hydroxide (NaOH, 1 N) were added to the mixture. At this time the mixture was diluted with 2.5 mL of distilled water, then the vortexed samples were kept at room temperature. The absorbance was directly measured at 510 nm. For use as calibration curve, diluted solutions of catechin were used and total flavonoids were expressed as mg of catechin equivalent per 100 g of dry matter (mg CE/100 g DM). As for TPCs, absorbance measurements were performed with UV–visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, California, USA).

Antioxidant activity

ABTS tests

The method developed by Muanda et al. (2010) was used in this experiment; 1 mM of AAPH solution was mixed with 2.5 mM ABTS as diammonium salt in phosphate buffered saline (PBS) solution (100 mM, pH 7.4) containing 150 mM NaCl. After incubation in a water bath at 68 °C for 20 min, the resulting ABTS solution was diluted with the methanol to get blue-green coloration with an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm, then 2.94 mL of ABTS radical anion solution was added. The decrease of absorbance was measured at 734 nm. The radical stock was prepared daily and all the tests were triplicated. The half maximal inhibitory concentration (IC50), which refers to the smallest concentration of antioxidants required to scavenge 50 % of the ABTS radical cation, was calculated.

DPPH tests

The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to the method described by Sharififar et al. (2009). 1 mL of 100 μM DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL of plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 min, and the optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 mL of DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL of methanol, and optical density of solution was recorded after 20 min. IC50 values related to the DPPH radical scavenging activity were calculated.

LC-MS analyses

Analysis parameters

LC-MS analyses were performed on a LC-MS 2020 system (Shimadzu, Tokyo, Japan) associated to an electrospray ionization source (ESI). Separation was carried on a 150 × 4.6 mm i.d. C18 reverse phase Gemini column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with particle size of 3 μm and pore size of 130 Å. The column oven was fixed at 30 °C. The mobile phase consisted of (A) 0.5 % formic acid in water and (B) acetonitrile. The injection volume was 20 μL and the flow rate was 0.6 mL/min. The 40 min gradient used was as follows: 0–5 min, 90:10 (A:B); 5–7 min from 90:10 to 86:14 (linear gradient); 7–17 min held at 86:14; 17–19 min from 86:14 to 75:25 (linear gradient); 19–24 min held at 75:25; 24–25 min from 75:25 to 10:90 (linear gradient); 25–31 min held at 10:90; 31–32 min from 10:90 to 90:10, 32–40 min held at 90:10 (re-equilibration step). The electrospray ionization source was operated in negative mode. The nebulization gas flow was set to 1.5 L/min, drying gas flow at 20 L/min, the heat block temperature was fixed at 350 °C, and the desolvation line (DL) temperature at 250 °C. The probe voltage was set to - 4500 V.

Calibration method

For the determination of calibration curves, standards of (+)-catechin, (−)-epicatechin, (−)-epigallocatechin, (−)-epicatechin gallate, (−)-epigallocatechin gallate were prepared in 70/30 methanol/water (*v*/v) at concentrations comprised between 0.3 mg/mL and 2 mg/mL. Dosages of catechins were performed using the selected ion monitoring (SIM) mode to increase sensitivity compared to the full scan mode.

LOD and LOQ

Solutions of standard compounds were diluted at different concentrations to perform calibration curves in order to dose the main catechins present in GTP extracts. The detector response was linear over a range from 0.005 mg/mL to 0.5 mg/mL for the catechin standards (C, EC, EGC, ECG and EGCG). The method sensitivity was assessed by determining the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) defined as the concentrations with a signal-to-noise (S/N) of 3 and 10, respectively. Data are expressed in mg of standard per gram of dried matter.

Statistical analyses

Each experiment and measurement was performed in triplicate. Data are expressed as means ± standard deviation. Statistical analysis was conducted using SAS software (v8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with analysis of variance (ANOVA). Means for significant differences were compared by using Student's *t* test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Total phenolic content of GTPs

To evaluate polyphenol content in GTPs, Folin & Ciocalteu test is used, results are displayed in Fig. 1. The most important

Author's personal copy

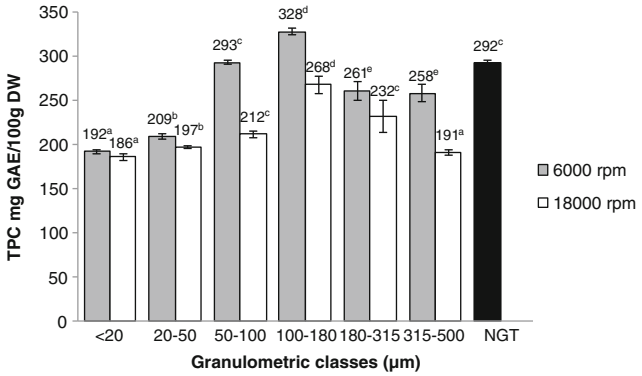


Fig. 1 Total phenolic content of green tea powders at 6000 and 18,000 rpm; *DM* dry matter, *GAE* gallic acid equivalent, *NGT* non-grinded tea leaves. All values are expressed as means ± SD ($n = 3$). For a same grinding speed, values followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$)

total phenolic content in GTPs was found in the fraction 100–180 μm at 6000 rpm, 328 mg GAE/100 g DM. Values of TPC increased when granulometry decreased from 500 μm to 50 μm. However, between 20 μm and 50 μm, TPCs decreased dramatically to 192 mg GAE/100 g DM (6000 rpm). The non-ground tea extract showed a high TPC, 305 mg GAE/100 g DM, which is superior than every GTPs obtained at 18,000 rpm. This can be explained by the speed increase from 6000 rpm to 18,000 rpm which leads to a temperature rise causing a loss of catechin content, as reported by Chen et al. (2001). Optimal parameters to obtain the highest TPC were the 100–180 μm sieve at 6000 rpm. The use of a faster grinding speed led to lower TPC values.

Total flavonoid content of GTPs

This test was performed to assay more specifically flavan-3-ols, compounds predominantly present in green tea (Oliveira 2012). Total flavonoid contents are reported in Fig. 2. At 6000 rpm, TFCs tended to increase when particle size decreased to 50 μm, then, for 20 μm at 6000 rpm, the amount of flavonoids fell down to 172 mg CE/100 g DM. Here also, the highest TFC is reached with the 100–180 μm fraction at 6000 rpm with 312 mg CE/100 g DM. As for total phenolic content, the non-ground tea TFC was higher than GTPs at 18,000 rpm with 278 mg CE/100 g DM, confirming the hypothesis previously raised of catechin degradation during grinding at higher speed.

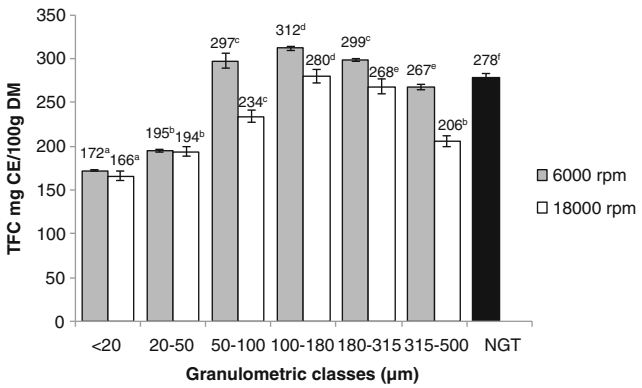


Fig. 2 Total flavonoid content of green tea powders at 6000 and 18,000 rpm; *DM* dry matter, *CE* catechin equivalent, *NGT* non-grinded tea leaves. All values are expressed as means ± SD ($n = 3$). For a same grinding speed, values followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$)

Antioxidant activity of GTPs

DPPH radical scavenging activity

Antioxidant activity is defined as the ability of a compound to inhibit oxidative degradation (Roginsky and Lissi 2005). The DPPH method has been extensively used to measure the radical scavenging abilities of various antioxidant substances. The antioxidant activity of GTPs and NGT assessed by DPPH is reported in Table 1. Values are expressed as mean ± standard deviation from triplicate. The IC50 is the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of radical by 50 %.

At both grinding speed, IC50 values were not significantly different among 50–100 μm, 100–180 μm and 180–315 μm fractions ($p > 0.05$). These granulometric classes showed thus the highest DPPH scavenging activity with a maximum IC50 of 0.28 μg/mL for the 100–180 μm GTP. In comparison, the IC50 value of the non-ground tea was evaluated at 0.39 μg/mL which constitutes a significant difference ($p < 0.05$). Similar variations were observed at 18,000 rpm: intermediate fractions led to the highest activity. However, as for the total phenolic content and total flavonoid content, the best results

Table 1 Evaluation of the antioxidant activities of extracts from green tea powders with different particle sizes obtained at grinding speeds of 6000 rpm and 18,000 rpm, and non-grinded tea leaves (NGT) as determined by DPPH radical scavenging effect and ABTS radical scavenging effect

GTPs (μm)	IC_{50} values of radical scavenging activity (μg/mL)			
	DPPH test		ABTS test	
	6000 rpm	18,000 rpm	6000 rpm	18,000 rpm
<20	0.53 ± 0.02^{a}	0.70 ± 0.02^{a}	0.24 ± 0.02^{a}	0.54 ± 0.02^{a}
20–50	0.44 ± 0.03^{b}	0.61 ± 0.03^{b}	0.22 ± 0.02^{a}	0.44 ± 0.04^{b}
50–100	0.31 ± 0.01^{c}	0.51 ± 0.02^{c}	0.16 ± 0.03^{b}	0.32 ± 0.03^{c}
100–180	0.28 ± 0.01^{d}	0.48 ± 0.01^{c}	0.13 ± 0.02^{b}	0.28 ± 0.04^{d}
180–315	0.31 ± 0.02^{d}	0.53 ± 0.01^{c}	0.14 ± 0.03^{b}	0.33 ± 0.03^{c}
315–500	0.44 ± 0.02^{b}	0.64 ± 0.03^{b}	0.21 ± 0.02^{a}	0.46 ± 0.05^{b}
NGT	0.39 ± 0.02^{d}		0.35 ± 0.03^{c}	

The data were mean ± standard deviation of triplicate ($n = 3$). Means in the same column followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$)

Author's personal copy

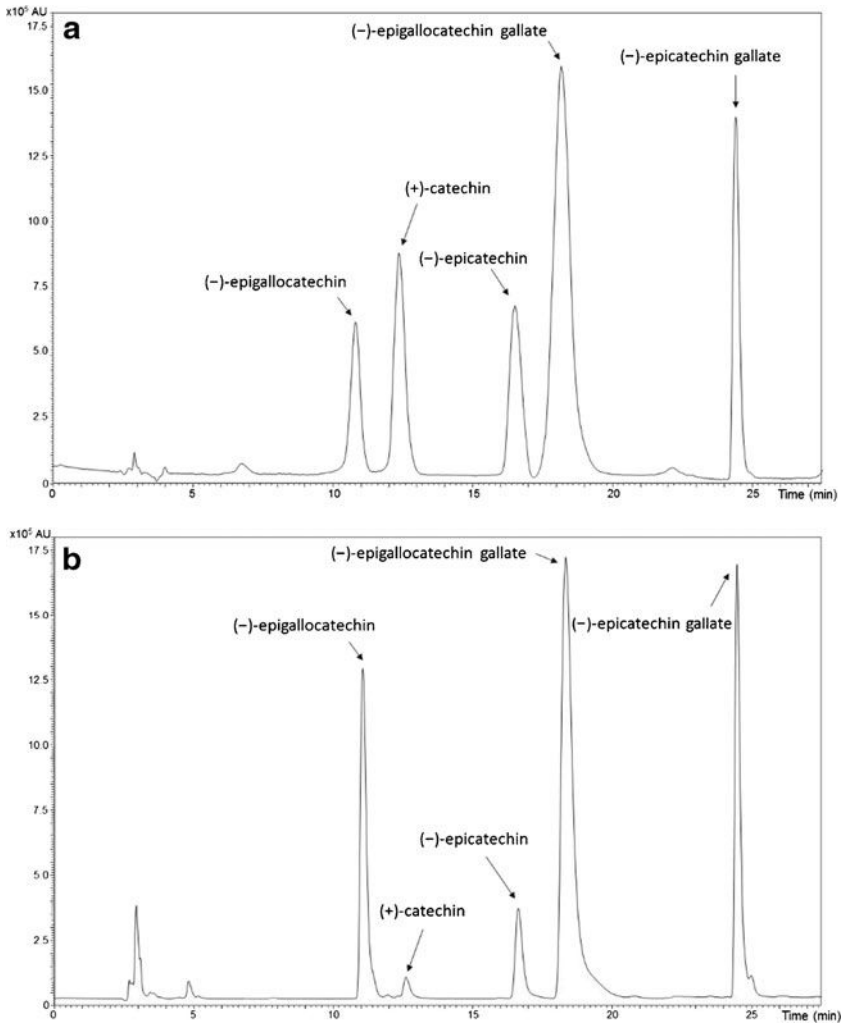


Fig. 3 LC-MS profiles of **a** a mixture of standard compounds (+)-catechin (C), (−)-epicatechin (EC), (−)-epigallocatechin (EGC), (−)-epicatechin gallate (ECG), (−)-epigallocatechin gallate (EGCG) prepared at a concentration 0.015 g/L and **b** green tea extract

were obtained at 6000 rpm. A positive correlation was also observed between the TPC ($r^2 = 0.801$) and TFC ($r^2 = 0.840$) of the GTP extracts and their antioxidant activity assessed by the DPPH test. This shows the relation between antioxidant activity and polyphenols content, as described by Burin et al. (2014).

ABTS radical scavenging activity

ABTS radical scavenging assay can also be applied to test food and natural water-soluble phenolics. The antioxidant activity of GTPs and NGT assessed by ABTS are reported in Table 1. Results showed that the difference between samples come from different GTPs. IC50 values were significantly different among 100–180 μm and 315–500 μm ($p < 0.05$). The best activity was obtained for the fraction between 100 and 180 μm at 6000 rpm, with an IC50 of 0.13 μg/mL. The scavenging capacity of <20 μm on ABTS decreased significantly with 0.24 μg/mL at 6000 rpm. Antioxidant activity were systematically lower for GTPs ground at 18,000 rpm. The trends were in agreement with those exhibited by the results of DPPH radical scavenging test, confirming that

Table 2 Retention times, *m/z* ratios, validation (r^2) and LOD-LOQ values for flavan-3-ols quantified

Compound	*m/z*	Retention time (min)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Coefficient of determination (r^2)
(+)-catechin (C)	289	12.4	2	8	0.998
(−)-epicatechin (EC)	289	16.5	2	6	0.999
(−)-epigallocatechin (EGC)	305	10.8	4	13	0.999
(−)-epicatechin gallate (ECG)	441	24.4	5	18	0.996
(−)-epigallocatechin gallate (EGCG)	457	18.2	3	10	0.997

Author's personal copy

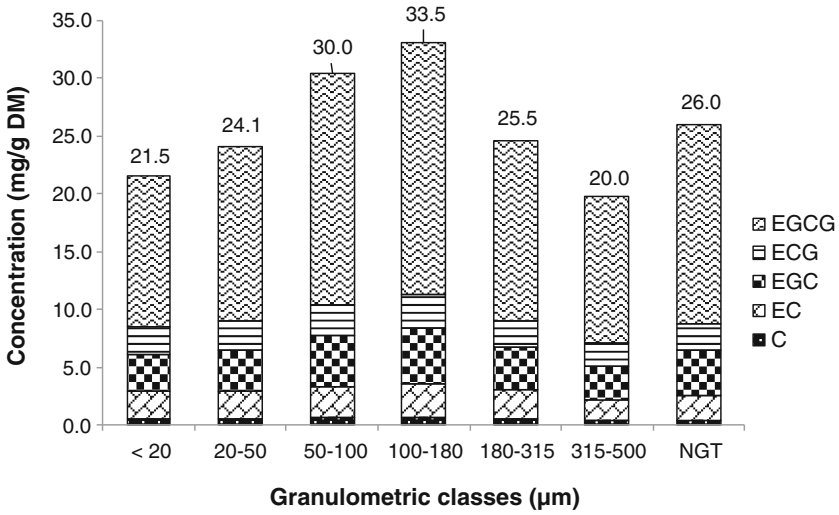


Fig. 4 LC-MS dosages of flavan-3-ols: (+)-catechin (C), (−)-epicatechin (EC), (−)-epigallocatechin (EGC), (−)-epicatechin gallate (ECG), (−)-epigallocatechin gallate (EGCG) from tea powder extracts and the unground leaves extract at 6000 rpm. Total content of the catechins quantified are displayed above each bar in mg/g of dried matter. Variations between granulometric classes were statistically significant ($p < 0.05$)

particle size has an important influence on extract antioxidant activity. It can be also noticed that IC50 values obtained with ABTS assay were lower than DPPH assay, this difference between these two tests is consistent with the study of Czyzowska et al. (2015).

LC-MS

Analysis of catechin standards and GTP extracts

The LC-MS profile of standard compound analysis is displayed in Fig. 3a. This initial experiment allows us to know the retention times of each catechin. Retention times and *m*/*z* ratios of the selected catechins are given in Table 2. The same settings were applied for the analysis of GTP and NGT extracts. Before their analysis, extracts were filtrated and diluted ten times in order to prevent the electrospray source from contamination. The LC-MS profile of this experiment is presented in Fig. 3b. The chromatographic peaks found in tea extracts showed the same retention times and *m*/*z* ratios than standard compounds, enabling to identify the main catechins in green tea in the following elution order: C, EC, ECG, EGC, and EGCG. The major signals were peaks at 18.2 and 24.4 min, which correspond to the (−)-epigallocatechin gallate and the (−)-epicatechin gallate, respectively (Fig. 3b).

Quantification of catechins

Coefficients of determination (r^2) from the calibration curves obtained with the external method are displayed in the Table 2. The catechin signals (S/N ratios) at the studied concentrations were equal or 10 times higher than the limits of the quantification (LOQs). These calibration curves were used to quantify catechins in GTP extracts. The catechin peaks in chromatograms obtained from extracts were quantified in terms of equivalents of external standards. Figures 4 and 5 display catechin contents calculated for GTPs at 6000 rpm and 18,000 rpm, respectively, and NGT.

Concentrations of EGCG were much higher than other catechins, from five to twenty times higher according to the

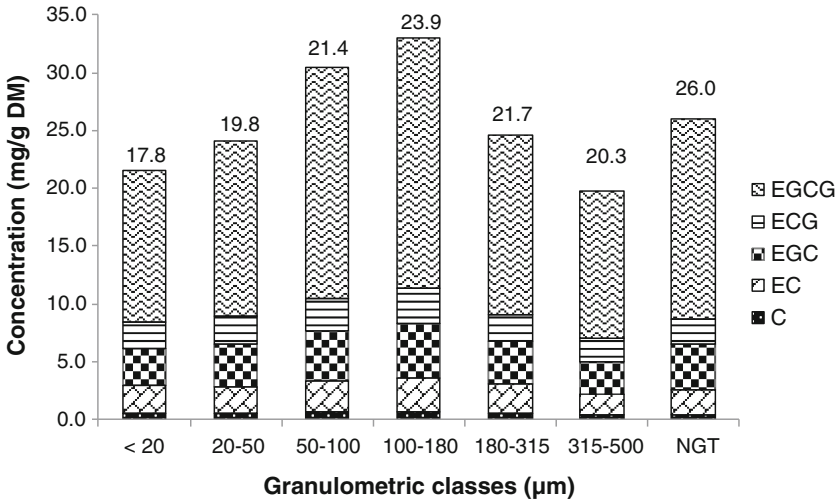


Fig. 5 LC-MS dosages of flavan-3-ols (+)-catechin (C), (−)-epicatechin (EC), (−)-epigallocatechin (EGC), (−)-epicatechin gallate (ECG), (−)-epigallocatechin gallate (EGCG) from tea powder extracts and the unground leaves extract at 18,000 rpm. Total content of the catechins quantified are displayed above each bar in mg/g of dried matter. Variations between granulometric classes were statistically significant ($p < 0.05$)

Author's personal copy

compound. The order of relative concentrations of catechins (EGCG > EGC > ECG > EC > C) is similar to the one described by Suzuki et al. (2013). Nevertheless, another article showed a different ranking (Khokhar and Magnusdottir 2002). This may depend on the green tea variety. Variations of concentration of the five catechins followed the same trend according to particle size. For all catechins, maximum concentrations were found for granulometric classes between 100 and 180 μm. The lowest catechin contents were obtained for the <20 μm, 20–50 μm and 315–500 μm granulometric classes. The concentration for the non-ground leaf extract (26.0 mg/g DM) was lower than 100–180 μm (33.5 mg/g DM) at 6000 rpm. A positive correlation was calculated between antioxidant activity and catechin content ($r^2 = 0.893$).

Even if variations of catechin concentrations were similar at both speeds, NGT extract led to a higher catechin content at 18,000 rpm (Figs. 5). Indeed, as Hu et al. (2012) mentioned, it is crucial to avoid excessive heat during grinding, and operating at 18,000 rpm may increase heat. Catechin contents increased when particle size decreased except for smaller particle size, <20 μm and 20–50 μm. In that case, the larger surface area in finer GTPs could increase the contact surface between O_2 and particles, thus leading to the oxidation of catechins (Neilson et al. 2007).

Conclusion

This study showed the advantage of grinding and sieving green tea leaves to increase content of polyphenols. Our results revealed that antioxidant activity was dependent on particle size. However, it is important to control grinding speed and particle size to avoid catechin degradation by heat and oxidation. The highest antioxidant activity and catechin content were obtained with the particle size of 100–180 μm at 6000 rpm, which then determine the best conditions for the grinding of green tea leaves. This procedure may be extended to other food applications, for example to improve nutritive values.

Acknowledgments The authors are thankful to Extrapole and LIBio which produced the green tea powders.

References

Barnwal P, Singh KK, Sharma A, et al. (2015) Influence of pin and hammer mill on grinding characteristics, thermal and antioxidant properties of coriander powder. J Food Sci Technol:1–12. doi:10.1007/s13197-015-1975-0

Baudelaire E. (2013) Brevet WO2013057379A1 - Procede Ptc Pour l'extraction Par Voie Seche Des Principes Actifs Naturels - Google Brevets http://www.google.com/patents/WO2013057379A1?cl=fr.

Burin VM, Ferreira-Lima NE, Panceri CP, Bordignon-Luiz MT (2014) Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. Microchem J 114:155–163. doi:10.1016/j.microc.2013.12.014

Chen G, Chen H (2011) Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. Food Chem 126:1934–1938. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.025

Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Regan KS, et al. (2008) 28-day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats. Food Chem Toxicol 46:978–989

Chen Z, Zhu QY, Tsang D, Huang Y (2001) Degradation of green tea catechins in tea drinks. J Agric Food Chem 49:477–482. doi:10.1021/jf000877h

Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J Nutr Biochem 7:66–76. doi:10.1016/S0955-2863(95)00168-9

Czyzowska A, Klewicka E, Pogorzelski E, Nowak A (2015) Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* thunb. J Food Compos Anal 39:62–68. doi:10.1016/j.jfca.2014.11.009

Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B (2009) Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. Am J Phys Regul Integr Comp Phys 296:R1071–R1077. doi:10.1152/ajpregu.90925.2008

Dufresne CJ, Farnworth ER (2001) A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. J Nutr Biochem 12:404–421

Higdon JV, Frei B (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit Rev Food Sci Nutr 43:89–143. doi:10.1080/10408690390826464

Hu J, Chen Y, Ni D (2012) Effect of superfine grinding on quality and antioxidant property of fine green tea powders. LWT Food Sci Technol 45:8–12. doi:10.1016/j.lwt.2011.08.002

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M (2001) Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. J Ethnopharmacol 76:159–163. doi:10.1016/S0378-8741(01)00209-4

Khokhar S, Magnusdottir SGM (2002) Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. J Agric Food Chem 50:565–570. doi:10.1021/jf0101531

Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002) Vitamin C Equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agric Food Chem 50:3713–3717. doi:10.1021/jf020071c

Kurita T, Miyagishima A, Nozawa Y, et al. (2004) A dosage design of mitomycin C tablets containing finely powdered green tea. Int J Pharm 275:279–283. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.037

Kuriyama S (2008) The relation between green tea consumption and cardiovascular disease as evidenced by epidemiological studies. J Nutr 138:1548S–1553S

Lee KJ, Lee SH (2008) Extraction behavior of caffeine and EGCG from green and black tea. Biotechnol Bioprocess Eng 13:646–649. doi:10.1007/s12257-008-0034-3

Lu T-M, Lee C-C, Mau J-L, Lin S-D (2010) Quality and antioxidant property of green tea sponge cake. Food Chem 119:1090–1095

Maaroufi C, Melcion J-P, de Monredon F, et al. (2000) Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. I. physical and chemical characteristics of pea seed fractions. Anim Feed Sci Technol 85:61–78. doi:10.1016/S0377-8401(00)00127-9

Muanda F, Koné D, Dicko A, et al. (2011) Phytochemical composition and antioxidant capacity of Three Malian Medicinal Plant parts. Evid Based Complement Alternat Med 2011:1–8. doi:10.1093/ecam/nep109

Muanda FN, Bouayed J, Djilani A, et al (2010) Chemical composition and, cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves. Evid Based Complement Alternat Med 2011:e620862.

Author's personal copy

Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, et al. (2002) Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. Int J Obes 26:1459–1464. doi:10.1038/sj.ijo.0802141

Murthy Ct, Rani M, Rao P n. S (1999) Optimal grinding characteristics of black pepper for essential oil yield. J Food Process Eng 22:161–173. doi:10.1111/j.1745-4530.1999.tb00478.x

Neilson AP, Hopf AS, Cooper BR, et al. (2007) Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in Vitro digestion. J Agric Food Chem 55:8941–8949. doi:10.1021/jf071645m

Oliveira RMMD (2012) Quantification of catechins and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) infusions, extract, and ready-to-drink beverages. Food Sci Technol Camp 32:163–166. doi:10.1590/S0101-20612012005000009

Pastore RL, Fratellone P (2006) Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): A narrative review. Explore J Sci Heal 2:531–539. doi:10.1016/j.explore.2006.08.008

Pesek CA, Wilson LA, Hammond EG (1985) Spice quality: effect of cryogenic and ambient grinding on volatiles. J Food Sci 50:599–601. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13753.x

Roginsky V, Lissi EA (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem 92:235–254. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004

Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M (2009) Major flavonoids with antioxidant activity from teucrium polium L. Food Chem 112:885–888

Singh Kk, Goswami TK (1999) Studies on cryogenic grinding of cumin seed. J Food Process Eng 22:175–190. doi:10.1111/j.1745-4530.1999.tb00479.x

Suzuki T, Kumazoe M, Kim Y, et al. (2013) Green tea extract containing a highly absorbent catechin prevents diet-induced lipid metabolism disorder. Sci Rep. doi:10.1038/srep02749

Yao L, Liu X, Jiang Y, et al. (2006) Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. Food Chem 94:115–122

Zhang Z, Song H, Peng Z, et al. (2012) Characterization of stipe and cap powders of mushroom (lentinus edodes) prepared by different grinding methods. J Food Eng 109:406–413. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.11.007

Zhao X, Yang Z, Gai G, Yang Y (2009) Effect of superfine grinding on properties of ginger powder. J Food Eng 91:217–222. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.024

Industrial Crops and Products 87 (2016) 116–123

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* powders using successive grinding and sieving

Loïc Becker[a,*,1], Ali Zaiter[a,1], Jeremy Petit[b], David Zimmer[b], Marie-Céleste Karam[b], Elie Baudelaire[c], Joël Scher[b], Amadou Dicko[a]

[a] Université de Lorraine, UR-AFPA (Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux), 1, Boulevard Arago, Metz Cedex 03, 57078, France
[b] Université de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules), 2, Avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[c] AGRITECH, 4, Rue Piroux, 54000 Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 January 2016
Received in revised form 21 March 2016
Accepted 14 April 2016
Available online 22 April 2016

Keywords:
Plant powders
Granulometry
Polyphenols
Antioxidant activity
LC-ESI/MS

ABSTRACT

This work aims at evaluating the effect of successive grinding and sieving processes on the polyphenol content of plants. Powders of particle size ranging from 20 to 500 μm and over were produced from aerial parts of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium*. The evaluation of total phenolic content and antioxidant activity, as well as the identification and quantification of some bioactive compounds by LC-ESI/MS were performed. The highest antioxidant activity was obtained for the 100–180 μm fraction: IC50 of 0.43 and 0.51 mg/mL for *H. perforatum* and *A. millefolium*, respectively. LC-ESI/MS analyses evidenced that two intermediate granulometric classes, 100–180 μm and 180–315 μm, allowed achieving the highest polyphenol content. These results show that fine grinding and sieving lead to a differential distribution of bioactive compounds according to particle size.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Extraction of bioactive compounds from plant materials gains more and more interest in the industry. Recently, there has been much interest in potential health benefits of dietary plant polyphenols, especially as antioxidants (Pandey and Rizvi, 2009). Flavonoids, a subfamily of polyphenols, exhibit several interesting biological activities in addition to their well-known antioxidant power: antibacterial, hepatoprotective, anti-inflammatory, anti-cancer, and antiviral (Kumar and Pandey, 2013).

Conventional extraction techniques of bioactive compounds mainly consist in maceration, Soxhlet extraction, and hydrodistillation (Azmir et al., 2013). Whereas hydrodistillation is well suited for essential oils, polyphenols extraction is usually performed through maceration in polar solvents. Indeed, Soxhlet extractions are performed at the boiling point of the solvent and hydrodistillation requires heating, inducing the thermal degradation of thermolabile compounds (Luque de Castro and Garcıía-Ayuso, 1998). Maceration allows preventing this drawback. Indeed, high recoveries can be achieved at room temperature on condition of long extraction times, usually overnight (Ćujić et al., 2015; Rostagno and Prado, 2013). To enhance selectivity of extraction techniques, preliminary plant grinding into fine particles can be carried out (Sasidharan et al., 2010).

In this context, we applied a method of grinding and sieving processes to concentrate bioactive compounds in some granulometric classes of plant powders. Grinding induces particle size reduction, broadening of particle size distribution, and increases in specific surface area, leading to the improvement of material functionalities (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2009). However, grinding conditions have to be carefully chosen to avoid excessive temperature increase and limit the oxidation of bioactive compounds. Indeed, local temperature increases up to 90 °C in ground materials have been reported (Hu et al., 2012), as 99% of input power is converted into heat during the grinding process (Murthy et al., 1999). Local temperature increase results from the breaking of material chemical bonds, but mostly particle friction during powder flowing in the equipment. This phenomenon induces physicochemical alterations of ground fractions (Maaroufi et al., 2000), such as material browning/darkening (Singh and Goswami, 1999), bioactive

* Corresponding author at: Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux Université de Lorraine, 1, Boulevard Arago, F-57078 Metz Cedex 03, France.
E-mail address: loic.becker@univ-lorraine.fr (L. Becker).
[1] Loïc Becker and Ali Zaiter are the first authors of this article.

http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.036
0926-6690/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Sieved masses, mass fractions, and mean particle sizes of the different granulometric classes and unsieved powders of *H. perforatum* and *A. millefolium*.

Granulometric classes	*H. perforatum*			*A. millefolium*		
	Sieved mass (g)	Sieved mass fractions (%)	Mean particle size D_{50} (μm)	Sieved mass (g)	Sieved mass fractions (%)	Mean particle size D_{50} (μm)
<20 μm	0.7	0.0%	N.D.	0.3	0.0%	N.D.
20–50 μm	12	0.7%	34 ± 0	22	1.3%	45 ± 0
50–100 μm	78	4.5%	83 ± 0	58	3.5%	90 ± 2
100–180 μm	206	12.0%	190 ± 1	102	6.1%	195 ± 5
180–315 μm	314	18.3%	311 ± 0	114	6.9%	349 ± 2
315–500 μm	366	21.3%	520 ± 4	140	8.4%	485 ± 5
> 500 μm	740	43.1%	1040 ± 15	1226	73.8%	1395 ± 5
Unsieved powder (total)	1716.7	100%	438 ± 11	1662.3	100%	1143 ± 102

N.D.: not determined.

compound loss and lower organoleptic properties (Murthy et al., 1999; Singh and Goswami, 1999).

Two plants, namely *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium*, were chosen for their well-known biological activities to assess the suitability of the grinding/sieving procedure. *H. perforatum*, is a plant often used for its antidepressant capabilities in addition to its antioxidant, antiviral, anti-inflammatory, and antimicrobial properties (Barnes et al., 2001). Several antioxidants compounds were identified in *H. perforatum*: hyperoside (Gioti et al., 2009) which exhibit also anti-inflammatory activity (Bernardi et al., 2007), rutin (Nöldner and Schötz, 2002), I3,II8-biapigenin (Colovic and Caccia, 2008), and catechins (Ploss et al., 2001). These latter (Iacopini et al., 2008) may also prevent cancer and reduce the risk of cardiovascular diseases (Higdon and Frei, 2003). Chlorogenic acid was also detected in this plant in significant amounts (Gioti et al., 2009; Tusevski et al., 2013). In addition to its antioxidant activity, anxiolytic and antidepressant properties of chlorogenic acid have been demonstrated in mice (Bouayed et al., 2007).

The antioxidant activity of *A. millefolium*, has been evidenced by Trumbeckaite et al. (2011). Extracts of *A. millefolium* are used in European folk medicine in the treatment of gastro-intestinal, hepatobiliary, and gynecological disorders, against inflammation, and for wound healing (Benedek et al., 2007; Santoro et al., 2007). The main active compounds in *A. millefolium* are chlorogenic acid and its derivatives, namely dicaffeoylquinic acids (Vitalini et al., 2011). These phenolic acids are known for their antioxidant activity (Candan et al., 2003) and protective effects against DNA damage (Xu et al., 2012). Flavonoids have also been reported, like apigenin- and luteolin-glycoside that present antispasmodic (Vitalini et al., 2011) and estrogenic activities (Innocenti et al., 2007).

This article aims at establishing a correlation between particle size and antioxidant activity of *H. perforatum* and *A. millefolium* powders. To this end, total phenolic content was measured using UV-spectrophotometry. Some polyphenols specific to *H. perforatum* and *A. millefolium* were identified and quantified by LC-ESI/MS. Finally, antioxidant activity was evaluated using DPPH radical scavenging assay. These results were compared to the bioactive compound contents of unground plant parts to evaluate the efficiency of the grinding/sieving procedure.

2. Material and methods

2.1. Plants

Dried aerial plant parts of wild and organic *H. perforatum* and *A. millefolium* were provided by Cailleau Herboristerie (Chemillé, France). They were manually harvested in July 2014. For conservation purposes, plants were supplied at about 12% moisture content after natural air drying at ambient temperature.

2.2. Chemicals

HPLC-grade acetonitrile, water, methanol, and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, 2,2′-Azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), standards of chlorogenic acid, 3.4 dicaffeoylquinic acid, 3.5 dicaffeoylquinic acid, 4.5 dicaffeoylquinic acid, (+)-catechin, (−)-epicatechin, hyperoside, luteolin-4-*O*-glucoside, luteolin-7-*O*-glucoside, apigenin-7-*O*-glucoside, I3,II8-biapigenin, and rutin were acquired from Sigma-Aldrich. Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride ($AlCl_3$), sodium nitrite ($NaNO_2$) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

2.3. Plant grinding

The fine grinding conditions were identical for both plants. Circa 1,7 kg of each dried plant was ground little by little (about 50 g per batch) with the Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch, France), operating by impact and shearing effects. Grinding was performed at 12000 rpm and ambient temperature using a 1 mm sieve with trapezoid holes. This rotor speed was chosen as a compromise between grinding efficiency and bioactive compound retention.

2.4. Plant powder sieving

Ground plant samples were sieved with the vibratory sieve shaker Analysette 3 Spartan (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany) at 0.5 mm vibration amplitude for 10 min. Plant powders were sieved in batches of circa 100 g to optimize sieve efficiency. 20 mm diameter sieves (Fritsch) were employed so as to obtain the following granulometric fractions: >500 μm; 315–500 μm; 180–315 μm; 100–180 μm; 50–100 μm; 20–50 μm; <20 μm. For both plants, almost no powder was found under the 20 μm sieve, precluding the analyses of these samples. Granulometric classes were weighted and then stored under vacuum in sealed bags at 10 °C.

2.5. Laser granulometry

The particle size distributions of all granulometric classes and unsieved plant powders were determined at dry state by laser diffraction granulometry (Mastersizer 3000, Malvern Instruments France, Orsay, France) at ambient temperature. The following dispersion conditions were employed to reach about 2% obscuration level:

−100% air pressure, 100% feed rate, 4 mm hopper length for unsieved powders and >500 μm granulometric class of both plants, along with 315–500 μm and 180–315 μm granulometric classes of *A. millefolium;*

−50% air pressure, 50% feed rate, 2 mm hopper length for other powder samples.

Table 2
Chemical composition (moisture, lipids, proteins, ashes, carbohydrates) on wet basis of all granulometric classes except <20 μm, and unground plant parts of *H. perforatum* and *A. millefolium*.

H. perforatum							
Sample	Unground plant	20–50 μm	50–100 μm	100–180 μm	180–315 μm	315–500 μm	> 500 μm
Moisture (%)	11.28 ± 0.39^{a}	10.96 ± 0.89^{a}	9.75 ± 0.37^{b}	10.03 ± 0.40^{b}	10.19 ± 0.12^{b}	10.26 ± 0.43^{b}	9.20 ± 0.17^{c}
Lipids (%)	2.94 ± 0.44^{f}	21.22 ± 0.73^{a}	13.11 ± 0.65^{b}	11.73 ± 0.65^{c}	8.32 ± 0.56^{d}	7.88 ± 1.35^{d}	4.79 ± 0.92^{e}
Proteins (%)	7.23 ± 0.44^{d}	15.67 ± 0.24^{b}	16.32 ± 0.64^{a}	17.24 ± 0.55^{a}	16.86 ± 0.81^{a}	12.31 ± 0.35^{c}	7.40 ± 1.18^{d}
Ashes (%)	3.47 ± 0.16^{e}	6.37 ± 0.07^{a}	4.90 ± 0.11^{b}	4.28 ± 0.08^{c}	4.42 ± 0.07^{c}	4.01 ± 0.18^{d}	2.14 ± 0.16^{f}
Carbohydrates (%)	75.08 ± 1.43^{a}	45.78 ± 1.93^{e}	55.92 ± 1.77^{d}	56.72 ± 1.68^{d}	60.21 ± 1.56^{c}	65.54 ± 2.31^{b}	76.47 ± 2.43^{a}
A. millefolium							
Sample	Unground plant	20–50 μm	50–100 μm	100–180 μm	180–315 μm	315–500 μm	> 500 μm
Moisture (%)	11.00 ± 0.31^{a}	11.20 ± 0.53^{a}	10.17 ± 0.22^{b}	9.54 ± 0.27^{c}	10.10 ± 0.14^{b}	9.40 ± 0.56^{c}	9.22 ± 0.07^{c}
Lipids (%)	4.39 ± 1.19^{d}	20.73 ± 1.37^{a}	18.91 ± 0.74^{a}	15.68 ± 0.88^{b}	7.72 ± 0.44^{c}	7.56 ± 0.49^{c}	4.02 ± 0.41^{d}
Proteins (%)	7.72 ± 0.58^{d}	15.61 ± 0.74^{a}	17.21 ± 1.16^{a}	13.91 ± 0.85^{b}	11.56 ± 0.25^{c}	11.12 ± 0.35^{c}	8.01 ± 0.34^{d}
Ashes (%)	5.79 ± 1.56^{d}	12.73 ± 0.14^{a}	8.96 ± 0.27^{b}	8.03 ± 0.25^{c}	7.70 ± 0.27^{c}	6.52 ± 0.29^{d}	5.42 ± 0.35^{d}
Carbohydrates (%)	71.10 ± 3.64^{a}	39.73 ± 2.78^{e}	44.75 ± 2.39^{e}	52.84 ± 2.25^{d}	62.92 ± 1.10^{c}	65.40 ± 1.69^{b}	73.33 ± 1.17^{a}

Presented data are mean ± standard deviation of triplicate measures; for each plant, mean values in the same line followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

Particle sizes were expressed in terms of equivalent spherical diameters in volume. The mean particle size D_{50} was defined as the diameter for which 50% of the volume of particles has a lower diameter.

2.6. Powder composition

Analyses of powder composition (moisture, lipids, proteins, minerals, and carbohydrates) were performed for all granulometric fractions where sufficient amount of powder was available and for the unground plant parts. Water content was measured by weight loss after drying 2 g of powder at 105 °C for 5 h (AFNOR, 1976 AFNOR, 1978). Total protein content was determined by the Kjeldhal method for quantification of nitrogen, using a conversion factor of 6.25 that is suitable for plants (AACC International, 1999a). Fat content was quantified by Folch method (Folch et al., 1957) using 1 (20–50 μm granulometric classes) or 3 g (other samples) of sample. Mineral content was determined by putting 2 g of powder at 500 °C for 5 h until formation of white ashes (ADPI, 2002). Carbohydrate content was calculated by the difference between 100% and the contents in other components; its standard error was deduced by propagation of uncertainties.

2.7. Preparation of extracts

2 g of powder of dried aerial parts were extracted with 20 mL of 70% methanol. Maceration was performed overnight under stirring (300 rpm) in order to extract all extractable compounds and reach the same extraction yield for small and large particles (Ćujić et al., 2015). This soft extraction technique that does not require heating or adding acid was chosen to prevent phenolic compound degradation. Then, hydroalcoholic extracts were centrifuged under 3460*g* for 20 min, the supernatant was filtered, brought to 15 mL with 70% methanol, and stored at 4 °C until analysis.

2.8. UV–vis analyses

2.8.1. Total phenolic content

Total phenolic content (TPC) were measured as described by Wafa et al. (2014). 40 μL of samples was added to test tubes containing 3160 μL distilled water, followed by addition of 200 μL Folin-Ciocalteu reagent (1 N) and 600 μL sodium carbonate (20%). Samples and blank were thoroughly mixed and vortexed. After 40 min of incubation at room temperature, absorbance was measured at 725 nm. Gallic acid (from 1 to 3 mg/mL by 0.5 mg/mL steps) was used for calibration and total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry matter (mg GAE/g DM). UV–vis analyses were carried out with the Cary 50 Scan UV–vis spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, California, USA).

2.8.2. Antioxidant activity: DPPH assay

Antioxidant activity is defined as the ability of a compound to inhibit oxidative degradation (Roginsky and Lissi, 2005). The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to the method detailed by Sharififar et al. (2009). 1 mL of 100 μM DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 min and its optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 mL DPPH methanolic solution was mixed with 1 mL methanol. The DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds was expressed in terms of IC50 values that refers to the smallest concentration of antioxidants required to scavenge 50% of the DPPH radical.

2.9. LC-ESI/MS analyses

2.9.1. Analytical conditions

LC-ESI/MS analyses were performed with a LC–MS 2020 system (Shimadzu, Tokyo, Japan) associated with an electrospray ionization source. Separation was carried on a Gemini 3 μm C18 130 Å reversed phase column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) of 150 mm length and 4.6 mm i.d. The mobile phase consisted in a mixture of (A) 0.5% formic acid in aqueous solution and (B) acetonitrile. The injection volume was 20 μL and the flow rate was set at 0.6 mL/min. The column oven temperature was fixed at 30 °C. The following elution gradient was used: 0–22.5 min: linear gradient from 90:10 (A:B) to 50:50; 22.5–23 min: linear gradient from 50:50 to 10:90; 23–29 min: elution at 10:90; 29–29.5 min: linear gradient from 10:90 to 90:10; 29.5–35 min elution at 90:10 (re-equilibration step). The mass spectrometer settings were identical for all plant extracts: negative mode ESI source, 1.5 L/min nebulization gas flow, 15 L/min drying gas flow, 350 °C heat block temperature, 250 °C desolvation line temperature, −4000 V probe voltage. To avoid contamination of the electrospray source, *H. perforatum* and *A. millefolium* extracts were filtrated, then diluted fifty and thirty times, respectively.

2.9.2. Calibration method

The identification of phenolic compounds in plant extracts was based on standard compound analyses confronting m/z ratio and LC retention time (t_R). For quantitative analysis, a five-level linear calibration curve was obtained by injection of known concentrations (from 10^{-4} to 10^{-2} mg/mL) of standards. Method sensitivity was assessed by determining the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), defined as the concentrations leading to

Table 3
Quantification of major polyphenols in powder extracts and unground plant part extracts of *H. perforatum* and *A. millefolium*.

Compound	*m/z*	Retention time (min)	*H. perforatum*		*M. millefolium*	
			Powders	Unground plant	Powders	Unground plant
epicatechin	289	10.1	3.31 ± 0.12^{a} (100–180 μm)	2.31 ± 0.09^{b}	/	/
chlorogenic acid	353	8.7	0.91 ± 0.08^{a} (180–315 μm)	0.59 ± 0.04^{b}	2.76 ± 0.05^{a} (315–500 μm)	2.60 ± 0.01^{b}
hyperoside	463	13.1	26.94 ± 0.26^{a} (100–180 μm; 180–315 μm)	15.55 ± 0.38^{b}	/	/
I3,II8-biapigenin	537	22.51	1.75 ± 0.08^{a} (100–180 μm)	0.63 ± 0.05^{b}	/	/
rutin	609	12.4	9.34 ± 0.43^{a} (100–180 μm; 180–315 μm)	4.81 ± 0.19^{b}	3.78 ± 0.04^{a} (100–180 μm)	3.01 ± 0.02^{b}
apigenin-7-glucoside	431	14.9	/	/	1.73 ± 0.01^{a} (180–315 μm)	1.53 ± 0.01^{b}
luteolin-7-glucoside	447	13.1	/	/	0.95 ± 0.01^{a} (100–180; 180–315 μm)	0.89 ± 0.02^{b}
3,5 diCQa	515	14.6	/	/	7.97 ± 0.06^{a} (315–500 μm)	7.63 ± 0.22^{b}

signal-to-noise (S/N) values of 3 and 10, respectively. The following calibration parameters were obtained: chlorogenic acid ($R^2 = 0.997$; LOD = 2.2 ppm; LOQ = 7.0 ppm); 3.5 dicaffeoylquinic acid ($R^2 = 0.999$; LOD = 1.6 ppm; LOQ = 5.3 ppm); epicatechin ($R^2 = 0.999$; LOD = 1.9 ppm; LOQ = 8.3 ppm); hyperoside ($R^2 = 0.991$; LOD = 0.3 ppm; LOQ = 0.9 ppm); luteolin-7-*O*-glucoside ($R^2 = 0.994$; LOD = 1.3 ppm; LOQ = 4.4 ppm); apigenin-7-*O*-glycoside ($R^2 = 0.997$; LOD = 0.1 ppm; LOQ = 0.3 ppm), I3,II8-biapigenin ($R^2 = 0.995$; LOD = 0.3 ppm; LOQ = 0.9), and rutin ($R^2 = 0.998$; LOD = 0.3 ppm; LOQ = 0.9 ppm). Results were expressed in mg of standard per gram of dry matter.

2.10 Statistical analyses

All experiments were performed in triplicate. Data are expressed as means ± standard deviations. Statistical analysis was conducted using SAS software (v8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Mean values were compared by using Student's *t* test at $p < 0.05$ significance level.

3. Results and discussion

3.1. Sample granulometry

It was first ensured that the developed grinding/sieving procedure led to well-different granulometric fractions in terms of particle size. Table 1 presents sieving and laser granulometry results. The grinding/sieving procedure was effective in producing enough powder for further analyses in all granulometric classes, except the smallest one (<20 μm). The correct running of the sieving process was confirmed by the fact that mean particle sizes were systematically comprised in or slightly superior to the size range of granulometric classes. All studied powder samples presented monomodal particle size distributions, except the unsieved fraction of *A. millefolium* that was bimodal (first and second modes respectively at 375 and 1527 μm). The mass yield for the 20–500 μm fraction of *H. perforatum* and *A. millefolium* powders reached 56.8% and 26.2%, respectively. A longer grinding time and/or a higher grinding speed could increase mass yield of *A. millefolium*. Using a grinding sieve of smaller mesh can also be considered to fulfill higher mass yields for intermediate size fractions of *A. millefolium* powder.

3.2. Chemical composition

Moisture, lipids, proteins, ashes, and carbohydrate contents of all granulometric classes except the <20 μm one, and unground plant parts of *H. perforatum* and *A. millefolium* were evaluated to investigate the influence of the sieving step (Table 2). The chemical composition of studied plant powders was greatly dependent on granulometric class: when decreasing the particle size, carbohydrate contents decreased, whereas other component (lipids, proteins, and ashes) contents increased. Bioactive compounds are often associated with proteic and fatty fractions, thus the smaller granulometric fractions are expected to have higher levels of bioactive compounds. No clear trend can be drawn from moisture results: all samples had similar moisture contents, showing that the heating effect of grinding (more pronounced for smaller particles) was compensated by the higher specific surface of small particles, facilitating the absorption of surrounding air humidity. Also, all characterized powders were mainly composed of carbohydrates, in agreement with the high fiber content of plants. Fiber-rich materials are expected to be difficult to grind and thus lead to higher particle sizes, which may be the reason why the carbohydrate content fell at lower particle size. However, polyphenols bound to fibers are not accessible through conventional maceration techniques. Indeed, the covalent bonds between phenolic compounds and fiber matrix could be broken only when particle size is reduced down to the nanoscale (Van Craeyveld et al., 2009).

3.3. Total phenolic content

Total phenolic content (TPC) of samples are displayed in Fig. 1. Overall, total phenolic contents of *H. perforatum* samples were more than twice superior to the TPCs of *A. millefolium* samples. The highest TPC was found in the 100–180 μm fraction: 125 and 45 mg GAE/g DM for *H. perforatum* and *A. millefolium*, respectively. The lowest (20–50 μm) and the highest (>500 μm) particle sizes led to lower TPCs than intermediate granulometric classes (50–100 μm, 100–180 μm, 180–315 μm). This phenomenon was expected: on one hand, larger particles contained more carbohydrates and thus less bioactive compounds; on the other hand, smaller particles were subjected to a higher temperature level during grinding, which is detrimental to thermosensitive biomolecules like polyphenols. To limit heating during the process, the grinding could be assisted with airflow cooling systems or even cryogenic grinding could be used. For both plants, TPCs were significantly higher in powders than in unground plant parts, except for particle size superior to 500 μm, showing the interest of successive grinding and sieving processes to optimize bioactive compound content in certain granulometric classes of plant powders.

3.4. LC-ESI/MS analyses

3.4.1. Characterization of phenolic compounds

Plant powder extracts were analyzed by LC-ESI/MS to identify and quantify the main phenolic compounds. Extracted-ion chromatograms of *A. millefolium* and *H. perforatum* extracts are displayed in Fig. 2. The highest signal of phenolic compounds in *A. millefolium* extracts was found at *m/z* 515, corresponding to a dicaffeoylquinic acid. Small peaks (4 and 4", Fig. 2) were located at retention times close to the substantial peak of dicaffeoylquinic acid. By comparison with standards, peaks at 14.2, 14.8, and 15.5 min retention times were attributed to 3.4-, 3.5-, and 4.5- dicaffeoylquinic acids, respectively. This elution order of dicaffeoylquinic acids has been reported in several studies (Dias et al., 2013; Vitalini et al., 2011). Chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid) was detected at *m/z* 353 and $t_R = 8.7$ min in

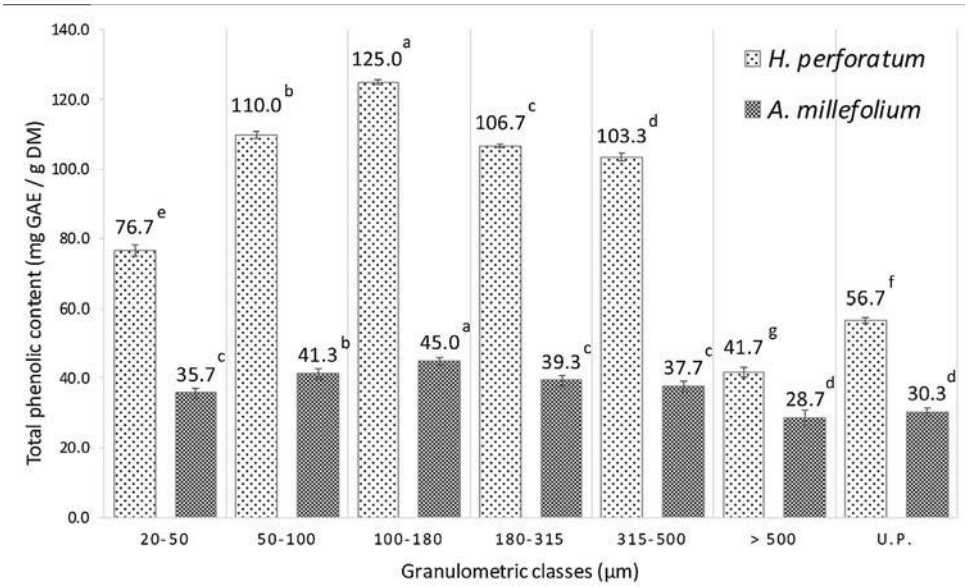


Fig. 1. Total phenolic content and antioxidant activity of *H. perforatum* and *A. millefolium* for the following granulometric classes: 20–50 μm, 50–100 μm, 100–180 μm, 180–315 μm, 315–500 μm, >500 μm and for unground plant "U.P". Presented data are mean ± standard deviation of triplicates (n = 3). Means for a same plant followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

both *A. millefolium* and *H. perforatum* extracts (peaks 1 and B, Fig. 2). As for flavonoids, epicatechin (t_R = 10.1 min; peak A', Fig. 2), I3,II8-biapigenin (t_R = 22.5 min; peak D, Fig. 2), and hyperoside (t_R = 13.1 min; peak C, Fig. 2) were identified in *H. perforatum*. The latter, a glycosylated quercetin, was the most intense signal recorded for *H. perforatum* extracts. Rutin exhibited intense signals in both plants (t_R = 12.5 min; peaks 5 and D, Fig. 2). Finally, apigenin-7-*O*-glucoside (t_R = 15.1 min) and luteolin-7-*O*-glucoside (t_R = 13.2 min), antiplasmodial compounds, were detected exclusively in *A. millefolium* (peaks 2 and 3′, Fig. 2). The presence of luteolin-4-*O*-glucoside was also confirmed at t_R = 11.1 min (peak 3, Fig. 2).

3.4.2. Quantification of phenolic compounds

The main antioxidant compounds identified in the previous subsection were quantified in the different powder and unground plant extracts (Table 3). In *H. perforatum* extracts, the highest contents in bioactive compounds were found in the 100–180 and 180–315 μm granulometric classes. Hyperoside and I3,II8-biapigenin exhibited the highest content in the 100– 180 fraction: 26.94 and 1.75 mg/g DM, respectively. Rutin content was also noteworthy in intermediate granulometric classes (100–180 μm and 180–315 μm). In *A. millefolium* extracts, phenolic acids were present in important proportions, especially 3.5 dicaffeoylquinic acid (7.97 mg/g DM in the 315–500 μm fraction). Chlorogenic acid content in *A. millefolium* extracts was also higher than in *H. perforatum* extracts. Luteolin-7-*O*-glucoside and apigenin-7-*O*-glucoside were the most concentrated in the 100–180 and 180–315 μm granulometric classes: 0.95 and 1.73 mg/g DM, respectively. Rutin was three times more concentrated in *H. perforatum* than in *A. millefolium*.

Overall, polyphenol contents were significantly higher in powder fractions compared to unground plants. Discrepancies between powders and unground plant parts for *A. millefolium* were less important than for *H. perforatum* extracts, but still notable. Finally, these results confirm the trend drawn from the total phenolic content results: the 100–180 μm and 180–315 μm fractions showed the highest contents in bioactive compounds, confirming the efficiency of the grinding and sieving procedure in isolating granulometric classes with higher bioactive compound contents.

Table 4
Antioxidant activity of *H. perforatum* and A. millefolium for the following granulometric classes: 20–50 μm, 50–100 μm, 100–180 μm, 180–315 μm, 315–500 μm, >500 μm and for unground plant parts "U.P".

Granulometric classes (μm)	Antioxidant activity (IC50 mg/mL)	
	H. perforatum	*A. millefolium*
20–50	0.50 ± 0.01^a	0.76 ± 0.02^a
50–100	0.44 ± 0.02^b	0.64 ± 0.04^b
100–180	0.43 ± 0.02^b	0.51 ± 0.03^c
180–315	0.47 ± 0.01^c	0.58 ± 0.01^d
315–500	0.51 ± 0.02^a	0.74 ± 0.03^a
> 500	0.66 ± 0.03^d	0.84 ± 0.01^e
U.P.	0.60 ± 0.01^e	0.80 ± 0.03^a

Data were mean ± standard deviation of triplicate (n = 3). Means in the same column followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

LC-ESI/MS enabled to observe a differential bioactive compound distribution according to particle size. This cannot be attributed to mass transfer limitations according to particle size, as similar extraction yields are expected for large and small particles when using such long maceration times (over 12 h).

3.5. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the different powder fractions from *H. perforatum* and *A. millefolium* was evaluated by the DPPH cation radical scavenging assay in terms of IC50 (Table 4). The lower the IC50 value, the more reactive the considered bioactive compound. Maximum antioxidant activities were obtained for the 100–180 μm granulometric classes with IC50 of 0.43 and 0.51 mg/mL for *H. perforatum* and *A. millefolium*, respectively. This confirms the better antioxidant capacity of *H. perforatum* compared to *A. millefolium*. IC50 values were consistent with literature ones: Dias et al. (2013) evaluated the IC50 at 0.50 mg/mL for methanol extract of *A. millefolium*, and the IC50 values determined by Gioti et al. (2009) were comprised between 0.18 and 0.23 mg/mL for *H. perforatum*. Observed differences can be due to intrinsic factors, mainly genetics and plant parts selected for extractions; or extrinsic factors, such as climatic factors, processing conditions (in particular during grinding), and storage conditions (Ghasemnezhad et al., 2011).

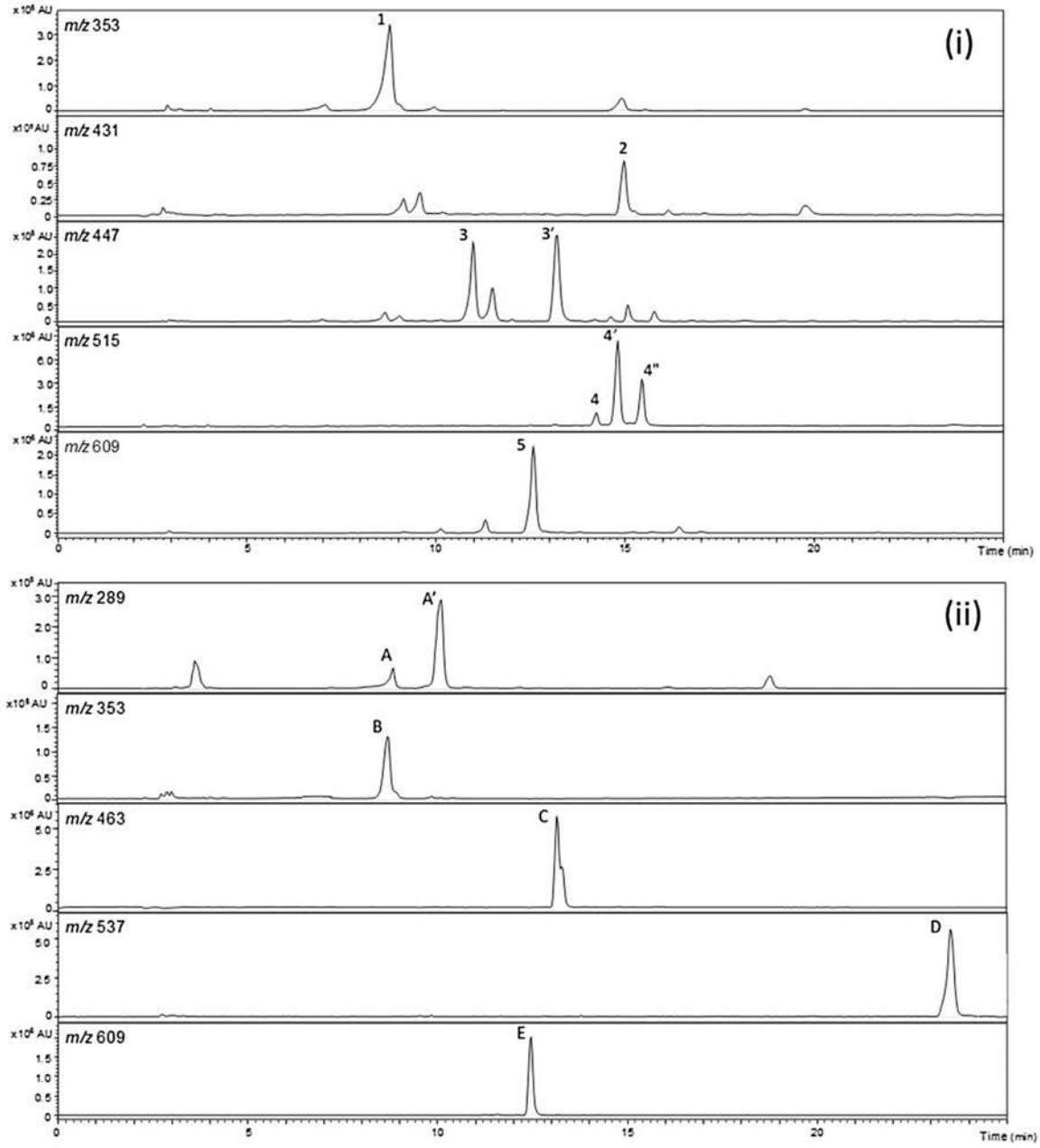


Fig. 2. Extracted-ion chromatograms from LC-ESI/MS analyses of *A. millefolium* (i) and *H. perforatum* (ii) methanolic extracts. Peaks related to *A. millefolium*: chlorogenic acid (1); apigenin-7-*O*-glucoside (2); luteolin-7-*O*-glucoside (3); luteolin-4-*O*-glucoside (3′); 3.4-dicaffeoylquinic acid (4); 3.5-dicaffeoylquinic acid (4′); 4.5-dicaffeoylquinic acid (4"); rutin (5). Peaks related to *H. perforatum*: (+)-catechin (A); (−)-epicatechin (A'); chlorogenic acid (B); hyperoside (C); I3,II8-biapigenin (D); rutin (E).

A similar distribution of antioxidant activity according to granulometric classes was observed for both plants. As previously stated, the observed drop of the antioxidant activity for the smaller particle sizes could be due to the local temperature rise during grinding (causing thermal degradation of thermosensitive bioactive compounds) and to their higher specific area of particles (resulting in higher moisture content, see Table 2). IC50 values for unground plants were significantly higher than IC50 values of powders, except for particle sizes superior to 500 μm, showing that the highest fraction was depleted in bioactive compounds, consistently with its greater carbohydrate (fiber) and moisture contents. The fact that the highest antioxidant activity was obtained from intermediate granulometric classes (50–100 μm, 100–180 μm, and 180–315 μm) confirms the existence of an optimal particle size range for bioactive compound extraction.

Finally, a marked positive correlation was observed between DPPH tests and total phenolic content: the calculated Pearson's correlation coefficient for all investigated samples was equal to 0.87. The increase in the antioxidant activity of studied powders and unground plant parts corresponds to an increase in total phenolic content, both dependent on particle size. This means that antioxidant activity of *H. perforatum* and *A. millefolium* powders mainly derived from polyphenols as described by Orčić et al. (2011).

4. Conclusion

In present work, the effect of successive grinding and sieving processes of *H. perforatum* and *A. millefolium*, plants rich in bioactive compounds, was investigated. Grinding enabled a better accessibility of these compounds towards solvent extraction in resulting powders compared to unground plants. The bioactive compound contents were strongly dependent on particle size, revealing a differential distribution of compounds after the sieving step. DPPH radical scavenging assay, total phenolic content, and LC-ESI/MS quantifications confirmed this conclusion and the existence of optimal granulometric classes for bioactive compound extraction: maximal antioxidant activities and bioactive compound contents were reached for intermediate powder fractions (50–100 μm, 100–180 μm and 180–315 μm) of *H. perforatum* and *A. millefolium*. The lowest fractions led to a loss of polyphenol content owing to the temperature rise during grinding and the increase in the specific area of particles, while fractions over 315 μm are expected to contain more fibers, and so, less bioactive compounds. Thus, this study establishes a link between the antioxidant activity and the particle size of plant powders.

Acknowledgments

The authors thank the “Lorraine Extrapole” project group and the Lorraine region for financial support.

The authors also thank Dr. Florentin Michaux (LIBio) for his expertise about dispersion conditions in laser diffraction analysis, Carole Perroud (LIBio) for her contribution to powder production, and Carole Jeandel and Carole Perroud (LIBio) for their advices about analytical protocols used to determine powder chemical composition.

References

AACC International, 1999a. Method 46-11.02. In: Crude Protein—Improved Kjeldahl Method, Copper Catalyst Modification. Approved Methods of Analysis, 11th ed. AACC International, St. Paul, MN, USA (reapproved November 3 1999).

ADPI (American Dry Product Institute, Elmhurst, IL), 2002. Determination of toal ash in standards for grades of dry milks including methods of analysis. Bulletin 916, 40–41.

AFNOR (Agence Française de NORmalisation), 1976. Détermination de la teneur en eau—méthode par étuvage, No: V04–348.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. J. Food Eng. 117, 426–436, http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014 (SI: Extraction and Encapsulation).

Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry: pharmacology and clinical properties. J. Pharm. Pharmacol. 53, 583–600.

Benedek, B., Gjoncaj, N., Saukel, J., Kopp, B., 2007. Distribution of phenolic compounds in middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. Aggregate. Chem. Biodivers. 4, 849–857, http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200790072.

Bernardi, A.P.M., López-Alarcón, C., Aspee, A., Rech, S., Von Poser, G.L., Bride, R., Lissp, E., 2007. Antioxidant activity of flavonoides isolated from Hypericum ternum. J. Chil. Chem. Soc. 52, 1326–1329, http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072007000400013.

Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R., 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from Prunus domestica (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. J. Neurol. Sci. 262, 77–84, http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.028, Environmental Neurology Proceedings of the Meetings of the Environmental Neurology Club, held in Paris, France, 2–3 December 2005 and in Metz, France, 7 February 2007, under the aegis of the French Society of Neurology, The University of Metz, and the Environmental Neurology Research Group of the World Federation of Neurology (ENRG-WFN).

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S., 2015. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. Food Chem. 194, 135–142, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. millefolium Afan (Asteraceae). J. Ethnopharmacol. 87, 215–220, http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00149-1.

Colovic, M., Caccia, S., 2008. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry of I3 II8-biapigenin, the major biflavone in *Hypericum perforatum* extracts. J. Chromatogr. B 863, 74–79, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.014.

Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food Chem. 141, 4152–4160, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.018.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497–509.

Ghasemnezhad, M., Sherafati, M., Payvast, G.A., 2011. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (Capsicum annum) fruits at two different harvest times. J. Funct. Foods 3, 44–49, http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.002.

Gioti, E.M., Fiamegos, Y.C., Skalkos, D.C., Stalikas, C.D., 2009. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus. Greece. Food Chem. 117, 398–404, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.016.

Higdon, J.V., Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43, 89–143, http://dx.doi.org/10.1080/10408690390826464.

Hu, J., Chen, Y., Ni, D., 2012. Effect of superfine grinding on quality and antioxidant property of fine green tea powders. LWT—Food Sci. Technol. 45, 8–12, http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.002.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L., 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. J. Food Compos. Anal. 21, 589–598, http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.011.

Innocenti, G., Vegeto, E., Dall' Acqua, S., Ciana, P., Giorgetti, M., Agradi, E., Sozzi, A., Fico, G., Tomè, F., 2007. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. Phytomedicine 14, 147–152, http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2006.05.005.

Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci. World J. 2013, e162750, http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750.

Luque de Castro, M.D., Garcúa-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Anal. Chim. Acta 369, 1–10, http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5.

Maaroufi, C., Melcion, J.-P., de Monredon, F., Giboulot, B., Guibert, D., Le Guen, M.-P., 2000. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving I. Physical and chemical characteristics of pea seed fractions. Anim. Feed Sci. Technol. 85, 61–78, http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00127-9.

Murthy, C. t., Rani, M., Rao, P. n. S., 1999. Optimal grinding characteristics of black pepper for essential oil yield. J. Food Process Eng. 22, 161–173, http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.1999.tb00478.x.

Nöldner, M., Schötz, K., 2002. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. Planta Med. 68, 577–580, http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-32908.

Orčić, D.Z., Mimica-Dukić, N.M., Francišković, M.M., Petrović, S.S., Jovin, E.Đ., 2011. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. Chem. Cent. J. 5, 34, http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-5-34.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell. Longev. 2, 270–278.

Ploss, O., Petereit, F., Nahrstedt, A., 2001. Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*. Pharmazie 56, 509–511.

Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 92, 235–254, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004.

Rostagno, M.A., Prado, J.M., 2013. Natural product extraction: principles and applications. R. Soc. Chem.

Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Mendonça, L.Z., Soares, M.J., 2007. Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. Exp. Parasitol. 116, 283–290, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.018.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Yoga Latha, L., 2010. Extraction: isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 8, 1–10.

Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chem. 112, 885–888.

Singh, K. k., Goswami, T.K., 1999. Studies on cryogenic grinding of cumin seed. J. Food Process Eng. 22, 175–190, http://dx.doi.org/10.1111/j.1745 –4530.1999.tb00479.x.

Trumbeckaite, S., Benetis, R., Bumblauskiene, L., Burdulis, D., Janulis, V., Toleikis, A., Viškelis, P., Jakštas, V., 2011. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. Food Chem. 127, 1540–1548, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.014.

Tusevski, O., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Simic, S.G., 2013. Phenolic profile of dark-Grown and photoperiod-Exposed *Hypericum perforatum* L. hairy root cultures. Sci. World J. 2013, e602752, http://dx.doi.org/10.1155/2013/602752.

Van Craeyveld, V., Holopainen, U., Selinheimo, E., Poutanen, K., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2009. Extensive dry ball milling of wheat and rye bran leads to in situ production of arabinoxylan oligosaccharides through nanoscale fragmentation. J. Agric. Food Chem. 57, 8467–8473, http://dx.doi.org/10.1021/jf901870r.

Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M., Fico, G., 2011. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. Acta Biochim. Pol. 58, 203–209.

Wafa, G., Amadou, D., Larbi, K.M., Héla, E.F.O., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. Ind. Crops Prod. 56, 43–51, http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.036.

Xu, J.-G., Hu, Q.-P., Liu, Y., 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. J. Agric. Food Chem. 60, 11625–11630, http://dx.doi.org/10.1021/jf303771s. Zhang, Z., Song, H., Peng, Z., Luo, Q., Ming, J., Zhao, G., 2012. Characterization of stipe and cap powders of mushroom (*Lentinus edodes*) prepared by different grinding methods. J. Food Eng. 109, 406–413, http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.007.

Zhao, X., Yang, Z., Gai, G., Yang, Y., 2009. Effect of superfine grinding on properties of ginger powder. J. Food Eng. 91, 217–222, http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.08.024.

Powder Technology 301 (2016) 649–656

Contents lists available at ScienceDirect

Powder Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/powtec

Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders

Ali Zaiter [a,*,1], Loïc Becker [a,*,1], Jeremy Petit [b], David Zimmer [b], Marie-Céleste Karam [b], Élie Baudelaire [c], Joël Scher [b], Amadou Dicko [a]

[a] Université de Lorraine, UR-AFPA (Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux), 1, boulevard Arago, Metz Cedex 03 57078, France
[b] Université de Lorraine, LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules), 2, avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[c] AGRITECH, 4, rue Piroux, 54000 Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 March 2016
Received in revised form 24 May 2016
Accepted 3 July 2016
Available online 5 July 2016

Keywords:
Salix alba (L.) bark
Grinding
Granulometric class
Antiacetylcholinesterase
Antioxidant activity
LC-ESI/MS

ABSTRACT

This work aims at identifying and quantifying the main bioactive compounds in hydroalcoholic extracts of *Salix alba* (L.) bark powders obtained by grinding and sieving. The influence of the granulometric class on antioxidant activity and acetylcholinesterase (AchE) inhibition effect were investigated. Our study highlights that all granulometric classes revealed a high antioxidant activity and a good efficiency against the action of AchE enzyme. The 50–100 μm granulometric class led also to the highest content in phenolic compounds (circa 52.7 mg gallic acid equivalent/g of dry matter). The best results were obtained for the 50–100 μm granulometric class: the IC_{50} value for anti-AChE activity reached 0.59 μg/mL. These results reveal the interest of the fine grinding and sieving procedure to enhance antioxidant and anti-AChE activities of *Salix alba* (L.), as significantly higher levels of bioactive compounds were found in ground and sieved fractions in comparison with unground dry *Salix alba* (L.) bark.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last few years, the search for natural drugs increased and medicinal plants emerged as alternatives to synthetic products. They are not only used in traditional medicines but also in a great number of pharmaceutical products, due to their bioactivity. Indeed, there have been extensive efforts to investigate the preventive role of nutraceuticals against diseases [1,2]. Herbal manufacturing is receiving attention since numerous bioactive compounds present in plants serve as starting points for the development of new drugs [3]. Clinical studies have shown that herbal drugs obtained from willow bark are better tolerated by patients than synthetic derivatives [4]. Therefore, many people have begun to opt for *Salix alba* (L.) bark as an alternative to aspirin. This plant is the most important natural source of salicin, an alcoholic β-glucoside. This compound is easily assimilated in the gastrointestinal tract, releasing salicylic alcohol, which is oxidized in the liver into salicylic acid, thereby causing no damage to the gastric mucosa [5].

Several studies have concentrated on phytochemical research of *Salix* species used for the preparation of willow bark extracts. *Salix daphnoides*, *Salix pentadra*, *Salix purpurea*, *S. alba*, and *Salix fragilis* have been studied for their composition in polyphenols, known for their antioxidant activity. The latter is a fundamental property of polyphenolic compounds in plants, which have other pro-health activities, such as antimutagenic, anticarcinogenic, and anti-aging. Polyphenols have the ability to scavenge reactive oxygen species (ROS), preserving the genomic stability of cells through elimination of carcinogens and interference with DNA adduct formation [6]. Antioxidants can protect biological systems against potentially harmful effects [7]. When the production balance between ROS and defense systems is disrupted, oxidative stress sets in, promoting many diseases such as cancer, atherosclerosis, and other cardiovascular disorders, diabetes, accelerated aging [8], and Alzheimer's disease [9].

Nowadays, neurodegenerative diseases are estimated to surpass cancer as the second most common cause of death among ages by the 2040s [10]. Acetylcholinesterase is a key enzyme catalyzing the hydrolysis of acetylcholine to choline and acetic acid. In some pathologic conditions leading to low acetylcholine concentrations in the synaptic zone, it can cause loss of memory and impairment of multiple cerebral functions in the nervous system of animals [11]. Acetylcholine deficiency in the synapses of human cerebral cortex is one of the main cause of Alzheimer's disease [12]. Galantamine is a synthetic AChE inhibitor used to enhance memory for Alzheimer patients. The standard drug galantamine has been shown to exhibit a competitive inhibition pattern [13]. However, AChE commercial inhibitors present some restrictions, such as their short half-lives and large side effects, as well as

* Corresponding authors at: Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux, Université de Lorraine, 1, boulevard Arago, F-57078 Metz Cedex 03, France.
E-mail address: loic.becker@univ-lorraine.fr (L. Becker).
[1] Ali Zaiter and Loïc Becker are the first authors of this article.

http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.014
0032-5910/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

hepatotoxicity, which is the most common and important side effect of these treatments [14]. Current pharmacology focuses on the synthesis of potent and concentrated substances with a specific therapeutic effect, even though a similar effect can be obtained using natural medicinal plant materials [5].

Ejaz Ahmed et al. [15] have evidenced an additional contribution of polyphenolic compounds to neuroprotective effects of catechin against Alzheimer's disease. Even more recently, it has been found that the presence of flavonoids in plants, mainly catechin, might be responsible for AChE inhibitory and antioxidant activities [16]. Kwon et al. [17] reported that chlorogenic acid inhibits both free radical scavenging and AChE activities. Besides, in addition to its powerful antioxidant activity, Ouattara et al. [18] reported that chlorogenic acid induces neuroprotective effects by AChE inhibition and thus presents a double benefit. The search for new AChE inhibitors derived from natural sources and having few side effects is urgently required [19]. Research on plant-derived inhibitors of AChE has accelerated in view of the benefits of these drugs to the treatment of Alzheimer's disease [20]. Nevertheless, scientific information remains very limited for various plants and compounds with notable anti-AChE activity. Gomathi and Manian [21] reported that hydroalcoholic extracts of *Scolopia crenata* bark have an inhibitory effect against AchE as near as the common synthetic drug galantamine. Another study showed that the methanol extract of the stem barks of *Ficus carica* has a good effect against AChE [22].

A way to enhance bioactive compounds concentration in hydroalcoholic extracts from plant material could be to grind dried plants, sieve the obtained powders, and finally select the granulometric class having the best activity, before performing the hydroalcoholic extraction [23,24]. However, temperature increase during grinding is a crucial phenomenon in regard to powder quality (usually, 99% of input grinding power is converted into heat [25]), requiring a careful choice of process conditions to limit its impacts. Biochemical alterations of food materials due to temperature increase during grinding (locally up to 90 °C [26]) may result in modifications of their physicochemical properties [27] like color alteration (product surface darkening [28]), which lowers their organoleptic properties [25] and sometimes causes bioactivity losses [29]. Temperature increase is more pronounced for smaller particles, as heat comes from the breaking of the chemical bonds of the material to be ground, but also, and above all, from the friction between particles while flowing in the grinder. Besides, the grinding process has to be optimized to avoid extensive oxidation of surface compounds (in direct contact with air oxygen), especially for small particles of high specific surface area.

This study aims at evaluating antioxidant activity and AChE enzyme inhibition related to the particle size generated by fine grinding of *Salix alba* (L.) bark followed by sieving into seven granulometric classes. In this purpose, total polyphenol content, as well as antioxidant activity by DPPH and Ellman tests, and anti-AChE activity were determined using UV/visible methods. Catechin, gallocatechin chlorogenic acid, procyanidins, and salicin were identified and quantified by LC-ESI/MS. The contents in bioactive compounds of all granulometric fractions were compared to those of unground plant to assess the efficiency of the successive grinding/sieving process.

2. Materials and methods

2.1. Plants

Barks from 3-year-old branches of wild *Salix alba* (L.) were provided by Cailleau Herboristerie (Chemillé, France). They were manually harvested in October 2014 in Bulgaria and, for conservation purposes, they were artificially dried between 35 and 40 °C by the supplier in order to reach about 10% moisture content.

2.2. Chemicals

Chemicals Folin-Ciocalteu phenol reagent, 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), dihydrochloride (AAPH), gallic acid, galantamine, sodium chloride, hydrochloric acid, ethyl acetate, acetic acid, p-iodonitrotetrazolium chloride (INT), acetylcholinesterase (AChE), acetylcholine iodide (ATCI), 5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), and 2-thiobarbituric acid, as well as standards of salicin, (+)-catechin, (−)-gallocatechin, chlorogenic acid , procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin C1, and gallic acid, were acquired from Sigma-Aldrich Corporation (Saint Quentin Fallavier, France). HPLC-grade acetonitrile, water, methanol, and formic acid were purchased from Sigma Chemicals Co. (Saint Louis, MO). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride ($AlCl_3$), sodium nitrite ($NaNO_2$), and sodium hydroxide (NaOH) from Acros Organics (Geel, Belgium). Stock solutions of standards were prepared in 70% methanol at a concentration of 0.5 mg/mL and diluted when needed.

2.3. Plant grinding

The fine grinding protocol was the following. Approximately 1.5 kg of dried *Salix alba* (L.) barks were ground in small batches of circa 50 g with the Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch France), operating by impact and shearing effects. Grinding rotational speed was fixed at 12,000 rpm. Grinding was performed at ambient temperature (approximately 20 °C) using a 1 mm sieve with trapezoid holes.

2.4. Plant powder sieving

Batches of approximately 100 g of ground plants were sieved at 0.5 mm vibration amplitude for 10 min with the Analysette 3 Spartan apparatus (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany), operating by vertical vibration. Different granulometric classes, >500 μm, 315–500 μm, 180–315 μm, 100–180 μm, 50–100 μm, 20–50 μm, <20 μm, were obtained with the appropriate 20 mm diameter sieves (Fritsch). Almost no sieved powder was found under the 20 μm sieve, precluding the analyses of the lowest granulometric class. Powders retained on each sieve were weighted and then stored under vacuum in sealed bags at 10 °C before analysis.

2.5. Laser granulometry

Particle size distributions of *Salix alba* (L.) powders (granulometric classes and unsieved powder) were measured by laser diffraction granulometry (Mastersizer 3000, Malvern Instruments France, Orsay, France) at dry state and ambient temperature. Analyses were carried out using a 2% obscuration level, obtained by adapting the dispersion conditions to sample flowability:

- 50% air pressure, 50% feed rate, 2 mm hopper length for the whole unground plant, as well as >500 μm, 315–500 μm, 180–315 μm, and 100–180 μm granulometric classes;
- 100% air pressure, 100% feed rate, 4 mm hopper length for 50–100 μm and 20–50 μm granulometric classes.

The equivalent spherical diameter was chosen as particle size estimator. Particle size distributions were characterized by the particle mean diameter (D_{50}, where D_X means that X% of the volume of particles has a diameter inferior to D_X) and the span, a common parameter related to the width of particle size distribution, defined in Eq. (1):

$$\text{span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}. \quad (1)$$

2.6. Powder composition

Analyses of powder composition (moisture, lipids, proteins, minerals, carbohydrates) were performed for all granulometric classes except <20 μm, as well as for the unground plant. Water content was measured by weight loss after drying 2 g of powder at 105 °C for 5 h [43]. Total protein content was determined by the Kjeldahl method for quantification of nitrogen, using a conversion factor of 6.25 that is suitable for plants [40]. Fat content was quantified by Folch method [30] using 3 g of sample. Mineral content was determined by putting 2 g of powder at 500 °C for 5 h until formation of white ashes [42]. Carbohydrate content was obtained by difference between 100% and the contents in other components; its standard error was deduced from the standard errors of other components by propagation of uncertainties.

2.7. Preparation of extracts

Extraction of polyphenols from *Salix alba* (L.) bark were carried out according the method of Muanda [31] with some modifications. 2 g of powder of dry bark were macerated during 24 h under stirring at 300 rpm in 20 mL methanol–water (70–30% (v/v)). Then, the methanol–water extract was centrifuged at 6000 rpm for 20 min, the supernatant layer was filtered, brought to 15 mL by adding methanol–water 70–30% (v/v), and stored at 4 °C until analysis in a sealed dark brown vials.

2.8. UV–visible analyses

UV–visible spectrophotometric analyses were carried out with an UV–visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, California, USA).

2.8.1. Determination of the total phenolic content

Total phenolic content (TPC) were measured with the method used by F. Muanda et al. [31]. 40 μL of samples were added to test tubes containing 3.16 mL of distilled water followed by addition of 200 μL Folin-Ciocalteu reagent (1 N) and 600 μL sodium carbonate (Na_2CO_3, 20%). Samples and blank were thoroughly mixed and vortexed. After 40 min incubation at room temperature, the absorbance was measured at 725 nm. For calibration curves, diluted solutions of gallic acid (at 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 mg/mL) were used and total phenolic content was expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid per gram of dry matter (GAE/g DM). All experiments were triplicated.

2.8.2. Antioxidant activity

2.8.2.1. ABTS tests. The method described by F. Muanda et al. [32] was used in this study. The ABTS radical anion solution was prepared by dissolving AAPH and ABTS at 1 and 2.5 mM, respectively, in phosphate buffer saline (PBS) solution (100 mM, pH 7.4) containing 150 mM NaCl. After incubation in a water bath at 68 °C for 20 min, the resulting ABTS solution was diluted with methanol to obtain a blue-green coloration with an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm, then 2.94 mL of ABTS radical anion solution (buffer) was added. The decrease in absorbance was measured at 734 nm. The radical stock solution was daily prepared and all tests were triplicated. The ABTS radical scavenging activity was expressed in terms of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), which refers to the smallest concentration of antioxidants required to scavenge 50% of the ABTS radical.

2.8.2.2. DPPH tests. The DPPH radical scavenging activity was evaluated according to the method described by Sharififar, Dehghn-Nudeh, and Mirtajaldini [33]. 1 mL of 100 μM DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL plant extract. The reaction mixture was incubated in the dark for 20 min and the optical density was recorded at 517 nm against the blank. For the control, 1 mL DPPH solution in methanol was mixed with 1 mL methanol and optical density of solution was recorded after 20 min. The DPPH radical scavenging activity was expressed in terms of IC_{50}.

2.8.3. In vitro AchE activity assay

Inhibitory effect of hydroalcoholic extracts of *Salix alba* (L.) bark was studied in vitro by incubating various concentrations of plant extract with AChE and assessing their activities by Ellman's colorimetric method. AChE inhibitory assays, with kinetics analysis, was conducted according to the protocol described by Kiendrebeogo [34] with some modifications. 650 μL Tris–HCl buffer (50 mM, pH 8) were added to 50 μL extract and 5 μL AChE (0.26 U/mL). The mixture was incubated at room temperature for 15 min before the addition of 250 μL DTNB (3 mM) and 75 μL substrate (ATCI at 15 mM). The developing yellow color was measured after a new incubation period of 10 min at 405 nm with a spectrophotometer. Galantamine, a reference compound employed in Alzheimer's disease cure, was used as positive control at final concentrations of 5, 10, 20, 30, and 40 μg/mL in the assay mixture. The activity of AChE inhibition was expressed as inhibition percentage of AChE, calculated as $(1 - B / A) \times 100$, where A is the change in absorbance of the assay without the plant extract and B is the change in absorbance of the assay in the presence of the plant extract. The sample concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was calculated from the plot representing the evolution of the inhibition percentage with sample concentration.

2.9. LC-ESI/MS analyses

LC-ESI/MS analyses were performed on a LC-MS 2020 system (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled with an electrospray ionization source (ESI). Separation was performed on a Gemini 3 μm C18 130 Å reversed phase column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) of 150 mm length and 4.6 mm i.d.

2.9.1. Analytical conditions

The column oven was fixed at 30 °C. The mobile phase consisted in a mixture of (A) 0.5% formic acid in water and (B) acetonitrile. The injection volume was 20 μL and the flow rate 0.6 mL/min. The employed 25 min gradient was as follows: 0–15.5 min from 95:05 to 45:55 (A:B); 15.5–16 min from 45:55 to 10:90 (linear elution); 16–20.5 min held at 10:90; 20.5–21 min from 10:90 to 95:05 (linear elution); 21–

Table 1
Sieved masses, mass fractions, mean particle size, and span of particle size distribution of granulometric classes and unsieved powder of *Salix alba* (L.) bark.

Granulometric classes	Sieved mass (g)	Sieved mass fractions (%)	Mean particle size D_{50} (μm)	Span (−)
<20 μm	4	0.30%	n.d.	n.d.
20–50 μm	112	7.20%	29 ± 0	2.0 ± 0.0
50–100 μm	150	9.70%	81 ± 1	2.3 ± 0.0
100–180 μm	164	10.70%	187 ± 3	1.8 ± 0.0
180–315 μm	100	6.50%	323 ± 2	1.6 ± 0.0
315–500 μm	70	4.50%	523 ± 5	2.0 ± 0.1
>500 μm	940	61.00%	714 ± 15	1.9 ± 0.0
Unsieved powder (total)	1540	100%	451 ± 1	3.7 ± 0.1

n.d.: not determined.

Table 2
Chemical composition (moisture, lipids, proteins, ashes, carbohydrates) on wet basis of all granulometric classes (except the <20 μm one) of *Salix alba* (L.) bark and the whole unground plant.

Sample	Unground plant	20–50 μm	50–100 μm	100–180 μm	180–315 μm	315–500 μm	>500 μm
Moisture (% (w/w))	9.83 ± 0.08^{a}	8.86 ± 0.43^{c}	9.46 ± 0.19^{b}	8.71 ± 0.36^{c}	8.13 ± 0.25^{d}	8.25 ± 0.37^{d}	7.80 ± 0.27^{d}
Lipids (% (w/w))	4.27 ± 0.54^{d}	12.86 ± 1.20^{a}	6.52 ± 0.83^{b}	7.56 ± 0.65^{b}	7.70 ± 0.76^{b}	5.44 ± 0.49^{c}	5.52 ± 0.80^{c}
Proteins (% (w/w))	6.90 ± 0.21^{e}	13.99 ± 1.42^{c}	15.51 ± 0.74^{b}	17.52 ± 0.94^{a}	11.33 ± 0.25^{d}	12.35 ± 0.72^{c}	5.80 ± 1.01^{f}
Ashes (% (w/w))	7.19 ± 0.06^{c}	13.57 ± 0.11^{a}	6.51 ± 0.15^{d}	6.99 ± 0.29^{c}	7.05 ± 0.24^{c}	7.59 ± 0.29^{b}	7.14 ± 0.15^{c}
Carbohydrates (% (w/w))	71.81 ± 0.89^{b}	50.72 ± 3.16^{e}	62.00 ± 1.91^{d}	59.22 ± 2.24^{d}	65.79 ± 1.50^{c}	65.54 ± 1.87^{c}	76.47 ± 2.23^{a}

Presented data are mean ± standard deviation of triplicate measures; mean values in the same line followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

25 min held at 95:05 (re-equilibration step). Compounds were quantified with the external calibration method. Before analysis, extracts were filtrated and diluted ten times. Data were expressed in milligrams of standard per gram of dry matter. The ESI source was operated in negative mode. The nebulization gas flow was set at 1.5 L/min, drying gas flow at 20 L/min, the heat block temperature was fixed at 350 °C, and the desolvation line (DL) temperature at 250 °C. The probe voltage was set at −4500 V.

2.9.2. Calibration method

For the determination of calibration curves, standard compounds of salicin, chlorogenic acid, gallocatechin, procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin C1, and catechin were prepared in 70/30 (v/v) methanol/water. Quantification of standards was performed using the Selected Ion Monitoring (SIM) mode. The method sensitivity and linearity were assessed by determining the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), defined as the concentrations leading to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively. The determination of LOD and LOQ values was achieved with standards in the following concentration ranges: salicin (0.03–1 mg/mL); catechin (0.05–1 mg/mL); chlorogenic acid (0.01–0.1 mg/mL); gallocatechin (0.01–1 mg/ml); procyanidin B1 (0.01–1 mg/mL); procyanidin B2 (0.01–1 mg/mL); procyanidin B3 (0.01–1 mg/mL). The SIM mode was used in order to improve detection sensitivity in comparison with the full scan mode.

2.10. Statistical analyses

For all experiments, the average value and standard deviation from three replicates were calculated. Statistical analysis (ANOVA) was conducted using SAS statistical software (SAS Institute, NC) with $p < 0.05$ as significance level.

3. Results and discussion

3.1. Granulometry and particle size distributions

Laser granulometry was carried out on ground and sieved *Salix alba* (L.) bark powders in order to check if the employed grinding/sieving procedure was efficient in producing powders fraction having well-different particle size (Table 1). It can be seen in Table 1 that enough powder for further analyses were obtained in all granulometric classes, except for the smallest one (<20 μm). All studied powder samples presented monomodal particle size distributions, with their mean particle size comprised in (lower granulometric classes) or slightly above (upper granulometric classes) the particle size range, as well as span values around 2, which confirmed the correct running of the sieving process. The fact that the mean particle size was slightly outside the granulometric class ranges for 315–500 μm and >500 μm fractions can be explained by the expected non-sphericity of large particles, as ground fibers generally lead to large rod-shaped particles.

3.2. Chemical composition

Table 2 displays the analytical results for moisture, lipid, protein, ash, and carbohydrate contents for all granulometric classes except the <20 μm one, as well as for the whole unground plant. It can be seen in Table 2 that the successive grinding/sieving procedure had a great influence on the chemical composition of studied samples. On one hand, the chemical composition significantly differed between whole unground plant and powder samples: the moisture contents were lower for powder samples than for the unground plant, owing to the temperature increase induced by the grinding process. This mostly resulted in greater dry extracts in powder samples, i.e. higher contents in proteins, lipids, ashes, and carbohydrates, which may contribute to increase the content

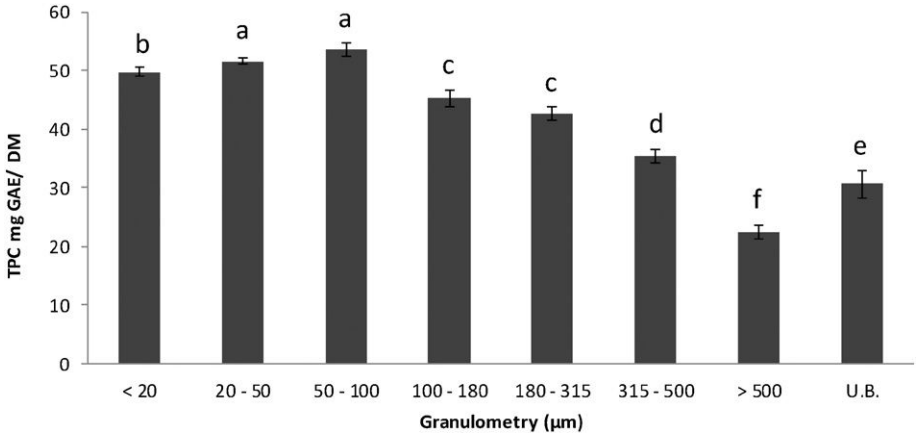


Fig. 1. Total phenolic content of *Salix alba* (L.) bark powders; DM: dry matter; GAE: gallic acid equivalent; U.B.: unground *Salix alba* (L.) bark. Bars topped by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

Table 3
Radical scavenging assays (IC50) for the different granulometric classes and unground plant parts of *Salix alba* (L.) bark DM: dry matter; U.B.: unground *Salix alba* (L.) bark. Means ± standard errors in the same column followed by different letters corresponded to statistically different results ($p < 0.05$).

	DPPH test	ABTS test
Granulometric class	IC_{50} (μg/mL)	IC_{50} (μg/mL)
<20 μm	59.47 ± 0.03^{a}	47.37 ± 0.02^{a}
20–50 μm	58.54 ± 0.02^{b}	46.91 ± 0.06^{b}
50–100 μm	60.12 ± 0.04^{c}	48.44 ± 0.06^{c}
100–180 μm	61.10 ± 0.05^{d}	49.24 ± 0.04^{d}
180–315 μm	61.36 ± 0.02^{e}	49.85 ± 0.07^{e}
315–500 μm	61.76 ± 0.08^{f}	50.17 ± 0.08^{f}
>500 μm	65.92 ± 0.02^{g}	53.36 ± 0.04^{g}
U.B.	61.43 ± 0.08^{e}	49.14 ± 0.07^{d}

Presented data are mean ± standard deviation of triplicate measures; mean values in the same column followed by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

in bioactive molecules in powder samples. On the other hand, the chemical composition depended also on powder granulometry. As fibers are presumably more difficult to grind, their concentration in higher size fractions by the successive grinding/sieving procedure was expected. This leads to higher contents in proteins and lipids in the lowest granulometric classes and may be an indication of higher contents in bioactive molecules, as the latter are often associated with proteins or lipids in plant tissues.

3.3. Total phenolic content

The Folin-Ciocalteu test was used to evaluate TPC of the different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders (Fig. 1). The evolution of TPC with powder granulometry was bell-shaped, with maximal values found in the 50–100 μm and 100–180 μm fractions (respectively, 53.6 and 45.3 mg GAE/g DM). These values were two times higher than that of the >500 μm granulometric class (22.3 mg GAE/g DM). This can be explained by the higher content in carbohydrates (fibers) of larger particles, decreasing the bioactive molecule content of powders of higher granulometry, but also by the temperature increase induced by grinding, which is more pronounced for the smaller particles, leading to a small decrease in TPC for <20 μm and 20–50 μm samples. Last, Fig. 1 confirmed the efficiency of the successive grinding/sieving procedure in enhancing the polyphenol content in powder samples, as the unground plant exhibited one of the lowest TPC, excepted for the >500 μm fraction.

3.4. In vitro antioxidant activity

DPPH is an extensively used method for screening antioxidants. Gomathi and Manian [21] reported that hydroalcoholic extracts from stems, barks, and leaves of *Scolopia crenata* contain high amounts of bioactive compounds and effectively in vitro scavenged DPPH and ABTS. As shown in Table 3, all extracts of *Salix alba* (L.) bark were able to scavenge DPPH radicals, and IC_{50} decreased with the particle size until the 20–50 μm fraction (DPPH: 58.54 μg/mL; ABTS: 46.91 μg/mL). The lowest antioxidant activity was recorded for the >500 μm fraction (DPPH: 65.92 μg/mL; ABTS: 53.36 μg/mL). This confirms the hypothesis of Baudelaire [23] regarding the suitability of a successive grinding/sieving procedure to separate bioactive compounds initially located in different plant parts. Materials which are difficult to grind (i.e. hard or fibrous materials) are expected to be concentrated in large particles, and bioactive molecules, often bound to proteins or lipids, may preferentially be found in small particles. Besides, ABTS and DPPH tests showed similar variations, as confirmed by Pearson's correlation coefficients: 0.87 for IC_{50} values, indicating positive correlations of strong intensity.

3.5. AChE inhibition activity of Salix alba (L.) extracts

AChE inhibitory activity of extracts of granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark, expressed as IC_{50} values, are presented in Fig. 2. All samples presented significant inhibitory activities towards AChE. IC_{50} values were found to depend on powder granulometry: AChE inhibition activity increases when particle size decreases until 100–180 μm and then reaches a maximum for lower granulometric classes, consistently with the above-mentioned decrease in carbohydrates, especially fibers, and increases in proteins and lipids for smaller particles. The maximal AChE inhibitory activity of *Salix alba* (L.) extracts was obtained for the 20–50 μm granulometric class ($IC_{50} = 0.59$ μg/mL), while unground plant parts gave the lowest anti-AChE activity ($IC_{50} = 1.52$ μg/mL). Even if the reference control, galantamine, showed a strongest inhibition of AChE ($IC_{50} = 0.34$ μg/mL), it remains a synthetic drug as opposed to *Salix alba* (L.) extracts that are obtained from natural plant powders. In this paper, the maximal IC_{50} value of hydroalcoholic extracts is very significant, in comparison with the best values obtained for *Scolopia crenata* bark, $IC_{50} = 9.20$ μg/mL [21] and *Viburnum lantana* extract, IC_{50} value = 50 μg/mL [35]. Showing the potential of *Salix alba* (L.)

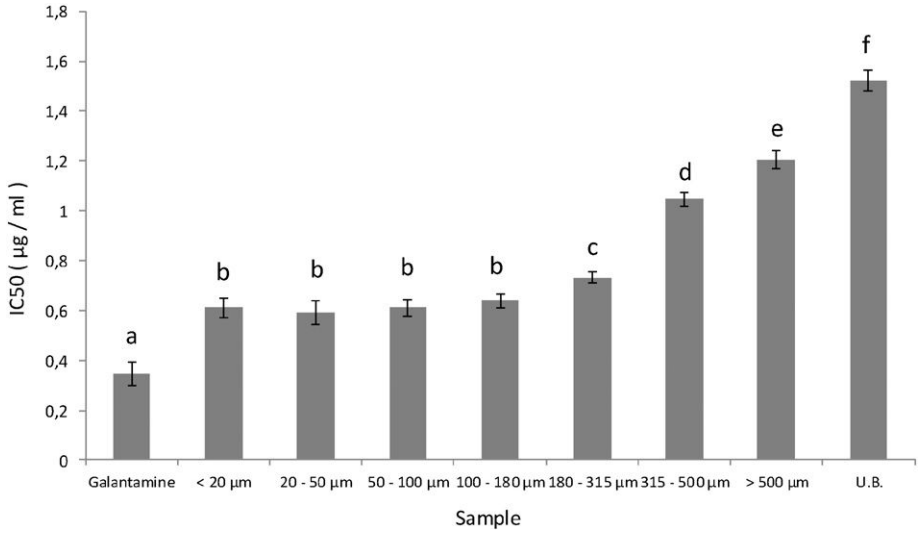


Fig. 2. Anti-AChE assays (IC50) of the different granulometric classes and unground sample of *Salix alba* (L.) bark and galantamine. U.B.: unground *Salix alba* (L.) bark. Bars topped by different letters were statistically different ($p < 0.05$).

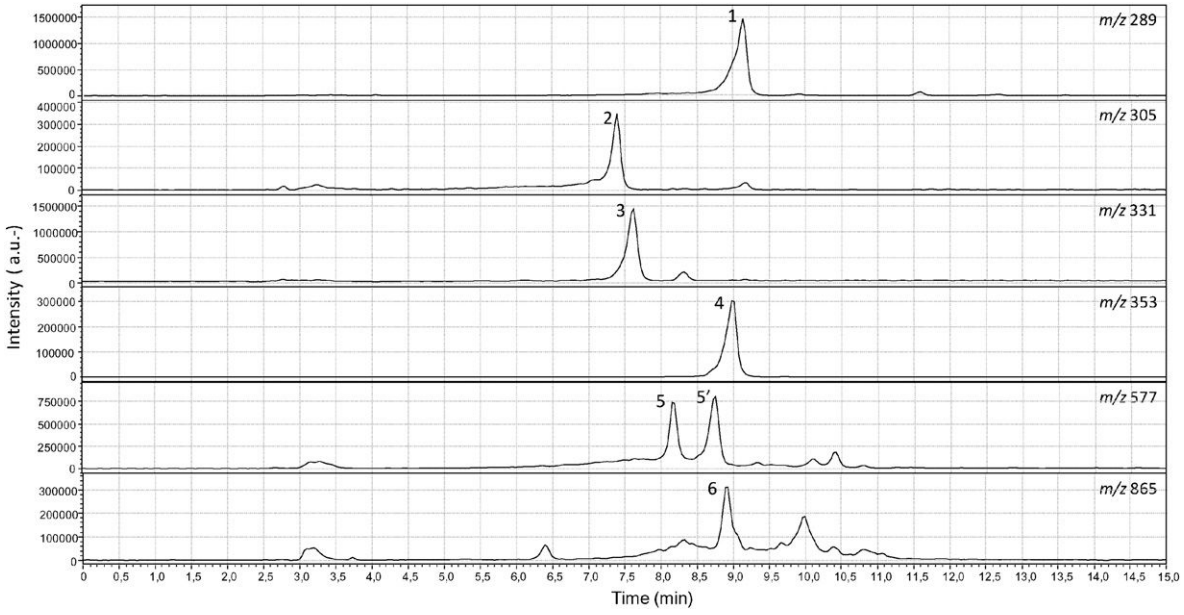


Fig. 3. Extracted-ion chromatograms from a LC-ESI/MS analysis of hydroalcoholic extracts from *Salix alba* (L.) bark powders. Peak assignments were confirmed by retention times and *m/z* ratios, as deduced from standard compounds, (+)-catechin (1); (−)-gallocatechin (2); salicin (3); chlorogenic acid (4); procyanidin B2 (5); procyanidin B1 (5′); procyanidin C1 (6).

bark powder extracts in constituting a possible natural medicine for the treatment of neurological effects of Alzheimer's disease.

3.6. LC-ESI/MS analyses

3.6.1. Identification of bioactive compounds in Salix alba (L.) bark powders

The main bioactive compounds in *Salix alba* (L.) *bark powders* were identified and quantified by LC-ESI/MS. LC-ESI/MS analyses of standard compounds allow determining the retention times and *m/z* ratios of compounds. Extracted-ion chromatograms of identified compounds are displayed in Fig. 3. Table 4 presents retention times and *m/z* ratios of these molecules. Two catechins were detected in extracts, namely (+)-catechin (*m/z* 289) and (−)-gallocatechin (*m/z* 305) identified at 9.18 and 7.26 min retention times, respectively. The presence of three condensed tannins was also confirmed. Procyanidin B1 ((−)-epicatechin-(4β → 8)-(+)-catechin), procyanidin B2 ((−)-epicatechin-(4β → 8)-(−)-epicatechin) and procyanidin C1 ((−)-epicatechin-(4β-8)-(−)-epicatechin-(4β-8)-(−)-epicatechin) were identified at 8.76 and 8.20, and 8.92 min retention times, respectively. Another signal recorded at *m/z* 865 (t_R = 9.97 min) close to this of procyanidin C1 could be attributed as an isomer. This behavior is similar as this observed for procyanidin B1 and procyanidin B2. However, the lack of standard compound of other procyanidin C isomers commercially available could not allow us to confirm this assumption. Salicin was detected in *Salix alba* (L.) extract as for other *Salix* varieties [36]. However, this compound was not detected in the deprotonated form (*m/z* 285) but in a formate adduct form (*m/z* 331), similarly to Blazics, Papp, and Kéry [37], who operated in close experimental conditions (water acidified with 0.5% formic acid in water/acetonitrile solution).

Table 4
Retention times, *m/z* ratios, coefficients of determination (R^2), LOD and LOQ values.

Compound	*m/z*	Retention time (min)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Coefficient of determination (R^2)
(+)-Catechin	289	9.18	3.4	11.2	0.998
(−)-Gallocatechin	305	7.26	3.9	12.1	0.995
Salicin[a]	331	7.53	0.3	1.1	0.999
Chlorogenic acid	353	8.91	2.2	7.3	0.989
Procyanidin B2	577	8.20	3.5	10.6	0.991
Procyanidin B1	577	8.76	3.4	10.5	0.990
Procyanidin C1	865	8.92	4.1	12.4	0.982

[a] Detected under the form of formate adduct.

3.6.2. Quantification of active compounds

Coefficients of determination (R^2) for the calibration curves obtained with the external method are displayed in Table 4. These calibration curves were used to quantify catechin, gallocatechin, chlorogenic acid, procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin C1, and salicin in bark powder extracts. Fig. 4 exhibits their contents calculated for all granulometric classes, as well as for unground plant parts. The highest content was determined for procyanidin B1 with 5.9 mg/g DM for the 50–100 μm particle sizes. Procyanidin B2 and procyanidin C1 contents were also noteworthy with 3.4 and 1.8 mg/g DM, respectively, for the 50–100 μm fraction. Catechin content in powder extracts were higher (about three times) than gallocatechin content. Chlorogenic acid exhibited the lowest content of all the compounds quantified. The influence of the granulometric class on catechin, gallocatechin, procyanidins and chlorogenic acid contents was similar: maximum contents were found for granulometric fractions between 20 and 180 μm and the lowest content for the >500 μm fraction, similarly with TPC results. Contents in catechin, gallocatechin, procyanidins, and chlorogenic acid were consistent with the trends observed for the antioxidant activity (Table 3). Indeed, significant positive correlations between these six compound contents and antioxidant activity were evidenced by Pearson's coefficients, calculated for DPPH IC_{50} values and bioactive compound contents: −0.68 for catechin, −0.62 for gallocatechin, −0.62 for procyanidin B1, −0.60 for procyanidin B2, −0.64 for procyanidin C1, and −0.59 for chlorogenic acid. A slight different trend was evidenced for salicin which is not a polyphenol: its highest content was obtained for the smallest granulometry (1.85 mg/g DM for the <20 μm fraction), nevertheless its content was also well correlated to antioxidant activity (Pearson's coefficient of −0.65 with DPPH IC_{50} values). Contents in bioactive compounds of unground *Salix alba* (L.) bark were lower than the maximal value obtained for a specific granulometric class, in accordance with previous results. For all investigated bioactive compounds, it was confirmed that the successive grinding/sieving procedure allowed to concentrate bioactive compounds in powders of a particular size range, improving the extraction efficiency in comparison with unground plant parts. The total ion chromatogram (TIC) values showed the same trend as for quantified compounds (see Fig. 4). The highest TICs were

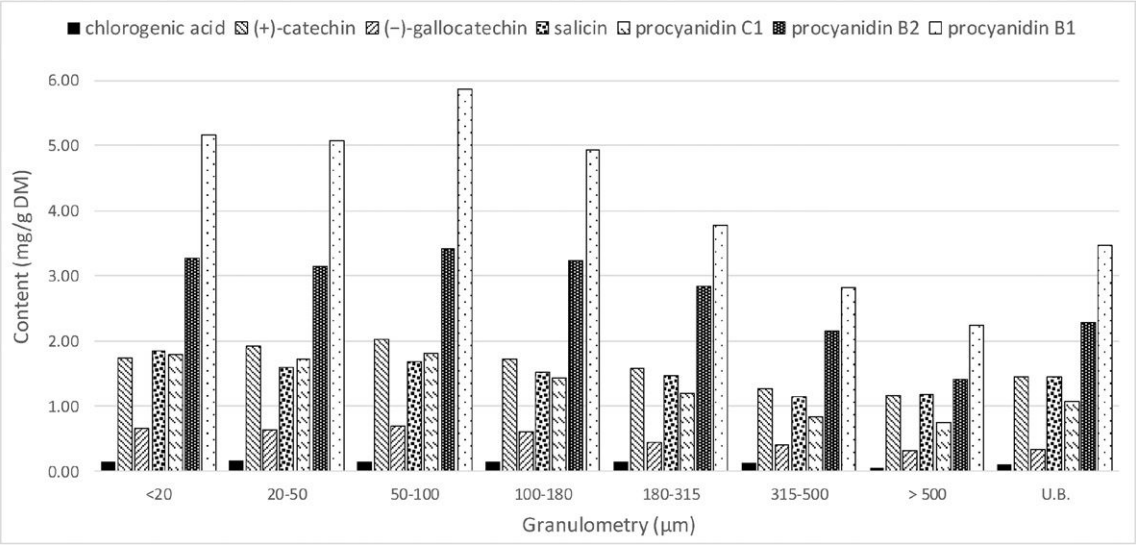


Fig. 4. LC-ESI/MS quantification of chlorogenic acid (*m/z* 353), (+)-catechin (*m/z* 289), (−)-gallocatechin (*m/z* 305) salicin (*m/z* 331), procyanidin C1 (*m/z* 577), procyanidin B2 (*m/z* 577), and procyanidin B1 (*m/z* 577) in *Salix alba* (L.) bark powders. U.B.: unground *Salix alba* (L.) bark.

recorded between 20 and 180 µm with a maximum reached for the 50–100 µm fraction (899,226,463 a.u.), whereas the minimum TIC was recorded for particle size > 500 µm (537,216,287 a.u.). This behavior suggests that contents in the different constituents are similarly affected by granulometric class size. This induces that the extraction process may not significantly affect content in minor constituents.

3.7. Bioactivity correlation

A marked correlation was observed between antioxidant activity and polyphenol content (Pearson's coefficients of −0.73 between TPC and DPPH IC_{50} values, and −0.72 between TPC and ABTS IC_{50} values), meaning that antioxidant activity could mainly be attributed to polyphenols as described by Wafa et al. [38]. Moreover, a strong correlation has also been noticed between anti-AChE activity and TPC (Pearson's coefficient of −0.77 between TPC and anti-AChE IC_{50} values, showing a strong negative correlation: the more polyphenols in the powder, the lower is the anti-AChE IC_{50}, and the higher the anti-AChE activity). The latter information allows to link the presence of salicin and polyphenols to anti-AChE activity. This was confirmed by the good correlations obtained between anti-AChE IC_{50} values and bioactive compound contents (Pearson's coefficients of −0.74 for salicin, −0.64 for catechin, −0.76 gallocatechin, −0.68 for procyanidin B1, −0.65 for procyanidin B2, −0.72 for procyanidin C1, and −0.60 for chlorogenic acid), confirming the role of the identified bioactive compounds in anti-AChE activity of investigated powders. Erdogan-Orhan et al. [35] reported that salicin and *Viburnum lantana* methanol extracts (containing salicin) inhibited the AChE. A salicin derivative, the salicylate, irreversibly inhibits the enzymatic activities via its catalytic site by interaction with serine [39]. It is known that the catalytic site of AChE has also a serine and it could be salicin inhibiting enzyme action by a link with serine. Finally, these correlations show that there could be a synergistic effect between salicin and polyphenols for the inhibition of AChE.

4. Conclusion

Powder fractions of *Salix alba* (L.) bark extracts exhibited antioxidant and AChE inhibition abilities. These effects could derive from a synergy between salicin and other active compounds like polyphenols. Results revealed that the AChE inhibition of *Salix alba* (L.) extracts was close to the galantamine action. Moreover, the combination of grinding and sieving processes was successful to generate granulometric classes significantly differing in bioactive compound contents, and thus in antioxidant and anti-AChE activities. Indeed, it was shown that these biological activities were correlated to the presence of bioactive compounds, mainly catechin, gallocatechin, procyanidins, chlorogenic acid, and salicin. This reveals that these powder extracts could constitute an alternative way to treat Alzheimer's disease. Finally, this study also that bioactive compounds were concentrated in *Salix alba* (L.) bark powders by grinding, sieving, and selection of the adequate granulometric class.

Acknowledgments

The authors thank Extrapole and the Lorraine region (DPR-NT 2013-10668) for financial support, Dr. Florentin Michaux (LIBio) for his expertise regarding the choice of dispersion conditions of laser diffraction analysis, as well as Carole Perroud (LIBio) for her contribution to powder production and Carole Jeandel and Carole Perroud (LIBio) for their help regarding the determination of powder chemical composition.

References

[1] M.C. Braithwaite, C. Tyagi, L.K. Tomar, P. Kumar, Y.E. Choonara, V. Pillay, Nutraceutical-based therapeutics and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: an overview, J. Funct. Foods 6 (2014) 82–99, http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.022.
[2] M. Materska, Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.), J. Funct. Foods 7 (2014) 269–277, http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.002.
[3] S.M. Rates, Plants as source of drugs, Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinol. 39 (2001) 603–613.
[4] B. Schmid, R. Lüdtke, H.-K. Selbmann, I. Kötter, B. Tschirdewahn, W. Schaffner, et al., Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial, Phytother. Res. 15 (2001) 344–350, http://dx.doi.org/10.1002/ptr.981.
[5] A. Durak, U. Gawlik-Dziki, The study of interactions between active compounds of coffee and willow (*Salix* sp.) bark water extract, Biomed. Res. Int. 2014 (2014) e386953, http://dx.doi.org/10.1155/2014/386953.
[6] A.R. Collins, Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay, Mutat. Res. 681 (2009) 24–32, http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.002.
[7] M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, Food Chem. 73 (2001) 239–244, http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1.
[8] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39 (2007) 44–84, http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001.

[9] K. Ingkaninan, P. Temkitthawon, K. Chuenchom, T. Yuyaem, W. Thongnoi, Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies, J. Ethnopharmacol. 89 (2003) 261–264, http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.008.
[10] J.A. Ansari, A. Siraj, N.N. Inamdar, Pharmacotherapeutic approaches of Parkinson's disease, Int. J. Pharmacol. 6 (2010) 584–590, http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2010.584.590.
[11] B. Frank, S. Gupta, A review of antioxidants and Alzheimer's disease, Ann. Clin. Psychiatr. Off. J. Am. Acad. Clin. Psychiatr. 17 (2005) 269–286, http://dx.doi.org/10.1080/10401230500296428.
[12] L.M. Bierer, V. Haroutunian, S. Gabriel, P.J. Knott, L.S. Carlin, D.P. Purohit, et al., Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits, J. Neurochem. 64 (1995) 749–760, http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64020749.x.
[13] P.K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P.J. Houghton, Acetylcholinesterase inhibitors from plants, Phytomedicine 14 (2007) 289–300, http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002.
[14] G.M. Bores, F.P. Huger, W. Petko, A.E. Mutlib, F. Camacho, D.K. Rush, et al., Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277 (1996) 728–738.
[15] M. Ejaz Ahmed, M.M. Khan, H. Javed, K. Vaibhav, A. Khan, R. Tabassum, et al., Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type, Neurochem. Int. 62 (2013) 492–501, http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.006.
[16] N. Suganthy, K. Pandima Devi, In vitro antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Rhizophora mucronata*, Pharm. Biol. 1–12 (2015) http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1017886.
[17] S.-H. Kwon, H.-K. Lee, J.-A. Kim, S.-I. Hong, H.-C. Kim, T.-H. Jo, et al., Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice, Eur. J. Pharmacol. 649 (2010) 210–217, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001.
[18] N. Ouattara, R.N.-T. Meda, A. Hilou, S. Guenné, K. Konaté, A.Y. Coulibaly, et al., Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities and HPLC–MS analysis of polyphenol from extracts of *Nelsonia canescens* (Lam.) Spreng. Asian Pac. J. Trop. Dis. 3 (2013) 382–388, http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60088-2.
[19] A.P. Murray, M.B. Faraoni, M.J. Castro, N.P. Alza, V. Cavallaro, Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy, Curr. Neuropharmacol. 11 (2013) 388–413, http://dx.doi.org/10.2174/1570159X11311040004.
[20] E.K. Perry, V. Haroutunian, K.L. Davis, R. Levy, P. Lantos, S. Eagger, et al., Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease, Neuroreport 5 (1994) 747–749.
[21] R. Gomathi, S. Manian, Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): an endemic medicinal plant of India, Ind. Crop. Prod. 73 (2015) 134–143, http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.090.
[22] I.E. Orhan, O. Ustün, B. Sener, Estimation of cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the leaf extracts of Anatolian *Ficus carica* var. *domestica* and their total phenol and flavonoid contents, Nat. Prod. Commun. 6 (2011) 375–378.
[23] E. Baudelaire, Procede PTC pour l'extraction par voie seche des principes actifs naturels, http://www.google.com/patents/WO2013057379A12013.
[24] X. Zhao, H. Zhu, G. Zhang, W. Tang, Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders, Powder Technol. 286 (2015) 838–844, http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2015.09.025.
[25] C.T. Murthy, M. Rani, P.N.S. Rao, Optimal grinding characteristics of black pepper for essential oil yield, J. Food Process Eng. 22 (1999) 161–173 (doi: 10.1111/j.1745-4530.1999.tb00478.x.).
[26] J. Hu, Y. Chen, D. Ni, Effect of superfine grinding on quality and antioxidant property of fine green tea powders, LWT Food Sci. Technol. 45 (2012) 8–12, http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.002.
[27] C. Maaroufi, J.-P. Melcion, F. de Monredon, B. Giboulot, D. Guibert, M.-P. Le Guen, Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. I. Physical and chemical characteristics of pea seed fractions, Anim. Feed Sci. Technol. 85 (2000) 61–78, http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00127-9.
[28] K.K. Singh, T.K. Goswami, Studies on cryogenic grinding of cumin seed, J. Food Process Eng. 22 (1999) 175–190, http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.1999.tb00479.x.
[29] C.A. Pesek, L.A. Wilson, E.G. Hammond, Spice quality: effect of cryogenic and ambient grinding on volatiles, J. Food Sci. 50 (1985) 599–601, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13753.x.
[30] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497–509.
[31] F. Muanda, D. Koné, A. Dicko, R. Soulimani, C. Younos, Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011 (2011) 1–8, http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep109.
[32] F.N. Muanda, J. Bouayed, A. Djilani, C. Yao, R. Soulimani, A. Dicko, Chemical composition and, cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011 (2010), e620862 http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/620862/abs/ (accessed November 26, 2014).
[33] F. Sharififar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini, Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chem. 112 (2009) 885–888 http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608007747 (accessed December 9, 2014).
[34] M. Kiendrebeogo, A.Y. Coulibaly, R.C.H. Nebie, B. Zeba, C.E. Lamien, A. Lamien-Meda, et al., Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso, Rev. Bras. Farmacogn. 21 (2011) 63–69, http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000008.
[35] I. Erdogan-Orhan, M.L. Altun, B. Sever-Yilmaz, G. Saltan, Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents, J. Med. Food 14 (2011) 434–440, http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2010.0053.
[36] A. Durak, U. Gawlik-Dziki, D. Sugier, Coffee enriched with willow (*Salix purpurea* and *Salix myrsinifolia*) bark preparation — interactions of antioxidative phytochemicals in a model system, J. Funct. Foods 18 (2015) 1106–1116, http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.012 (Part B).
[37] B. Blazics, I. Papp, Á. Kéry, LC–MS qualitative analysis and simultaneous determination of six *Filipendula* salicylates with two standards, Chromatographia 71 (2010) 61–67, http://dx.doi.org/10.1365/s10337-010-1502-4.
[38] G. Wafa, D. Amadou, K.M. Larbi, E.F.O. Héla, Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. Ind. Crop. Prod. 56 (2014) 43–51, http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.036.
[39] H.W. Choi, M. Tian, M. Manohar, M.M. Harraz, S.-W. Park, F.C. Schroeder, et al., Human GAPDH is a target of aspirin's primary metabolite salicylic acid and its derivatives, PLoS One 10 (2015), e0143447 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143447.
[40] AACC International, Method 46-11.02. Crude Protein — Improved Kjeldahl Method, Copper Catalyst Modification. Approved Methods of Analysis, 11th ed. AACC International, St. Paul, MN, USA, 1999 (reapproved November 3, 1999).
[42] ADPI (American Dry Product Institute, Elmhurst, IL), Determination of total ash in standards for grades of dry milks including methods of analysis, Bulletin 916 (2002) 40–41.
[43] AFNOR (Agence Française de NORmalisation), Détermination de la teneur en eau — méthode par étuvage, 1976 (No: V04 – 348).