



VALORISATION DE SOUS-PRODUIT DE LA PRODUCTION DE D'HUILES ESSENTIELLES DANS LES DOMAINES PHARMACEUTIQUES ET/OU AGROALIMENTAIRE

DEVELOPMENT OF BY-PRODUCTS FROM THE PRODUCTION OF ESSENTIAL OILS IN THE PHARMACEUTICAL AND / OR FOOD INDUSTRY

Établissement **Université Toulouse III - Paul Sabatier**

École doctorale **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche **LGC - Laboratoire de Génie Chimique**

Encadrement de la thèse Jalloul BOUJILA

Financement du 01-10-2020 au 30-09-2023 *origine* **Financement du fonctionnement par une entreprise**

Concours pour un contrat doctoral

Nous sommes en contact avec des petites entreprises intéressées par le sujet et disponible pour financer les besoins du fonctionnement du projet.

Début de la thèse le **1 octobre 2020**

Date limite de candidature **10 juin 2020**

Mots clés - Keywords

chimie analytique, activités biologiques, screening, procédé d'extraction, fractionnement bioguidé, identification structurale

Analytical chemistry, biological activities, screening, extraction process, bioguided fractionation, structural identification

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

Le travail comprend des étapes d'extraction secondaire des métabolites, l'évaluation des activités pharmaceutiques in vitro, le fractionnement des bioguides et l'identification structurale. La partie identification structurelle sera basée sur LC-MS, GC-MS et / ou fractionnement (HPLC Prep, Flash chromatography ...). La spectrométrie de masse haute résolution peut être utilisée pour les composés traces. Les molécules isolées seront identifiées par RMN 2D, HRMS et IRTF.

Le candidat doit avoir de bonnes compétences en chimie analytique (RMN, IRTF, LC-MS et GC-MS) et surtout l'interprétation des spectres de masse (basse et haute résolution).

The work involves secondary metabolite extraction steps, evaluation of in vitro pharmaceutical activities, bioguide fractionation and structural identification. The structural identification part will be based on LC-MS, GC-MS and / or fractionation (HPLC Prep, Flash chromatography...). High-resolution mass spectrometry can be used for trace compounds. The isolated molecules will be identified by 2D NMR, HRMS and IRTF.

The candidate must have good analytical chemistry skills (NMR, IRTF, LC-MS and GC-MS) and especially the interpretation of mass spectra (low and high resolution).

Description de la problématique de recherche - Project description

Contexte scientifique

La production des huiles essentielles se fait par entraînement à la vapeur ou par hydrodistillation, après la séparation physique de la partie non miscible à l'eau. En général, les rendements massiques de l'extraction des huiles essentielles sont entre 0.5 et 5%. Le résidu de la matière végétale (au moins 95%) est utilisé généralement comme compost.

La France produit plusieurs huiles essentielles dont la lavande et le lavandin (60% de la production européenne, Recensement Général Agricole, 2000), le cyprès, la menthe, la sauge sclarée, le romarin, le thym, la camomille, le myrte, le petit grain, le genévrier... Ces productions génèrent environ entre 100 et 10000 tonnes de sous-produits riches en substances bioactives pour chaque huile essentielle. Le département BioSyM s'intéresse à la recherche de molécules bioactives à partir de plantes et fruits pour les valoriser dans les domaines pharmaceutiques et/ou agroalimentaires (ANR Vamagphar, ANR Actiphen, CASDAR Innoraisin, région Natsubmidwine). En effet, notre démarche cible des couples matière végétale/activité biologique in vitro non étudiées dans la littérature.

• Objectif scientifique du projet

L'objectif de cette thèse est donc d'identifier des extraits et/ou des molécules ayant une activité biologique intéressante comparé à des principes actifs ou des extraits commercialisés. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude dans la littérature qui a traité ce type de

protocole de préparation d'extraits à partir de sous-produits. De plus, nous avons vérifié que les activités biologiques étudiées dans notre plateforme [1-8] ne sont pas étudiées pour les plantes sélectionnées (*Lavandula burnatii*, *Ormenis mixta*, *Mentha piperita*).

- Principales étapes prévues

Pour atteindre les objectifs fixés, les grandes étapes de la thèse seront les suivantes :

- 1- Extraction des métabolites secondaires à partir du sous-produit d'huile essentielle pour chaque plante par macération et par extraction à solvant accélérée (ASE) en utilisant des solvants organique à différentes polarités (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). Les extraits correspondants sont obtenus après évaporation à sec des solvants (sans résidu de solvant). Cette étape est nécessaire pour séparer les molécules en fonction de la polarité. Pour l'application agroalimentaire, s'il y a un extrait ou une molécule intéressante, on optimisera son extraction par la suite avec un solvant et un procédé adéquat.
- 2- Screening des activités biologiques et des familles chimiques des différents extraits. Cette étape permet de sélectionner les extraits ayant les meilleures activités.
- 3- les deux extraits les plus actifs seront produits en grande quantité et fractionnés par bioguidage pour isoler les molécules bioactives.
- 4- Identification structurale des molécules bioactives par les méthodes analytiques LC-MS, GC-MS, RMN, IRTF et analyse élémentaire.

- Moyens à mettre en œuvre, en précisant leur disponibilité

A niveau du LGC :

- Sur le site pharmacie, toutes les étapes d'extraction (macération, ASE), d'analyse chimique (lecteur de plaque, HPLC-DAD-ELSD, GC-FID/MS) et du screening biologique (lecteur de plaque), fractionnement (Flash chromatographie et HPLC préparative), IRTF.
- à l'échelle du LGC : IRTF, MEB au SAP.

Université de Toulouse :

- RMN

Scientific background

The production of essential oils is done by steam entrainment or by hydrodistillation, after the physical separation of the part immiscible with water. In general, the mass yields of the extraction of essential oils are between 0.5 and 5%. The residue of the plant material (at least 95%) is generally used as compost.

France produces several essential oils including lavender and lavandin (60% of European production, General Agricultural Census, 2000), cypress, mint, clary sage, rosemary, thyme, chamomile, myrtle, petit grain, juniper ... These productions generate approximately between 100 and 10,000 tonnes of by-products rich in bioactive substances for each essential oil.

The BioSyM department is interested in the research of bioactive molecules from plants and fruits in order to develop them in the pharmaceutical and / or agrifood fields (ANR Vamagphar, ANR Actiphen, CASDAR Innoraisin, Natsubmidwine region). Indeed, our approach targets plant matter / biological activity in vitro pairs not studied in the literature.

- Scientific objective of the project

The objective of this thesis is therefore to identify extracts and / or molecules having an interesting biological activity compared to active principles or extracts marketed. To our knowledge, there is no study in the literature which has dealt with this type of protocol for the preparation of extracts from by-products. In addition, we have verified that the biological activities studied in our platform [1-8] are not studied for the selected plants (*Lavandula burnatii*, *Ormenis mixta*, *Mentha piperita*).

- Main steps planned

To achieve the objectives set, the main stages of the thesis will be as follows:

- 1- Extraction of secondary metabolites from the essential oil by-product for each plant by maceration and by accelerated solvent extraction (ASE) using organic solvents with different polarities (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol). The corresponding extracts are obtained after evaporating the solvents to dryness (without solvent residue). This step is necessary to separate the molecules according to the polarity. For the food industry application, if there is an extract or an interesting molecule, its extraction will be optimized thereafter with a solvent and an adequate process.
- 2- Screening of biological activities and chemical families of the different extracts. This step allows you to select the extracts having the best activities.
- 3- the two most active extracts will be produced in large quantities and fractionated by bioguiding to isolate the bioactive molecules.
- 4- Structural identification of bioactive molecules by LC-MS, GC-MS, NMR, IRTF analytical methods and elementary analysis.

- Means to be implemented, specifying their availability

At the LGC level:

- On the pharmacy site, all stages of extraction (maceration, ASE), chemical analysis (plate reader, HPLC-DAD-ELSD, GC-FID / MS) and biological screening (plate reader), fractionation (Flash chromatography and preparative HPLC) , IRTF.
- at LGC level: IRTF, MEB at SAP.

University of Toulouse:

- NMR

Thématique / Domaine / Contexte

La thématique est liée à la valorisation de molécules actives provenant de déchets de plantes en proposant un procédé d'extraction et d'isolement.

Ce sujet est lié au procédé d'extraction des métabolites des plantes pour des applications dans les domaines pharmaceutiques et/ou agroalimentaires.

La production des huiles essentielles se fait par entraînement à la vapeur ou par hydrodistillation, après la séparation physique de la partie non miscible à l'eau. En général, les rendements massiques de l'extraction des huiles essentielles sont entre 0.5 et 5%. Le résidu de la matière végétale (au moins 95%) est utilisé généralement comme compost.

La France produit plusieurs huiles essentielles dont la lavande et le lavandin (60% de la production européenne, Recensement Général Agricole, 2000), le cyprès, la menthe, la sauge sclarée, le romarin, le thym, la camomille, le myrte, le petit grain, le genévrier... Ces productions génèrent environ entre 100 et 10000 tonnes de sous-produits riches en substances bioactives pour chaque huile essentielle. Le département BioSyM s'intéresse à la recherche de molécules bioactives à partir de plantes et fruits pour les valoriser dans les domaines pharmaceutiques et/ou agroalimentaires (ANR Vamagphar, ANR Actiphen, CASDAR Innoraisin, région Natsubmidwine). En effet, notre démarche cible des couples matière végétale/activité biologique in vitro non étudiées dans la littérature.

Objectifs

L'objectif de cette thèse est donc d'identifier des extraits et/ou des molécules ayant une activité biologique intéressante comparé à des principes actifs ou des extraits commercialisés.

Méthode

1- Extraction des métabolites secondaires à partir du sous-produit d'huile essentielle pour chaque plante par macération et par extraction à solvant accélérée (ASE) en utilisant des solvants organique à différentes polarités (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). Les extraits correspondants sont obtenus après évaporation à sec des solvants (sans résidu de solvant). Cette étape est nécessaire pour séparer les molécules en fonction de la polarité. Pour l'application agroalimentaire, s'il y a un extrait ou une molécule intéressante, on optimisera son extraction par la suite avec un solvant et un procédé adéquat.

2- Screening des activités biologiques et des familles chimiques des différents extraits. Cette étape permet de sélectionner les extraits ayants les meilleures activités.

3- les deux extraits les plus actifs seront produits en grande quantité et fractionnés par bioguidage pour isoler les molécules bioactives.

4- Identification structurale des molécules bioactives par les méthodes analytiques LC-MS, GC-MS, RMN, IRTF et analyse élémentaire.

Résultats attendus - Expected results

Caractériser des molécules et/ou des extraits ayant des propriétés originales pour des applications pharmaceutiques et/ou agroalimentaires.

Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

L'encadrement du doctorant sera réalisé avec une formation pratique sur les équipements analytiques, des réunions de bilan et d'avancement des travaux (minimum une fois par semaine). Un comité de thèse est prévu pour se réunir au moins 2 fois (fin de la première année et de la deuxième année de la thèse). Un suivi est prévu pour les crédits qui sont prévus dans le cadre des règles de l'école doctorale SEVAB et le règlement général de l'Université de Toulouse.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

A niveau du LGC, au sein de notre équipe, la majorité des études seront réalsiées sur le site pharmacie : toutes les étapes d'extraction (macération, ASE), d'analyse chimique (lecteur de plaque, HPLC-DAD-ELSD, GC-FID/MS) et du screening biologique (lecteur de plaque), fractionnement (Flash chromatographie et HPLC préparative), IRTF. A l'échelle du LGC nous avons accès MEB au SAP. Pour la partie RMN, nous avons accès à la plateforme de l'ICT de l'Université de Toulouse.

Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

Nous avons l'habitude de travailler sur ce type de sujets (plus de 60 publications). Le travail donnera lieu à plusieurs publications (en moyenne pour nos doctorants 3-4 publications) en plus des communications orales et par affiche. Pour les résultats assez originaux, il est prévu de protéger les résultats sous forme de brevet.

Collaborations envisagées

En fonction du rendement d'extraction, des molécules ou des extraits choisis, des collaborations sont envisageables avec des collègues des autres départements du LGC pour optimiser la production avec des méthodes vertes surtout pour les applications agroalimentaires.

Ouverture Internationale

Nous avons plusieurs collaborations internationales (Madagascar, Tunisie, Bénin, Liban) liées à la valorisation des susbtances naturelles. Si le temps le permet, nous pouvons faire un tranfert de compétences vers ces équipes.

Références bibliographiques

Références

1. BENMOUSSA H, FARHAT A, ROMDHANE M, BOUJILA J*. Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil seeds using double walled reactor. *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, 12, 8, 3863-3870. Impact Factor 2019: 3.30.
2. VILLARREAL-SOTO SA, BEAUFORT S, BOUJILA J*, SOUCHARD JP, RENARD T, ROLLAN S, TAILLANDIER P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry* 2019, 83, 44-54. Impact Factor 2019: 2.88.
3. YAHYAOUJ M., BOUJILA J. *, CAZAUX S, ABDERRABBA M.. The impact of regional locality on chemical composition, anti-oxidant and biological activities of *Thymelaea hirsuta* L. extracts. *Phytomedicine*, 2018 41, 13-23. Impact Factor 2015: 3.53.
4. KOHOUE M., GBAGUIDI F., AGBANI P., AYEDOUN M-A, CAZAUX S., BOUJILA J.* Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves. *Pharmaceutical Biology* 2016 55(1), 33-42. Impact Factor 2018: 1.92.
5. BEKIR J., CAZAUX S., MARS M., BOUJILA J*. In vitro anti-cholinesterase and anti-hyperglycemic activities of flowers extracts from seven pomegranate varieties. *Industrial Crops and Products* 2016, 81, 176–179. Impact Factor 2014: 2.84.
6. KAMMOUN EL EUCH S., BOUJILA J*., BOUZOUITA N. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products* 2015, 76(15), 1100–1105. Impact Factor 2014: 2.84.
7. ZNATI M, BEN JANNET H., CAZAUX S., SOUCHARD JP., HARZALLAH SKHIRI F., BOUJILA J.* Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. *Molecules* 2014, 19(10), 16959-16975. Impact Factor 2015: 2.43
8. ZNATI M, BEN JANNET H., CAZAUX S., BOUJILA J.* Chemical Composition, Biological and Cytotoxic Activities of Plant Extracts and Compounds Isolated from *Ferula lutea*. *Molecules* 2014, 19(3), 2733-2747. Impact Factor 2015: 2.43.
9. KHLIFI D., SGHAIER RM., AMOURI S., LAOUINI D., HAMD M., BOUJILA J*. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 55 202–208. Impact Factor 2015: 3.01
10. KHLIFI D., EL HAYOUNI A, VALENTIN A, CAZAUX S, MOUKARZEL B, HAMD M., BOUJILA J*. LC-MS analysis, anticancer, antioxidant and antimalarial activities of *Cynodon dactylon* L. extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013, 45 240– 247. Impact Factor 2015: 2.47

Complément sur le sujet

<https://lgc.cnrs.fr/annuaire/jalloul-bouajila/> (<https://lgc.cnrs.fr/annuaire/jalloul-bouajila/>)

Dernière mise à jour le 22 avril 2020