

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار تليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT Sciences de la Matière



## ***Mémoire de Master***

**Domaine : Sciences de la matière**

**Filière : Chimie**

**Option : Chimie organique**

**Par :**

*Zgaou Soumia  
Mouaziz Souiad*

### **THEME**

---

**Application de la méthode des surface de réponse(MSR) pour  
l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques a partir des  
galles de pistachier de l'Atlas**

---

*Soutenu publiquement devant le jury composé de :*

*Gherib Abdelaziz*

*Pr*

*Président*

*Bouziane Amel*

*MAA*

*Examinatrice*

*Hamdi Fatima Zohra*

*MAA*

*Examinatrice*

*Benahmed Ziyad*

*MCA*

*Rapporteur*

***Année universitaire 2017-2018***

## *Remerciements*

**Nous tenons à rendre grâce à dieu de nous avoir donné le courage et la patience pour mener à bien ce travail pendant toute cette année.**

**Nous voudrions exprimer notre profonde reconnaissance à notre promoteur, *MR, Ben-Ahmed ZiYad*, pour son profond soutien, son encouragement et les efforts qu'il a prodigué pour nous guider dans notre recherche.**

**Nous tenons à dire toute notre gratitude à l'ensemble des enseignants du département de sciences de la matière, qui ont contribué à notre formation, ainsi qu'aux membres du jury, qui nous feront l'honneur d'examiner ce modeste travail.**

**Que tous ceux qui nous ont aidés d'une manière ou d'une autre dans l'élaboration de ce travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.**

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents qui n'ont épargné aucun effort pour notre éducation et notre bien-être, mon père qui n'a cessé de m'encourager durant mon parcours, ma mère qui a toujours veillé au bon déroulement de mes études.*

*A mes très chers frères, Abdelkader, Larbi, Mohamed et Ali qui m'ont toujours éclairée et accompagnée de leurs précieux conseils.*

*A ma sœur, Kalthoum et son cher mari Ilyess qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours.*

*A ma petite sœur Meriem, à qui je souhaite un parcours scolaire brillant.*

*A mes adorables amies : Amira, Dhaouya, Kheira, Rabiaa et Rahma.*

*A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*A toutes les personnes que j'aime, j'adore et j'estime, qui m'ont encouragée et épaulée puissent t'ils trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.*

*A mon adorable binôme, amie et sœur Souiad.*

Soumia

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents qui ont tant donné pour moi, mon père qui n'a cessé de m'orienter dans mon parcours, ma mère qui m'a tant encouragée dans mes études.*

*A ma très chère sœur Ghazala, qui a tant donné et sacrifié pour le bon déroulement de mes études.*

*A mon très cher frère Kouider et sa femme Halima, qui m'ont toujours encouragée.*

*A mes adorables frères et sœurs, Abdelkader, Maemoune, Asma, Souad et Aridj qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours.*

*A ma chère sœur et amie Amira ainsi qu'à son mari, qui m'ont épaulée durant mon parcours.*

*A mes adorables amies Kheira, Aouatif et Bichou.*

*A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*A toutes les personnes que j'aime, j'adore et estime, qui m'ont encouragée et épaulée, puissent t'elles trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.*

*A mon adorable binôme, amie et sœur Soumia qui a été là pour moi.*

# *Sommaire*

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction générale** 01

## **Synthèse Bibliographique**

**I Introduction** 03

**I.1. La percolation** 03

I.1.1. La décoction 04

I.1.2. L'infusion 04

I.1.3. Macération 04

I.1.4. La digestion 04

I.1.5. L'élution 05

**I.2. Extraction des composés phénoliques** 05

1.1. Extraction assistée par micro-ondes 05

1.2. Extraction par les ultrasons 05

1.3. Principe de l'ultrason 06

**2. Méthodologie des plans d'expériences** 08

2.1. Principe 08

2.2. Terminologie 08

**3.2. Méthodologie des plans d'expériences** 10

3.2.1. Recherche des facteurs influents 10

3.2.2. Modélisation 11

3.2.3. Optimisation 11

**3.3. Plan de Box-Behnken à trois facteurs** 11

3.3.1. Définition du plan de Box-Behnken 11

3.3.2. Description du plan 11

3.4. Modèle mathématique postulé	12
3.5. Le modèle de l'expérimentateur	13
3.3.5. Quelques application des plans Box-Behnken	13
<b>4. Pistachier de l'Atlas</b>	15
4.1. Description morphologique	15
4.2. Systématique	15
4.3. Galle	15
4.3.1. Généralités	15
4.3.2. Utilisation des galles	16
4.3.3. Etude antérieur	16

## **Matériels et Méthodes**

<b>II. Matériels et Méthodes</b>	17
1. <b>Matériel végétal.</b>	17
1.1. Protocole utilisé pour l'extraction	17
2. <b>Optimisation des conditions d'extraction.</b>	18
2.1. Etude préliminaire	18
2.2. Analyse préliminaire	18
3. <b>Dosage des composés phénoliques(CPT)</b>	19
3.1. Dosage des(CPT)	19
3.2. Dosage de flavonoïdes totaux (FVT)	19
3.3. Test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	19
4. <b>Conception expérimental</b>	21
4.1. Matrice d'expériences	21
5. <b>Analyse statistique</b>	22

## **Résultats et discussion**

<b>III. Résultats et discussion</b>	23
1. <b>Extraction des composés phénoliques par ultrason</b>	23
1.1. L'effet de différents temps d'extraction	23

1.2.	L'effet de volume de solvant	24
1.3.	Effet de différents masse d'extraction	25
<b>2.</b>	<b>Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques</b>	<b>26</b>
2.1.	Plan d'expérience Box-Behnken	27
2.2.	Validation de modèle	27
2.3.	Le coefficient de détermination ( $R^2$ )	28
2.4.	Modèle global et manque d'ajustement	28
2.5.	Effet de facteurs (coefficients)	28
2.6.	Analyse de modèle mathématique	29
2.7.	Analyse de surfaces de réponse	30
2.8.	Paramètres optimaux	32
<b>3.</b>	<b>Optimisation des conditions d'extraction des composés flavonoidiques.</b>	<b>32</b>
3.1.	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes	32
3.2.	Coefficient de corrélation	32
3.3.	Effet des facteurs (coefficients)	32
3.4.	Analyse de modèle mathématique	33
3.5.	Analyse des surfaces de réponse	33
3.5.1.	Condition optimales	35
<b>4.</b>	<b>Test d'évaluation d'activité antioxydante</b>	<b>36</b>
4.1.	Coefficient de corrélation	36
4.2.	Effet des facteurs	36
4.3.	Analyse du modèle mathématique	37
4.4.	Analyse des surfaces de réponse	38
4.5.	Solution	39
<b>IV</b>	<b>Conclusion</b>	<b>40</b>

## Annexes

# *Liste des tableaux*

## **Bibliographique**

- |      |  |    |
|------|--|----|
| 01 . | La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour trois Facteur   | 11 |
| 02.  | Classification expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des galles du Pistaciaatlantica | 15 |

## **Résultats et discussions**

- |     |   |    |
|-----|---|----|
| 01. | Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des galles du Pistaciaatlantica                  | 26 |
| 02. | La matrice expérimentale de Box-Behnkenpour trois facteurs ( $X_1 X_2 X_3$ ) et leur réponse CPT, FVT et DPPH exprime en (mg/g matière sèche) | 27 |
| 03. | L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre  | 28 |
| 04. | Coefficients de régression et leurs significations statistiques   | 29 |
| 05. | Condition optimales d'extraction des composés phénoliques par ultrason (mg EAG/gMS)   | 32 |
| 06. | Les coefficients de régression estimés du modèle polynomial du second degré   | 33 |
| 07. | Conditions optimales d'extraction des composés flavonoidiques par ultrason (mg EQ/gMS)  | 36 |
| 08. | Les coefficients de régression estimés du modèle polynomial du second degré   | 37 |
| 09. | Conditions optimales de l'activité scavenger DPPH par ultrason (mg EAAC/g MS)   | 39 |

# *Liste des figures*

## **Bibliographique**

01.	Schéma des différents modes d'extraction fonction de la température et du contact avec le solvant	04
02.	Gramme de fréquence des ondes sonores	06
03.	Cycle de compression et ra réfraction induite par les ondes sonores	07
04.	L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine l'étude forme la surface de réponse	09
05.	Représentation graphique d'un domaine de la facture	09
06.	Le domaine d'étude défini par la réunion des domaines des différents facteurs	10
07.	Représentation Schématique d'un domaine étude	10
08.	Illustration du plan de Box Behnken pour trois facteurs	11

## **Matériel et Méthode**

01.	Galle femelle de <i>P atlantica</i> dans la région de Laghouat	17
02.	Extraction par ultrason (photo original)	17
03.	Réaction d'une structure polyphénolique avec le radical DPPH*	20

## **Résultats et discussion**

01.	Effet différent temps sur les CPT les même lettre indique n'est pas signification ( $p < 0.05$ )	23
02.	Effet volume sur l'extraction des CPT* les même lettre indique la différence n'est pas signification ( $p < 0.5$ )	24
03.	Effet de différent masse sur CPT ( $p < 0.05$ )	26
04.	Surface de réponse pour les effets volume /temps (A) la masse/temps (B) et volume /masse (C) sur le rendement des composés phénoliques des galles du <i>P.atlantica</i>	31
05.	Surface de réponse pour les effets volume/temps (A) la masse/temps (B) et volume /masse (C) sur le rendement de FVT des galles de <i>P.atlantica</i>	34
06.	Surface de réponse pour les effets volume/temps(A) la masse /temps(B) et volume /masse (C) sur l'activité Scavenger DPPH des galles du <i>P.atlantica</i>	38

## *Liste des abréviations*

**EAM :** l'extraction assistée par micro onde

**MSR :** Méthode de surface de réponse

**CCD :** plan composite centré de design

**BBD:** plan de Box Behnken design

**PBB:** plan Box Behnken

**DPPH:** 2, 2Diphényl -1-picrylhydrozyl

**ABB:** Azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfoniasid

**CPT:** Compose phénolique totaux

**FVT:** Flavonoids totaux

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** carbonate de sodium

**AlCl<sub>3</sub>:** chlorure d'aluminium

**CAFAA:** Capacité antioxydante a été exprime en mg d'équivalente d'acide  
Ascorbique

**ANOVA :** Analyse de variance

**MS :** Matière Sèche

**EAG :** Equivalente acide gallique

**EQ :** Equivalente quercitrine

**Δ :** le manque d'ajustement

## *Introduction générale*

## ***Introduction***

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Ces dernières années ont vu un débordement d'information sur le stress oxydatif dans le déclenchement de certaines maladies graves (cancers, maladie cardio-vasculaire...etc.) et l'action thérapeutique de ces composés phénoliques sur ces pathologies. Ces composés connaissent un intérêt croissant pour des applications dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique [1].

L'extraction brute, naturels de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources de nouveaux médicaments [2]. Ce qui fait que les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...) [2].

La quantité et la qualité des polyphénols dans les végétaux peuvent varier sensiblement en fonction des différents facteurs. Une série de facteurs est liée à la culture et la génétique des plantes, aux pratiques agricoles, à la fertilité du sol, aux conditions climatiques, à la présence de ravageurs et les moyens de lutte contre eux. Une autre série de facteurs prennent leurs origines au moment où la plante quitte la ferme ou elle a été cultivée et est acheminée vers le consommateur. Les facteurs liés à la conservation et à la préparation des aliments ont également une incidence importante sur le taux de ces substances [3].

Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par la méthode d'extraction mais cette procédure est influencée par plusieurs paramètres tels que : la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction utilisée, la dimension des particules d'échantillon et le temps d'extraction. Une autre difficulté à prendre en considération est la susceptibilité des polyphénols à l'oxydation. Chaque matériel végétal a ses propriétés spécifiques en termes d'extraction de ces composés [4].

Vu la diversité de composition et les différentes sources naturelles des polyphénols, un protocole d'extraction universel de ces composés n'est pas conseillé, et des processus spécifiques et optimisés doivent être désignés pour leur extraction [5].

Plusieurs modèles mathématiques ont été élaborés pour mieux gérer les interdépendances de ses variables [5], parmi ces modèles ; la méthode de surface de réponse (MSR) est largement utilisée dans les études d'optimisation des multi variables dans différents processus chimiques et biotechnologiques [3].

Notre étude porte sur un végétal Méditerranéen très réputé en Algérie, *Pistacia atlantica* plus communément connu sous le nom d'elboutma qui est une plante xérophyte qui produit des fruits et galls comestible et du fourrage pour le bétail, ses raquettes sont riches en éléments nutritifs et en composés phénoliques qui jouent un rôle primordial dans la prévention de nombreuses maladies [6].

Le présent travail a pour objectif d'optimiser les facteurs agissant sur le procédé d'extraction assistée par ultrason des composés phénoliques des galls du *P. atlantica*, afin de chercher les valeurs optimales de ces facteurs permettant de maximiser le rendement de l'extraction aussi bien que le taux des composés phénoliques.

Ce travail a été accompli en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse qui nous a permis de faire une étude d'optimisation du procédé d'extraction de composé phénoliques par sonication et de trouver un point optimal pour l'extraction assistée par ultrason et qui a été validé statistiquement.

Afin de répondre à cette problématique, notre travail est divisé en trois parties. Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur la méthodologie des surfaces de réponse et la plante. Nous développerons dans la deuxième partie le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'extraction des composés phénoliques à partir des galls du pistachier de l'Atlas, le dosage colorimétrique (des composés phénoliques et des flavonoïdes) et les activités antioxydants (tests au DPPH). La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus au cours d'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des galls du *P. atlantica* par ultrason en utilisant la méthode de surface de réponse (MRS) développée par le plan de Box Behnken (BBD).

Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus. Ces derniers pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales.

## **Synthèse Bibliographique**

## **I. Introduction**

Historiquement, l'extraction solide-liquide appelée aussi l'extraction par solvant est l'une des opérations unitaires les plus anciennes. Accomplie couramment à la maison où elle s'apparente directement à la réalisation du café quotidien, elle est aussi très employée en industrie particulièrement en hydrométallurgie (dissolution sélective de minerais ou lixiviation) et dans l'industrie agroalimentaire et des cosmétiques (sucre de betteraves, huiles, et essence naturelles.....).

Dans les processus d'extraction et de séparation de molécules spécifiques (molécules actives) présentes dans un milieu solide, l'opération fait souvent appel, d'un point de vue technologique, à la diffusion au sein du solide d'un fluide (liquide) porteur, dit solvant d'extraction ; l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide – liquide.

Cependant, le solvant, capable de « mettre en solution » un ou plusieurs composants solides, cristallisés ou liquides, dénommé soluté [7], génère une solution ou un extrait (solvant + soluté). Le transfert de ces molécules actives recherchées, vers le milieu extérieur a lieu grâce à une diffusion ayant pour élément moteur le gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre et la diffusion est quasi nulle. Par contre si la phase liquide est continuellement renouvelée, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide [8].

A la fin de l'opération, le solide épuisé, appelé résidu, inerte ou insoluble, contient très peu ou pas de soluté. En règle générale, c'est la solution qui constitue la phase noble, mais il se peut que ça soit le résidu solide insoluble qui présente la vraie valeur économique [9].

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums. Les solvants utilisés dans ces procédés de séparation des produits végétaux sont généralement l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc.....

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles.

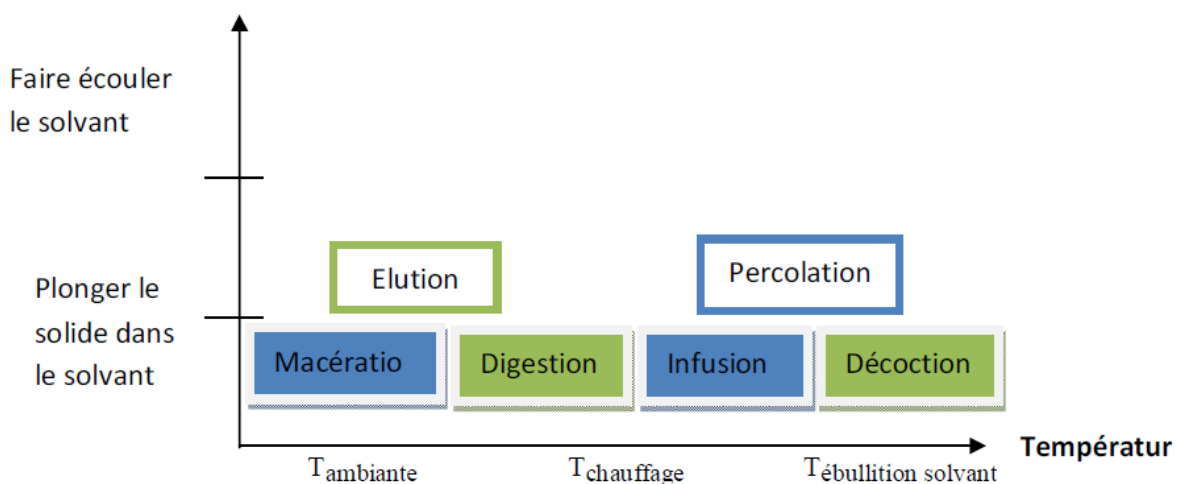
**I.1. La percolation** : consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solides finement divisés. La préparation du café relève de cette opération [10].

**I.1.1. La décoction** : est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable [10].

**I.1.2. L'infusion** : est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération [11].

**I.1.3. La macération** : est une infusion dans un solvant à froid. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau.

Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur [11].



**Figure n°1:** Schéma des différents modes d'extraction en fonction de la température et du contact avec le solvant [11].

**I.1.4. La digestion** : est une macération à chaud. Cette opération et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente, ne posant généralement aucun problème de conservation ni de contamination bactérienne [11].

**I.1.5. L'élu­tion** : consiste à enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par simple contact avec un solvant. Elle est fréquemment utilisée dans les méthodes d'analyse [10].

## **I.2. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des composés bioactifs à partir des matrices végétales utilisant des solvants, constitue une étape importante dans la fabrication des produits riches en composés actifs divers. De ce fait plusieurs études ont été proposées on utilisant différentes techniques, à savoir

- extraction conventionnelle (liquide /solide, liquide/ liquide)
- extraction moderne (micro-onde, ultrason)

### **I.2.1. Extraction assistée par micro- ondes**

Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur communiquer un mouvement de fluctuation ce qui se traduit donc par une augmentation de la température de la matière en question à la profondeur de pénétration. L'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». En absorbant l'énergie des microondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction [12].

### **I.2.2. Extraction par les ultrasons**

L'ultrason a été considéré comme une technique innovante et prometteuse du 21<sup>ème</sup> siècle, avec de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, chimie et domaines alimentaires depuis la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle.

Les ultrasons peuvent être appliqués soit au niveau du laboratoire ou à l'échelle industrielle. De nombreuses installations industrielles ont appliqué avec succès cette technique dans la transformation des aliments, la conservation et l'extraction d'une manière plus avantageuse que les procédures classiques [13].

Les applications de l'ultrason proviennent principalement de leurs effets physiques, il permet l'utilisation des conditions plus douces sur un temps de traitement plus court par rapport aux techniques classiques, ce qui se traduit par des produits de qualité améliorée avec un coût inférieur.

En outre, l'ultrason est utilisé dans les procédures d'extraction assistée dans une large gamme de matrices pour d'autres applications directes ou indirectes des composés cibles.

Les avantages proposés d'extraction assistée par ultrasons comprennent l'amélioration des taux global d'extraction et le rendement, possibilité d'utilisation des solvants alternatifs et l'amélioration de l'extraction de composés sensibles à la chaleur. [1]

### I.2.2.1. Principe de l'ultrason

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui nécessitent un milieu élastique de propagation. Ils se différencient des sons par la fréquence de l'onde. Les fréquences audibles pour les êtres humains sont comprises entre 16 et 20 kHz, tandis que les fréquences ultrasonores vont de 20 kHz à 10 MHz. A partir de cette large gamme de fréquence, deux groupes principaux sont distingués et les deux sont utilisés dans l'industrie alimentaire : ultrasons de diagnostic et de puissance [13].

Les principaux paramètres physiques qui caractérisent les ultrasons sont la puissance (W), la fréquence (Hertz) et la longueur d'onde (cm) à partir de laquelle l'intensité ultrasonique (I) est calculée en ( $W\ cm^{-2}$ ).

- ✓ L'ultrason diagnostique (également appelé ultrasons à haute fréquence) compris entre 2 et 10 MHz ( $I < 1\ W\cdot cm^{-2}$ ) est utilisé dans de nombreux domaines tels que l'imagerie médicale ou même pour la détection des défauts (Inspection de caissonnement pour les plastiques).
- ✓ L'ultrason de puissance conventionnel (appelé aussi ultrason à basse fréquence) vont de 20 kHz à 100 kHz ( $I > 1\ W\cdot cm^{-2}$ ) [12].

Une gamme étendue est utilisée dans la chimie sonore (20 kHz à 2 MHz) et dans cette gamme, l'échographie est capable de produire des effets physiques et / ou chimiques dans le milieu afin de faciliter ou d'accélérer les réactions chimiques ou même pour d'autres applications dans l'industrie (découpe, soudage plastique).

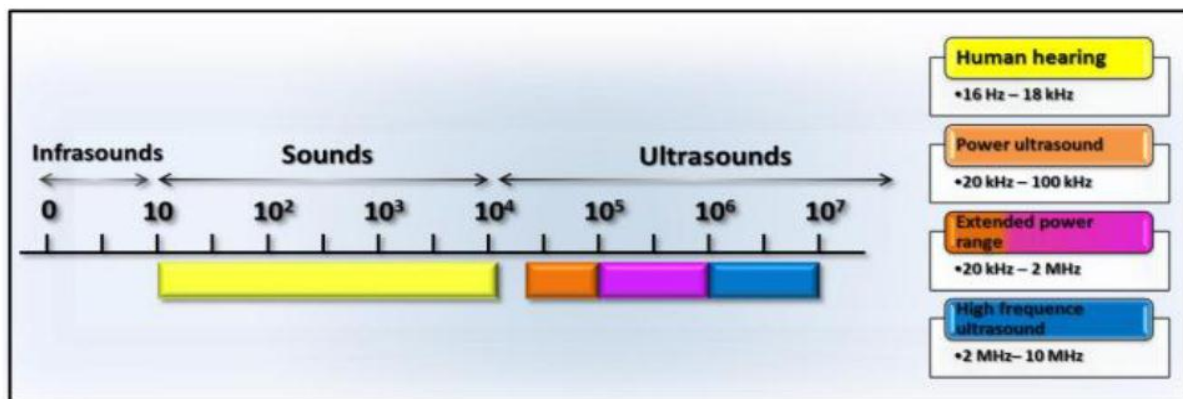
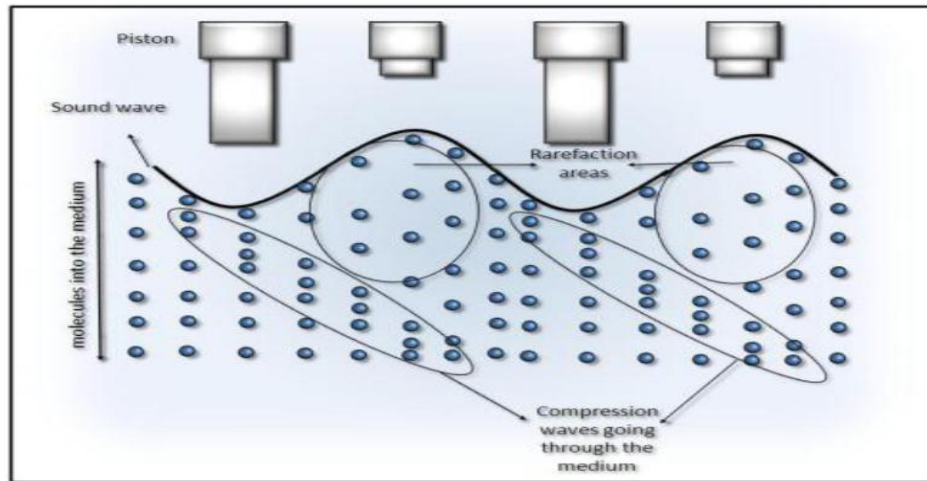


Figure n°2 : gammes de fréquence des ondes sonores

Une faible puissance et haute fréquence des ultrasons est un moyen non destructif de gagner des informations structurels et / ou chimiques, sur le milieu utilisé.

Les principaux effets des ultrasons dans un milieu liquide sont attribués aux phénomènes de cavitations qui sont émis à partir des processus physiques qui créent, agrandissent et implorment des micros bulles de gaz dissous dans le liquide. Les molécules qui constituent le liquide support

sont maintenues ensemble par des forces d'attraction et comme une vague d'ultrasons passe par un milieu élastique (Figure n° 3). Il induit un déplacement longitudinal de ces molécules, agissant comme un piston sur la surface, résultant d'une succession de phases de compression et de raréfaction [13-15].



**Figure n°3** : Cycles de compression et raréfaction induits par les ondes sonores

L'extraction par ultrason a été prouvée pour accélérer l'extraction par solvant des composés bioactifs à partir de plante [16]. Elle offre beaucoup d'avantages tels que la réduction des solvants, de la température et du temps d'extraction, ce qui est très bénéfique pour l'extraction de composés thermolabiles et instables [16]. En plus des facteurs mentionnés au-dessus d'autres peuvent également influencer l'efficacité de l'extraction, le rendement des polyphénols et l'activité antioxydante tels que le temps d'extraction, la température d'extraction et le rapport solide-liquide. Ainsi, il est nécessaire d'optimiser ces paramètres pour obtenir le maximum de ces composés phénoliques [17].

Traditionnellement, l'optimisation a été réalisée en variant un seul facteur à la fois, les autres restés constants. Cette méthode était laborieuse, coûteuse et lente, y compris qu'elle ne mettait pas en considération les interactions de divers facteurs [17], donc ne représentait pas les effets complets des paramètres sur la réponse [18]. La méthode des surfaces de réponse (MSR) peut surmonter ces difficultés [17]. En outre, MSR nécessite un nombre réduit d'expériences et moins de temps et de travail. La méthodologie de surface de réponse a été utilisée avec succès pour modéliser et optimiser l'extraction de composés phénoliques de différentes sources [19]. De nombreux modèles ont été exploités pour l'optimisation de l'extraction tels que le plan factorielle complète, plan de Plackett-Burman, plan de Taguchi, plan composite centré (CCD)

et plan de Box-Behnken [20]. Parmi ces options, le plan Box-Behnken (BBD) est couramment utilisé pour optimiser l'extraction de constituants bioactifs [21].

### **I.3.1. Méthodologie des plans d'expériences**

Dans toutes les disciplines, il est fréquent d'étudier un phénomène dépendant de différents paramètres. La méthode intuitive n'est pas toujours la meilleure et qui consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables sauf une et de mesurer la réponse pour plusieurs valeurs de la variable mobile.

#### **I.3.1.1. Principe**

Un plan d'expérience consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales de manière à révéler les effets de différents traitements, tel que comparer les effets de quatre antibiotiques sur une souche bactérienne [22].

La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats, et minimiser le nombre des essais sans toute fois sacrifier la qualité.

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour les quelles la meilleure précision

possible avec le minimum d'essais sont obtenus, afin d'avoir le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum [22].

#### **I.3.1.2. Terminologie**

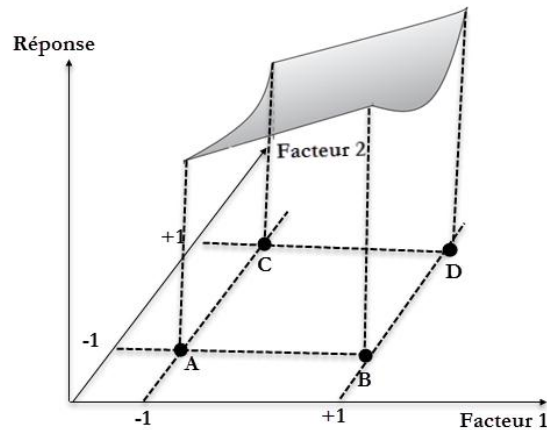
Avant d'entamer l'élaboration du plan d'expérience, la connaissance d'une certaine terminologie qui lui est associée revêt une importance primordiale :

##### **I.3.1.2.1. Facteur**

On appelle facteur un ensemble de traitements de « même nature » liés par une similitude logique et mutuellement exclusif. Ces différents traitements sont nommés modalités ou encore niveaux [23]. Les facteurs peuvent être quantitatifs, lorsqu'ils sont naturellement exprimés à l'aide de valeurs numériques (pression, température, durée, etc.) ou être qualitatifs dans le cas contraire (couleur, type de matériau, sexe, etc.) La variation de facteur entraîne le changement de niveau. La connaissance de l'ensemble de tous les niveaux utilisés par chaque facteur est nécessaire pour la réalisation des expériences [23].

##### **I.3.1.2.2. Réponse**

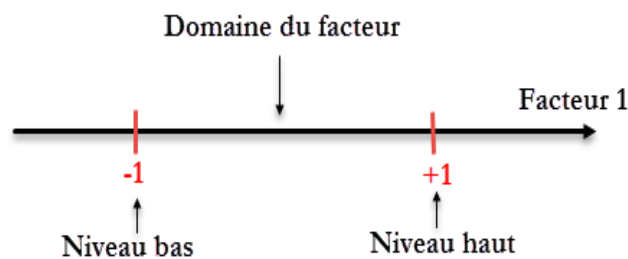
La réponse de facteur, est la grandeur observée pour chaque expérience réalisée, qui doit être numérique et prise une seule fois au cours d'une observation [24].



**Figure n°4:** L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse.

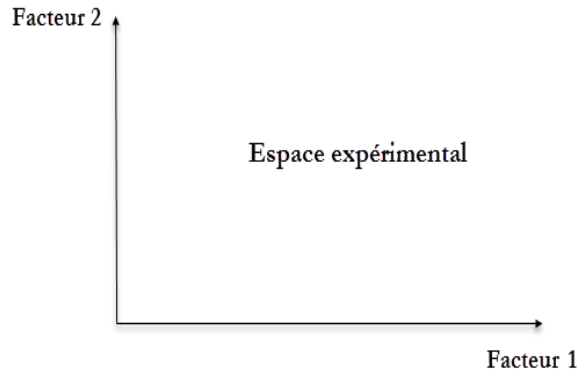
### I.3.1.2.3. Espace expérimental

Le domaine de variation du facteur ou le domaine du facteur est l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre un facteur entre les niveaux bas et haut. Par convention, le niveau bas est souvent noté par  $(-1)$  et le niveau haut par  $(+1)$  [24].



**Figure n°5 :** Représentation graphique d'un domaine du facteur

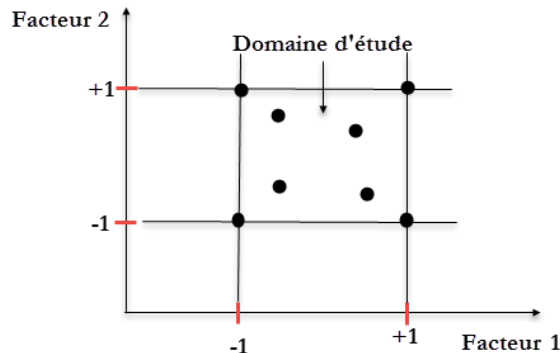
L'existence d'un second facteur, est représentée également, par un axe gradué et orienté, dont ces niveaux et son domaine de variation sont définis. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier, ainsi un repère cartésien est obtenu, qui définit un espace euclidien à deux dimensions, qui est appelé l'espace expérimental [24].



**Figure n°6** : Espace expérimental défini par la réunion des domaines des différents facteurs

#### I.3.1.2.4. Domaine d'étude

Le regroupement des domaines des facteurs définit le domaine d'étude, qui est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour effectuer les essais. Une étude, ensemble de plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude [24].



**Figure n°7** : Représentation schématique d'un domaine d'étude.

### I.3.2. Méthodologie des plans d'expériences

#### I.3.2.1. Recherche des facteurs influents

Cette étape consiste à répondre à un ensemble de questions concernant l'influence des facteurs considérés sur le phénomène étudié, parmi tous les facteurs susceptibles d'influer sur la réponse, lesquels ont une influence significative et que vaut cette influence, et également de définir les interactions entre les facteurs. Une fois les facteurs influents sont bien déterminés et leurs influences est quantifiées, une modélisation est nécessaire [25].

### I.3.2.2. Modélisation

Dans cette phase, s'effectue la recherche et la détermination de la forme graphique (linéaire, courbe, etc.), de l'influence définie dans l'étape précédente, et la représentation de l'équation mathématique régissant, avec une précision donnée, la variation du phénomène en fonction des facteurs influents. La modélisation d'une réponse se réalise en choisissant des points expérimentaux, dont le nombre est au moins égal à la somme des effets, des interactions et des effets quadratiques. Ainsi, une matrice de  $n$  lignes et  $k$  colonnes, où  $n$  est le nombre d'expériences et  $k$  est le nombre des effets, est définie [25].

### I.3.2.3. Optimisation

Une fois, la détermination de la forme graphique et analytique de la réponse est réalisée, il est primordial de chercher les conditions expérimentales donnant le meilleur résultat. Cette étape nécessite préalablement une connaissance assez profonde du phénomène étudié [25].

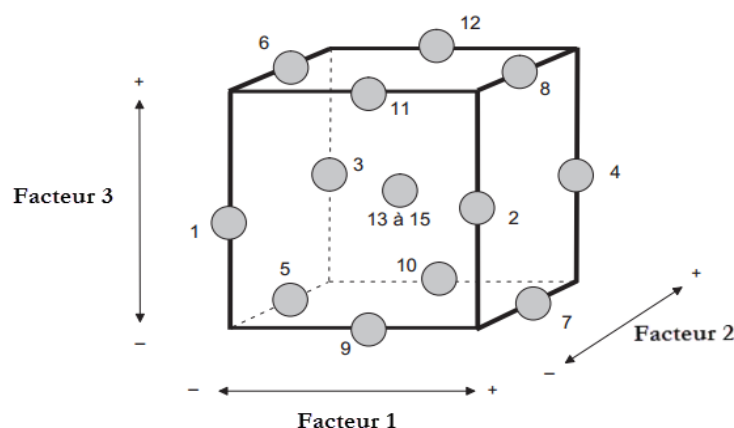
### I.3.3 Plan de Box-Behnken à trois facteurs

#### I.3.3.1. Définition du plan de Box- Behnken

Ce sont des structures symétriques dans les quelles chaque facteur prend trois niveaux. Ils sont la combinaison de plans factoriels à deux niveaux, avec des blocs incomplets équilibrés suivant un arrangement particulier avec plusieurs essais au centre du domaine expérimental [24].

#### I.3.3.2. Description du plan

Les points expérimentaux sont placés au milieu des arêtes du cube. Cette disposition a pour conséquence de placer, les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, sur une sphère [25].



**Figure n°8:** Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs.

Un cube possède 12 arêtes (12 essais), aux quelles sont ajoutées trois points au centre du domaine d'étude suivant les conseils de Box et Behnken. Les points situés au centre d'une

arête pour conséquence de placer, les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, sur une sphère [25].

Les points situés au centre d'une arête prennent pour coordonnées  $(0, \pm 1, \pm 1)$  [24]. Les plans de Box-Behnken à trois facteurs contiennent donc 15 points expérimentaux, étant sur une sphère, dont le critère d'iso-variance par rotation sera respecté [24].

**Tableau 01:** La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour 3 facteurs [26].

n° essai	Facteur1	Facteur2	Facteur3
1	0	- 1	- 1
2	+ 1	0	- 1
3	0	+ 1	- 1
4	- 1	0	- 1
5	- 1	- 1	0
6	+ 1	- 1	0
7	+ 1	+ 1	0
8	- 1	+ 1	0
9	- 1	- 1	+ 1
10	+ 1	0	+ 1
11	0	+ 1	+ 1
12	- 1	0	+ 1
13	0	0	0

### I.3.3.3. Modèle mathématique postulé

La méthode des surfaces de réponse est un ensemble de technique mathématiques se basant sur la conception expérimentale pour déterminer la portée des variables d'entrée indépendantes [13]. Pour cela, On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs, dont la formulation la plus générale est la suivante [23]:

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k) \dots \dots \dots \text{(Eq.(01))}$$

Où f est la fonction-réponse qui dépend des variables aléatoires xi indépendantes ;

Si l'on suppose, par exemple, que la réponse doit être linéaire à l'ensemble des facteurs, la forme du modelé s'écrit comme telle [14] :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{j>i} \sum_{i=1}^{n-1} a_{ij} X_i X_j \dots \dots \dots \dots \text{(Eq.(02))}$$

Par contre, si la réponse est une fonction plus compliquée, il y a l'utilisation d'autre modèle, par exemple un polynôme d'ordre 2 [14]:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{j>i} \sum_{i=1}^{n-1} a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2 \dots \dots \text{(Eq.(03))}$$

Où y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c'est la réponse. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée [9].

- $X_i$  représente un niveau du facteur i,

- $X_j$  représente un niveau du facteur j,

- $a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii}$  sont des coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences [23].

#### **I.3.3.4. Le modèle de l'expérimentateur**

Deux compléments doivent être apportés au modèle purement mathématique.

-Le premier complément est le « manque d'ajustement (lack of fit en anglais). Ce dernier représente l'écart entre le modèle a priori choisi par l'expérimentateur et le modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles [23].

-Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En mesurant plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, les résultats seront dispersés. Cette différence est appelée erreur aléatoire ou expérimentale (pure error en anglais). Donc La formule générale (01) doit être modifiée ainsi [23] :

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k) + \Delta + \mathcal{E} \dots \dots \dots \text{(Eq.(04))}$$

Où

$\Delta$  : Le manque d'ajustement

$\mathcal{E}$  : L'erreur aléatoire

#### **I.3.3.5. Quelques applications des plans Box-Behnken**

Le plan de Box-Behnken est un outil qui est énormément exploité pour l'optimisation dans différents secteurs notamment pour l'extraction des métabolites secondaires dans diverses parties de la plante tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes ou encore les huiles essentielles. Cette optimisation via la méthode des surfaces de réponse a été étudiée par de nombreux chercheurs qui ont fait usage du PBB, on évoquera quelques-unes : En génie

agronomique, Zaddem (2014) [27] fait l'étude sur l'application de la méthode des surfaces de réponse en choisissant le plan Box-Behnken pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain. En chimie, on cite l'étude d'Alberti et al. (2013) [28] sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des pommes, les trois études sur l'optimisation de l'extraction par ultrason réalisés par Yang et al.(2010) [29] à partir des fleurs de *Citrus aurantium. Var. Amara Engl*, Jennan et al. (2014) [30] à partir de la plante *T. hyemalis* et Majd et al. (2014) [31] à partir des feuilles de *Phlomischema parviflorum*, l'étude d'Akalin et al. (2015) sur l'optimisation de l'extraction d'huile de sauge [32], les travaux de Wuet al. (2015)[33]

## I.4. Pistachier de l'Atlas

### I.4.1. Description morphologique

Le pistachier de l'Atlas, connu sous le nom vernaculaire de « Betoum » ou « Botma » au singulier en langue arabe [34] ou encore « Tismelal » en langue berbère [35]. Cet arbre est également appelé pistache sauvage ou faux pistachier [35, 36]. C'est une espèce ligneuse et spontanée, pouvant atteindre 20m de hauteur dans les conditions favorables [35], à tronc bien individualisé et à frondaison hémisphérique, le port est arrondi et à ramifications étalées [6, 8]. Ses feuilles composées sont constituées de sept à neuf folioles, les fleurs sont en grappes lâches, les fruits, gros comme un pois, sont des drupes [36].

### I.4.2. Systématique

La classification botanique du pistachier de l'Atlas est synthétisée dans le Tableau 02 [9, 2]

**Tableau 02** : Classification botanique du *Pistacia atlantica* Desf. [34].

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Super-division	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia atlantica</i>

### I.4.3. Galle

#### I.4.3.1. Généralités

Il existe plusieurs définitions de galle (ou cécidie), plus ou moins restrictives, parmi elles, on cite la définition proposée par Dauphin (2012) [37]: « toutes les manifestations de croissance, qu'elles soient positives ou négatives, et de différenciation anormale, provoquées sur une plante par des parasites animaux ou végétaux » ou encore plus récemment la définition mentionnée par Dauphin (2012) [37]: « Une galle est une déformation structurée d'une plante provoquée par un parasite ». La déformation s'accompagne presque toujours d'une hypertrophie des tissus végétaux ; cependant, il y a des cas où il n'y a pas ou très peu

d'hypertrophie mais seulement une déformation caractéristique (exemple les plis des feuilles de chênes dus aux *Macrodiplosis*).

#### **I.4.3.2. Utilisation des galles**

En cours des années et dans différentes populations, les galles ont été employées dans plusieurs domaines principalement dans la médecine traditionnelle. En Inde, les galles (exemple : *Rhus chinensis*, *Quercus infectori*, *Galla chinensis*, *Pistacia chinensis ssp. Integerrima...*) sont utilisés comme remède dans le traitement de la toux, la phtisie, l'asthme, la diarrhée, dysenterie, fièvre, vomissement, perte d'appétit, le saignement du nez, les piqûres de serpents, les piqûres de scorpion ou encore comme tonique et expectorant [38]. Ils sont également mélangés avec d'autres herbes comme remède potable par les femmes après l'accouchement pour restaurer l'élasticité de la paroi utérine en Malaisie.

#### **I.4.3.3. Etude antérieur**

Bien que les galles ont été découvertes depuis l'Antiquité et utilisés comme remède dans plusieurs régions. La recherche approfondie de sa composition phyto-chimique et l'étude d'éventuelles activités biologiques ont récemment débuté. L'étude s'est plus centrée sur l'analyse des huiles essentielles et certaines activités biologiques, parmi les recherches : en Inde, on citera le travail de Kaur et al. (2007)[39] sur l'activité antioxydant des extraits éthanolique des galles de *Quercus infectoria* et leur effet inhibiteur contre les altérations fonctionnelles induites par le stress oxydatif dans les macrophages murins. En Algérie, on évoquera deux travaux, le premier réalisé par Gourine et al. (2011)[40] sur l'évaluation de composition chimique de l'huile essentielle des galles non mûres de *Pistacia atlantica Desf.* Dans la région de Laghouat. Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des galles mâles et femelles ont donné 0,53% et 0,46% v / w, respectivement. Ils ont été analysés par GC et GC-MS, montrant l'apparition chez les galles femelles le composé  $\Delta^3$ -carène à une teneur de 75,34%, par contre chez les galles mâles, deux composants majoritaires  $\alpha$ -pinène (59.01%) et  $\beta$ -pinène (13.26%). Le second effectué par Sifi et al. (2015)[41] concernant l'évaluation de l'activité antimycobactérienne contre trois espèces de mycobactéries : *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* et *Mycobacterium fortuitum*, l'activité antioxydant à l'aide (DPPH et ABTS) et la cytotoxicité déterminée par le test de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) sur des cellules de rein de singe (Vero) et des cellules de carcinome hépatocellulaire humain (C3A) de l'huile essentielle des galles de *Pistacia atlantica Desf.* Les résultats obtenus confirment leur potentiel.

## *Matériel et Méthodes*

## II. Matériel et Méthodes.

### II.1. Matériel végétal

Les galles femelles des arbres du *Pistacia atlantica* (Figure n°9) ont été collectées en 2010 du mois de Septembre au sud de la wilaya de Laghouat. Le matériel végétal a été nettoyé, étalé sur papier, laissé à température dans une pièce aérée à l'abri de la lumière pendant une semaine ou plus et protégé de l'humidité. Une fois séché, les galles ont été broyées, tamisées et conservées dans des sacs en papier jusqu'à leurs utilisations.



**Figure n°9 :** Galles femelles de *P. atlantica* dans la région de Laghouat.

#### II.1.1. Protocole utilisé pour l'extraction

Pour isoler les matières naturelles nous avons utilisé des solvants organiques, si la matière que nous voulons séparer est liquide nous appliquons la méthode liquide-liquide ; si la matière est solide nous appliquons l'extraction solide-liquide [42].

Dans notre travail nous avons utilisé l'extraction par bain ultrason, cette technique est maintenant bien connue pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés industriels.



**Figure n°10:** Extraction par ultrason (photo originale)

En effet, la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide [42].

## **II.2. Optimisation des conditions d'extraction**

### **II.2.1. Etude préliminaire**

Avant de procéder à l'optimisation, une étude préliminaire a été réalisée afin de pouvoir sélectionner les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques totaux (CPT).

Cette étape a été faite en fixant tous les paramètres et n'en faire varier qu'un seul. L'effet de chaque paramètre est évalué par la détermination de la teneur CPT. Les résultats obtenus sont utilisés dans le but d'optimiser les conditions d'extraction à l'aide de la méthodologie de la surface de réponse.

### **II.2.2. Analyse préliminaire**

L'objectif de l'étude préliminaire des conditions d'extraction a été de sélectionner à partir d'un intervalle de chaque facteur, la valeur qui permet de donner le maximum de rendement des composés phénoliques totaux, en variant l'un des trois paramètres étudiés et fixant les deux autres et ainsi de suite. L'étude préliminaire a été répétée trois fois.

#### **II.2.2.1. Le temps d'extraction**

2g de poudre de galles du *P. atlantica* été mélangée avec 100 ml de méthanol pure et placée dans un appareil ultrasonique (JoidentUltrasonic- Cleaner, METO 5, Ningbo, Chine) avec un temps d'extraction qui varie entre (5 min à 60 min). L'extrait a été filtré et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur 45°C.

#### **II.2.2.2. Le volume du solvant**

L'extraction a été effectuée en plusieurs séries de volume de méthanol dans un intervalle (10-100 ml). Tandis que le temps et la masse sont fixés à 25 min et 2g, respectivement. Les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C.

#### **II.2.2.3. La masse de l'extraction**

A un temps de 25 min et un volume de méthanol de 60 ml, les échantillons ont été extraits avec des masses qui varient de 0.25 à 1.75g. Tous les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C.

## **II.3. Dosage des composées phénoliques totales (CPT)**

### **II.3.1. Dosage des CPT**

Ce dosage permet d'avoir une estimation sur la teneur en polyphénols totaux de l'échantillon. Le dosage des CPT a été effectué par la méthode adaptée de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### **II.3.1.1. La courbe standard d'acide Gallique**

Le dosage est réalisé en utilisant le réactif de Folin. Le réactif est formé d'acide phosphomolybdique  $H_3PMo_{12}O_4$  et d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  qui est réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène  $W_8O_{23}$  et de molybdène  $Mo_8O_3$ . Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 1 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.01 jusqu'à 0.1 mg/ml, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans de l'eau distillée est ajouté puis immédiatement ajouté 0.8ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  (3%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière.

L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique [43].

### **II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)**

Flavonoïde totale a été déterminé en utilisant la méthode de Vongsak [44]. Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Mettre 1ml d'extrait dans un tube à essai ; Ajouter 1 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2 %, laisser incuber 15min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 430 nm.

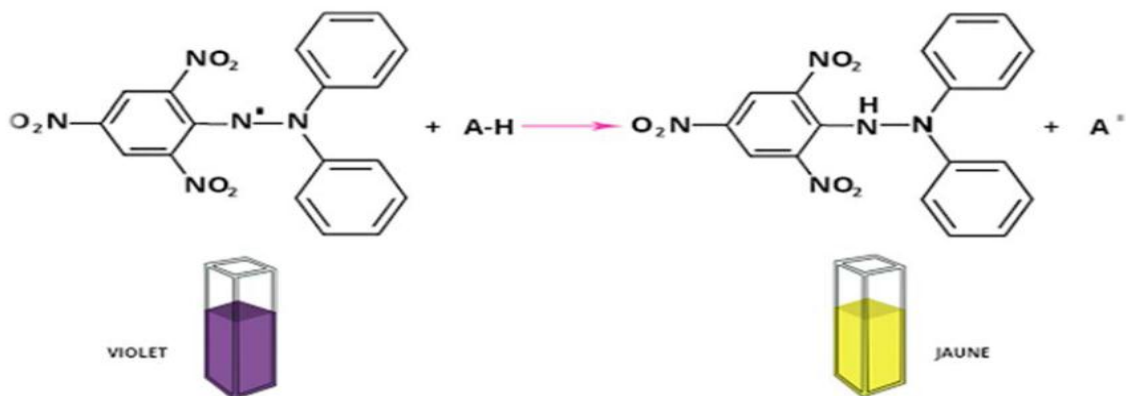
Nous effectuons la même opération pour la quercetine à différentes concentrations en introduisant 1ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d' $AlCl_3$  à 2%.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits sont calculées en l'équation de la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercetine comme standard.

### **II.3.3. Test DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ - picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité

antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur mauve bien caractéristique de la solution de DPPH<sup>•</sup>. L'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à 517nm. Le piégeage des radicaux libres par les composés phénoliques, se fait par le transfert de l'atome H sur le DPPH<sup>•</sup> alors transformé en une molécule stable DPPH-H [45].



**Figure n°11** : Réaction d'une structure polyphenolique avec le radicale DPPH

### II.3.3.1. Mode opératoire

1ml de solution méthanolique de DPPH (125µM) a été mélangé avec 1 ml de chaque extrait. La préparation a été mélangée à l'aide d'un vortex et laissée pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La diminution de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm. La capacité antioxydante a été exprimée en mg d'équivalents d'acide ascorbique (vitamine C) par g matière sèche (CAEAA). L'expérience a été répétée 3 fois pour calculer la moyenne. Le calcul de CAEAA a été réalisé en utilisant l'équation suivante :

$$CAEAA = \frac{(Abs_C - Abs_E)}{\alpha} \times D \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{Q_E}$$

**Abs<sub>C</sub>** : Absorbance du contrôle (sans l'ajout de l'extrait) ;

**Abs<sub>E</sub>** : Absorbance en présence de l'extrait (DPPH restant après la réaction avec l'extrait) ;

**A** : La pente de la courbe d'étalonnage De l'acide ascorbique (vitamine C) ;

**D** : Nombre de dilution de l'extrait ;

**V** : Le volume total de l'extrait (10ml) ;

**Q<sub>E</sub>** : La quantité de l'échantillon utilisé en g (1g).

## **II.4. Conception expérimental**

Les plans d'expérience permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent des recherches scientifiques ou des études industrielles, et d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Box-Behnken Design (BBD) est un modèle du seconde degré a plusieurs variables. Il est facile à mettre en œuvre et possède la propriété de séquent alité. On peut entreprendre l'étude des  $k$  premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués [23]. Ses principales caractéristiques sont [21] :

- Nécessite un nombre d'expérience  $N = 2k(k-1) + C_p \dots (1)$ , ou  $k$  est le nombre de facteur et  $C_p$  est le nombre de point centraux.
- Tous les niveaux de facteurs doivent être seulement à trois niveaux (-1, 0, +1) avec des intervalles réguliers.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes appliqués à la réalisation d'un plan de Box-Behnken de trois niveaux pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes : le temps, le volume et la masse. L'étude préliminaire qu'on a effectuée, nous a permis de déterminer les niveaux bas et hauts pour les variables influençant sur les expérimentations qui sont illustrées dans le tableau (03).

### **II.4.1. Matrice d'expériences**

Le modelé expérimental est basé sur le plan Box-Behnken pour 3 facteurs temps ( $X_1$ ), le volume de solvant ( $X_2$ ) et la masse ( $X_3$ ) et à trois niveaux (-1, 0 et 1) dont les résultats permettent de construire une surface de réponse. Le plan expérimental est constitué de 45 essais répartis en 15 points factoriels dont 3 répétitions au centre afin de déterminer l'erreur pure (tableau 04).

Sur la base des données expérimentales, un modèle polynomial de second ordre correspondant au modèle Box-Behnken a été appliqué pour corrélérer la relation entre les variables indépendantes et la réponse pour prédire les conditions optimisées. Le modèle quadratique a été construit selon l'équation suivante [21]:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \dots \dots \dots \text{Eq.(05)}$$

Y : représente la réponse ;

$b_0$  : représente la valeur moyenne théorique de la réponse (interception) ;

$b_1b_2b_3$  : sont les coefficients des termes linéaire ;

$b_{11}b_{22}b_{33}$  : sont les coefficients des termes quadratiques ;

$b_{12}b_{13}b_{23}$  : sont les coefficients des termes d'interaction.

### II.5. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux de l'analyse préliminaire à un seul facteur ont été évalués par le logiciel Excel 2013. Toutes les données ont été répétées trois fois afin de calculer la moyenne. Le logiciel Matlab (Version 10. SAS, USA) a été utilisé pour déterminer les coefficients des polynômes pour chaque réponse. L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour la vérification de la signification des coefficients du modèle ( $p < 0,05$ ). Le test F et la valeur-p ont été utilisés pour vérifier l'importance du coefficient de régression. L'adéquation du modèle a été déterminée en évaluant le manque d'ajustement.

## *Résultats et discussion*

### III. Résultats et discussion

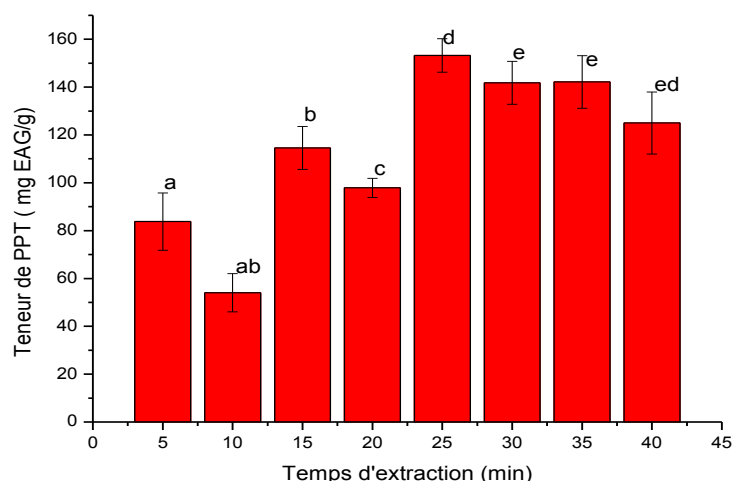
#### III.1. Extraction des composés phénoliques par ultrason

L'extraction est l'une des étapes cruciales pour la recherche et l'étude des métabolites secondaires des plantes. En général, l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques est influencée par de multiples paramètres. Il fallait donc, étudier les paramètres d'extraction afin de déterminer les meilleures conditions qui permettent d'avoir les meilleurs rendements.

Une étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer les gammes expérimentales appropriées à prendre en compte lors du processus d'optimisation. Dans cette étude, l'effet de plusieurs paramètres d'extraction influent ; la masse, le temps et le volume de solvant, ont été systématiquement étudiés séparément pour obtenir le rendement en CPT maximal. La procédure d'optimisation est initiée par des études préliminaires afin de choisir les conditions appropriées pour l'extraction. Cependant, celles-ci ne peut pas être généralisées à tous les phytomicronutriments existants dans les différentes matrices végétales [46].

##### III.1.1. L'effet de différents temps d'extraction

Le temps d'extraction est un autre paramètre principal dans la procédure d'extraction des composés phénoliques, il peut varier de quelques minutes à 24 heures [47]. Les résultats de l'effet du temps sur l'extraction des composés phénoliques des extraits des galls du *P. atlantica* sont présentés dans la figure n°12. Le temps d'extraction a été varié de 5 à 40 min. Tandis que les autres conditions d'extraction ont été fixées comme suivantes : la masse (2g) et le volume de méthanol 100 ml



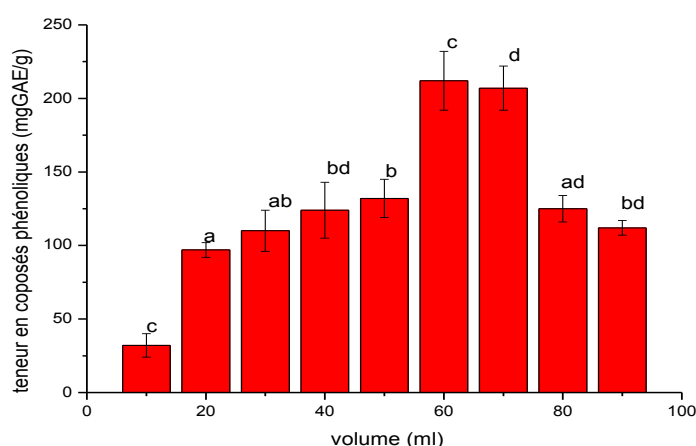
**Figure n°12** : Effet de différents temps d'extraction sur les CPT.\*Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ( $p < 0,05$ )

La teneur des composés phénoliques des galls de *Pistacia atlantica* atteint une valeur maximale de  $153 \pm 7$  mg EAG /g de matière sèche (MS) à un temps d'extraction de 25 min. De 25 min à 30 min, les teneurs des CPT n'augmentent plus, ce qui veut dire que le temps d'extraction prolongé n'est pas utile pour extraire plus de composés phénoliques. Une augmentation du temps d'extraction de 35 min est accompagnée d'une diminution en composés phénoliques ( $124 \pm 13$  mg EAG /g MS). En effet, plusieurs chercheurs ont attiré l'attention à la possibilité de l'oxydation de ces composés si le temps d'extraction est long [4]. Cependant une exposition prolongée des rayonnements électromagnétiques pendant le processus d'extraction à l'ultrason peut mener à la dégradation thermique des constituants bioactifs [48]. Le temps d'irradiation a considérablement influencé le rendement des composés phénoliques ( $P < 0,05$ ) avec 25 et 35 min comme meilleures valeurs. D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'intervalle optimal concernant le temps d'extraction est défini entre 20-30 min.

La durée de mise en contact de l'échantillon avec le solvant apparaît comme un paramètre qui influence l'extraction des composés phénoliques. Selon Spigno et al., (2006)[49], le taux d'extraction peut être amélioré en augmentant le temps de contact entre le solvant et le matériel végétal.

### III.1.2. L'Effet de volume de solvant

Le volume influence d'une manière significative sur l'extraction des composés phénoliques [50].

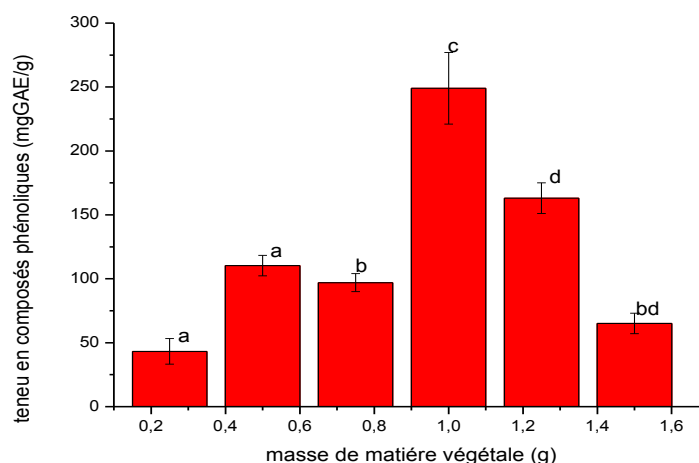


**Figure n°13** : Effet volume sur l'extraction des CPT.\*Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ( $p < 0,05$ ).

Conventionnellement, un meilleur volume de solvant augmente la récupération des composés phénoliques, cela est lié au potentiel d'échange entre le solide et le liquide. Dans la présente étude, le rapport a été augmenté en gardant constant le poids solide (2g), le volume du solvant doit être suffisant pour s'assurer que l'ensemble de l'échantillon est immergé, en particulier lorsqu'il s'agit d'un échantillon qui gonflera pendant le processus d'extraction. L'effet du solvant sur l'extraction des CPT des galles du *P. atlantica* a été évalué dans un intervalle (10-100 ml) avec un temps d'extraction de 25 min, (figure n° 13). Les résultats décrits ci-dessus révèlent une influence significative du volume de méthanol sur les CPT. Les résultats de l'étude statistique montrent une différence significative entre les teneurs extraites par ces ratios qui varient de  $31 \pm 8$  à  $212 \pm 22$  mg EAG/g de MS. En augmentant le volume de méthanol de 10 à 60, on obtient un meilleur rendement d'extraction qui passe de  $31 \pm 8$  mg EAG/g de poudre à  $212 \pm 22$  mg EAG/g de poudre respectivement, au-delà de ce volume les taux en composés phénoliques diminuent. Ce résultat est similaire avec les études réalisées par Tabarak et Nateghi (2011) [51] sur le son du riz, Prasad et al. (2011) [52] sur l'écorce du fruit *Mangifera pajang* Kosterm et Jennan et al. (2014) [53] sur *T. hyemalis*. Ce qui est probablement dû à la solubilité accrue des composés phénoliques [53]. Or, une augmentation supplémentaire de 20 ml a entraîné une diminution de la teneur en composés phénoliques. Suite aux résultats obtenus, le volume de solvant 50-70 ml a été considéré comme intervalle optimal, tandis que le volume 60 ml a été utilisé pour les prochains essais à un seul facteur.

### III.1.3. Effet de différentes masses d'extraction

La masse de matière végétale est un facteur influençant sur l'extraction de CPT, c'est pour ça qu'on a procédé à différentes extractions avec différentes masses. L'influence de la masse de matière végétale sur le rendement en composés phénoliques totaux des extraits étudiés est illustrée dans la figure n° 14. L'effet de la masse sur l'extraction des CPT des galles du *P. atlantica* a été évalué à l'aide de six rapports (0.25:60, 0.5:60, 0.75:60, 1:60, 1.25:60, et 1.50 : 60 g/ml) sur une période d'extraction de 25 min, (figure n° 14). L'analyse statistique révèle une différence significative à  $p < 0,05$  entre les différentes masses. La masse de 1 g de la matière végétale a donné un meilleur rendement en CPT avec un taux de  $245 \pm 35$  mg EAG/g de MS, suivie par 1.25 g avec une teneur de  $162 \pm 15$  mg EAG/g MS, alors que 0.25 g a donné le taux le plus bas de  $45 \pm 8$  mg EAG/g de MS. De 1.25 à 1.75 g, les teneurs des CPT n'augmentent plus, ce qui veut dire que l'augmentation de la matière végétale n'est pas utile pour extraire plus de composés phénoliques. Une augmentation de la masse d'extraction de 1.75 g est accompagnée d'une diminution en CPT ( $124 \pm 13$  mg EAG /g MS).



**Figure n°14** : Effet de différentes masses sur CPT.\*Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ( $p < 0,05$ )

Ces résultats sont compatibles avec la deuxième loi de diffusion de Fick, il y a un équilibre final entre les concentrations de soluté dans la matrice solide et le solvant après une durée particulière [19]. Des résultats similaires sur l'effet de la masse sur l'extraction des composés phénoliques ont été rapportés pour les noyaux de dattes par [54] qui sont 1g de poudre de noyaux de dattes dans 60ml de solvant. D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'intervalle optimal concernant la masse est défini entre 0.75-1.25g

### III.2. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénolique totaux

Basées sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante (temps d'extraction, le volume et la masse de la matière végétale) influençant sur l'extraction des CPT à partir de la poudre des galles du *P. atlantica* ont été choisies. Les trois facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$ , et  $X_3$ ) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction des composés sont consignés dans le tableau 03:

**Tableau 03**: Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des galles du *Pistacia atlantica*.

Variables		Niveaux		
		-1	0	1
Temps (min)	$X_1$	20	25	30
Volume de solvant (ml)	$X_2$	50	60	70
Masse (g)	$X_3$	0.75	1	1.25

### III.2.1. Plan d'expérience Box-Behnken

Les données expérimentales obtenues à partir des 15 essais illustrées dans le tableau 04 ont été analysées aléatoirement à l'aide d'un plan d'expérience BBD. Les réponses mesurées sont comparées à celle prédites, afin de mesurer la validité du modèle choisi. Les résultats ont montré que la teneur en CPT varie entre 76,75 et 314,59 mg EAG/ g de matière sèche (tableau 04), ceux-ci ne font que confirmer que les facteurs (temps, volume et masse) ont une influence sur l'extraction de CPT.

**Tableau 04:** la matrice expérimentale de Box-Behnken pour trois facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ) et leurs réponses CPT, FVT et DPPH, exprimé en (mg/g matière sèche).

Expérimental	Facteurs			Réponse		
	$X_1$ (min)	$X_2$ (ml)	$X_3$ (g)	CPT	FVT	DPPH
1	0	0	0	208,64	3,8	2261,04
2	-1	0	1	145.29	2.92	1704.08
3	1	-1	0	314.59	4.93	2273.89
4	0	-1	-1	170.09	4.58	3011.30
5	-1	-1	0	120.00	4.04	2063.38
6	1	0	1	110.70	3.48	1584.78
7	0	1	-1	149.90	6.03	347.21
8	0	0	0	136.21	3.45	2371.53
9	1	1	0	87.56	4.01	2135.14
10	1	0	-1	221.98	3.51	3295.64
11	-1	1	0	76,75	3.32	2515.41
12	0	-1	1	107.24	4.55	1952.72
13	-1	0	-1	123.96	2.98	3288.79
14	0	1	1	81.29	5.44	2069.88
15	0	0	0	237.83	4.1	2263.61

### III.2.2. Validation du modèle

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influencent, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

### III.2.3. Le coefficient de détermination ( $R^2$ )

Dans la présente étude, le coefficient de détermination ( $R^2$ ) du modèle est égale à 0,97 (tableau 5), ce qui signifie qu'uniquement 3% des variations ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajustée est de l'ordre de ( $R^2$  ajusté =0.92), ce qui est assez élevé pour confirmer la haute significativité du modèle, sachant que le  $R^2$  représente la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) après élimination des termes(coefficient) inutiles du modèle. Un modèle contenant beaucoup de termes inutiles (non significatifs) auront une valeur de  $R^2$  ajusté très inférieur à celle du  $R^2$ [55].

**Tableau05:** L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre.

Régression	$R^2$	$R^2$ (ajusté)	Rapport F du modèle	Prob.>F	Défaut d'ajustement (Rapport F)	Défaut d'ajust. (Prob.>F)
Y <sub>CPT</sub>	0.97	0.92	205.91	<0.0001*	0.77	0.52
Y <sub>Flavonoïde</sub>	0.89	0.82	108.40	0.0104*	14.14	0.76
Y <sub>DPPH</sub>	0.91	0.88	45.23	0.008*	12.56	0.84

La valeur-p a été utilisée pour vérifier la signification de chaque coefficient, elle est inférieure

### III.2.3. Modèle global et manque d'ajustement

L'analyse de la variance de la régression du modèle (Tableau 05), montre que le modèle est très significatif ( $P < 0,005$ ), et que le défaut d'ajustement n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme la validation du modèle ( $p > 0,05$ ). Dans un modèle, si la P-value du défaut d'ajustement est significative, ce modèle sera rejeté [56].

### III.2.4. Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables ( $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ) à  $p < 0,05$ , afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (temps, volume et masse) sur l'extraction des CPT[57].

Les p-values sont utilisées comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les plus petites p-values présentent la plus grande signification du facteur correspondant [57]. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 06

**Tableau 06:** Coefficients de régression et leurs significations statistiques.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
CPT				
Constant				
$b_0$	208.94	31.08	6.25	< 0.00015*
Linéaire				
$b_1$	33.60	19.033	1.77	0,0075*
$b_2$	-39.54	19.033	-2.08	0.0031*
$b_3$	-27.67	19.033	-1.45	<0.0698
Interaction				
$b_{12}$	-45.94	26.91	-1.71	0.0079*
$b_{13}$	-33.15	26.91	-1.23	0.027*
$b_{23}$	-1.44	26.91	-0.05	0.0954
Quadratique				
$b_{11}$	-10.57	28.01	-0.38	0.00271*
$b_{22}$	-33.92	28.01	-1.21	<0.0001*
$b_{33}$	-33.17	28.01	-1.18	0,0886

Significatif avec  $p < 0.05$ .

### III.2.5. Analyse du modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est passubordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égale à deux) [58]. D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des CPT à partir des galles du *P. atlantica* sont alors bien connues. Le modèle mathématique du BBD de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$\text{CPT} = 194.23 + 33.60 X_1 - 39.54 X_2 - 27.67 X_3 - 45.94 X_1 X_2 - 33.15 X_1 X_3 - 1.44 X_2 X_3 - 10.57 X_1^2 - 33.39 X_2^2 - 33.17 X_3^2 \quad (\text{Eq.}(06))$$

#### III.2.5.1. Effet linéaire

Les résultats de la présente étude, montre que le facteur qui possède une influence hautement significative sur l'extraction des CPT de la matière sèche des galles du *P. atlantica* est le temps d'extraction ( $X_1$ ) et le volume ( $X_2$ ) avec une probabilité de  $p = 0,0075$ ; et  $0,0032$  respectivement, cependant l'impact est non significatif pour le facteur ( $X_3$ ) à savoir la masse.

#### III.2.5.2. Effet quadratique

L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par le facteur de volume ( $X_2 X_2$ ) avec  $p < 0,0001$ , il est suivi par l'effet quadratique de temps d'extraction ( $X_1 X_1$ ) avec  $p = 0,00218$ , contrairement à l'effet quadratique de la masse ( $X_3 X_3$ ) qui est non significatif avec  $p = 0,1855$ .

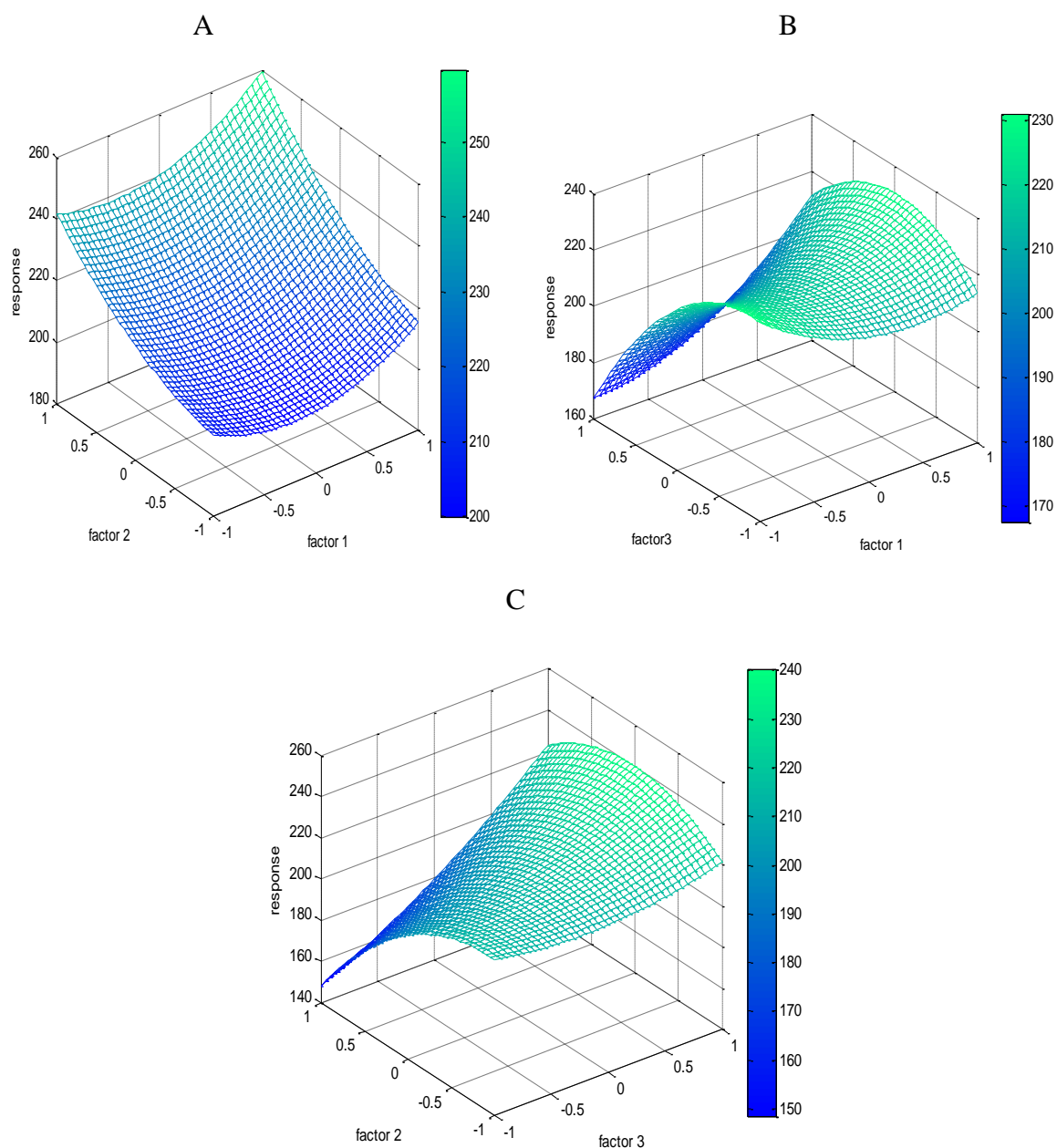
### **III.2.6. Analyse des surfaces de réponse**

#### **III.2.6.1. Temps -volume**

Le couple temps-volume ( $X_1X_2$ ) influence d'une manière significative et joue un rôle important dans l'extraction des CPT avec  $p=0,0079$ . Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le temps d'extraction, le volume et le taux d'extraction des CPT sont représentés dans la figure n°15A. Si on augmente le temps d'extraction et le volume et on fixe la masse à 1g simultanément, la teneur en composés phénoliques augmente de 180 à 260 mg EAG/g donc le temps d'extraction et le volume augmentent proportionnellement avec le taux d'extraction des CPT. D'après les résultats trouvés par [4], le temps d'extraction, s'il combiné au bon type de solvant, influence considérablement sur l'extraction des CPT, ce qui nous permet de dire que la prolongation du temps d'extraction accroît d'une manière significative le pouvoir d'extraction.

#### **III.2.6.2. Temps-masse**

Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le temps d'extraction, le volume ( $X_1X_3$ ) et le taux d'extraction des CPT sont représentés dans la figure n°15B. Les résultats obtenus montrent que le couple temps d'extraction et la masse ( $X_1X_3$ ) présente un effet significatif avec  $p=0,027$ . Une diminution de la teneur en composés phénoliques a été observée avec l'augmentation du temps d'extraction de 25-30 min et la masse de la matière sèche de 1-1.25g, mais la tendance a été renversée lorsque le rapport a atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 20-25 min et la masse de 0.75-1 g une augmentation remarquable de la quantité de composé extrait est constatée ce qui est démontré dans l'étude préliminaire lors de l'étude de la cinétique d'extraction sous l'effet d'irradiation ultrasonique. Une longue exposition aux radiations ultrasonique entraîne une dégradation de certains constituants thermolabiles [59].



**Figure n° 15:** Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur le rendement des composés phénolique des galles du *P. atlantica*

### III.2.6.3. Volume-masse

Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le volume, la masse de matière sèche et le taux d'extraction des composés phénoliques sont représentés dans la figure n°15C. Les résultats obtenus montrent que le couple la masse et le volume ( $X_2X_3$ ) présente un effet non significatif avec  $p=0,0954$ .EAG/g. Une diminution de la teneur en composés phénoliques a été observée avec l'augmentation le volume de 60-70 ml et la masse de matière sèche environ de 1-1.25 g. La stabilité de la teneur en CPT a été observée dans tout le domaine de la variation du facteur volume, lorsqu'il atteint une certaine valeur (volume de 50-60 ml). Ces

résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus élevé [54].

### III.2.7. Paramètres optimaux

Cette étude montre qu'un modèle polynomiale d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales qui conduisent à une maximisation de l'extraction des CPT sont obtenues au sein du domaine expérimental. Les conditions d'extraction optimale identifiées par l'utilisation du logiciel Matlab sont représentées dans le tableau 07.

**Tableau 07** : Conditions optimales d'extraction des composés phénoliques par ultrason (mg EAG/g MS).

Temps d'extraction (min)	(Volume) (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg GAE/g MS)
28	65	1.22	415.33

## III.3. Optimisation des conditions d'extraction des composés flavonoidiques

### III.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la quercétine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,91$  (Annexe1). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme de la matière sèche (mgEQ/gMS). Les résultats de la présente étude, montrent que les teneurs en composés flavonoidiques varient de 2.42 à 6.03mg EQ/g de MS (Tableau4). Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, volume et masse) sur le taux des flavonoïdes.

### III.3.2. Coefficient de corrélation

L'analyse statistique a montré que le coefficient de corrélation  $R^2$  et celui d'ajustement sont de 0,89 et 0.80 respectivement qui sont proches de 1 et un manque d'ajustement du modèle qui est in significative à  $p < 0,05$ , indiquant que le modèle pourrait être utilisé pour prédire les résultats obtenus en terme de flavonoidiques par cette technique d'extraction assistée par ultrason (Tableau 05).

### III.3.3. Effet des facteurs (coefficients)

Les résultats du calcul des coefficients de régression estimés du modèle polynomial sont représentés dans le tableau 08.

**Tableau 08** : Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
FVT				
Constante				
$b_0$	3.79	0.449987	8.42	< 0.0004*
Linéaire				
$b_1$	0.27	0.27556	1.02	0,0356*
$b_2$	0.004	0.27556	0.01	0.0098*
$b_3$	-0.089	0.27556	-0.032	<0.0759
Interaction				
$b_{12}$	-0.0157	0.389701	-0.04	0.0098*
$b_{13}$	0.0075	0.389701	0.02	0.0073*
$b_{23}$	-0.14	0.389701	-0.36	0.0759
Quadratique				
$b_{11}$	-0.90	0.405613	-2.23	0.0053*
$b_{22}$	1.023	0.405613	2.52	<0.0044*
$b_{33}$	0.3375	0.405613	0.53	0,0791

Significatif avec  $p < 0.05$ .

### III.3.4. Analyse du modèle mathématique

D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des composés flavonoidiques à partir des galles du *P.atlantica* sont alors bien connues. Le modèle mathématique du BBD de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$FVT = 3.79 + 0.27 X_1 + 0.004 X_2 - 0.089 X_3 - 0.0157 X_1 X_2 + 0.0075 X_1 X_3 - 0.14 X_2 X_3 - 0.90 X_1^2 + 1.023 X_2^2 + 0.3375 X_3^2 \quad (\text{Eq.(07)})$$

#### III.3.4.1. Effet linéaire

D'après les résultats de la présente étude, il existe deux facteurs qui possèdent une influence significative positive sur l'extraction des composés flavonoidiques des galles du *Pistacia atlantica* qui sont : le temps d'extraction ( $X_1$ ) avec un  $p = 0,0356$  suivi par le volume qui a un  $p = 0,0098$ .

#### III.3.4.2. Effet quadratique

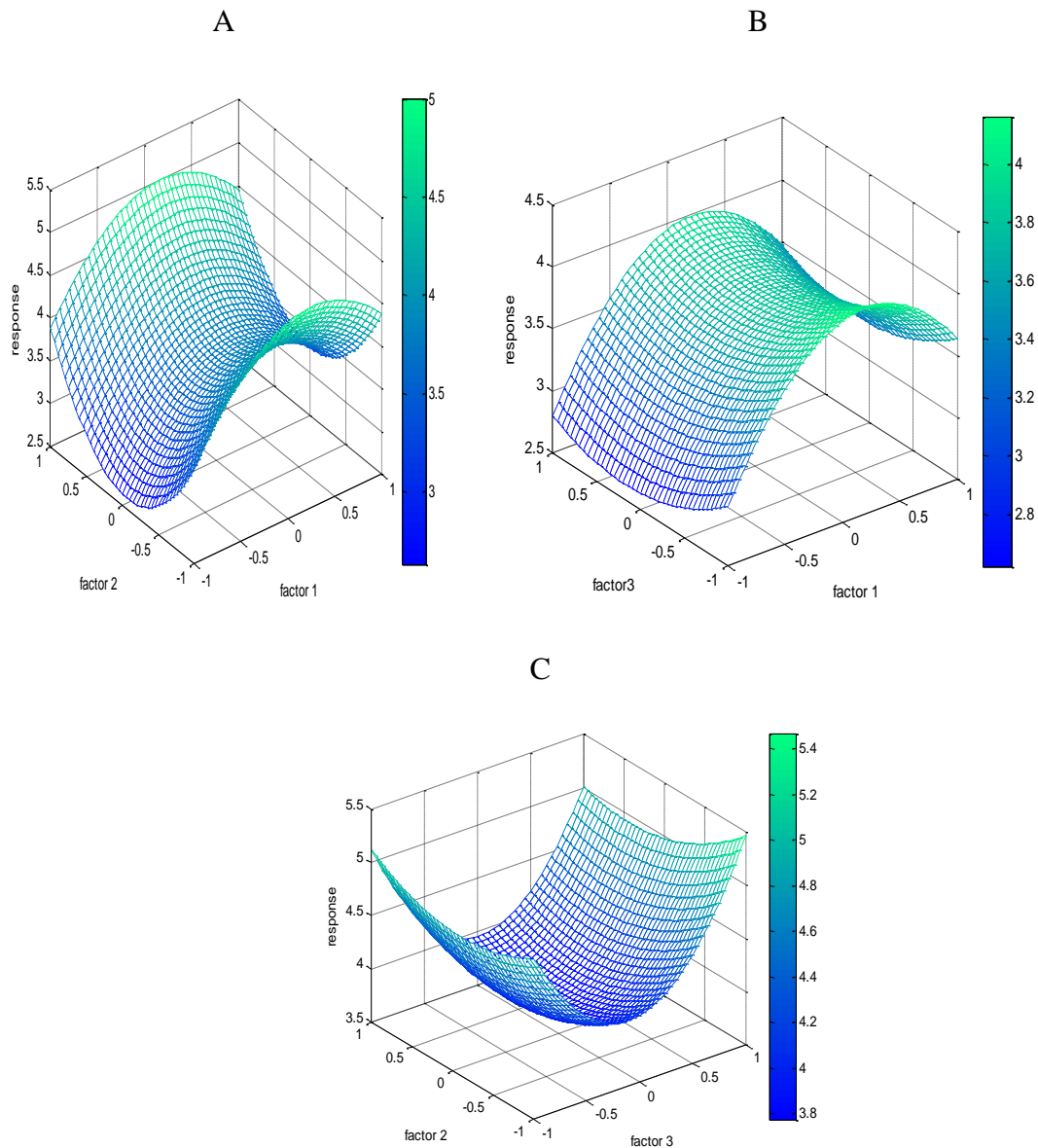
L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par le facteur de volume ( $X_2 X_2$ ) avec  $p = 0,0044$ , il est suivi par l'effet quadratique du temps d'extraction ( $X_1 X_1$ ) avec  $p = 0,0053$ , contrairement à l'effet quadratique de la masse ( $X_3 X_3$ ) qui est non significatif avec  $p = 0,0791$ .

### III.3.5. Analyse des surfaces de réponse

#### III.3.5.1. Temps -volume

Le temps d'extraction-volume de solvant ( $X_1 X_2$ ) influence d'une manière significative et joue un rôle important dans l'extraction des composés flavonoidiques avec  $p = 0,0098$ . Les résultats

obtenus de l'étude d'interaction entre le temps d'extraction, le volume d'extraction et le taux d'extraction des composés flavonoïdiques sont représentés dans la figure n° 16A.



**Figure n°16:** Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur le rendement des composés flavonoïdiques des galls du *P. atlantica*

Une augmentation de la teneur en composés flavonoïdiques a été observée avec l'augmentation de temps d'extraction 20-25 min et le volume environ de 50-60 ml. Cependant une longue durée d'extraction avec l'augmentation de volume donne une teneur faible. Cela est dû probablement à la dégradation des composés flavonoïdiques par les ondes électromagnétiques. Ce qui explique la valeur maximale de 5.0 mg EQ/g à un temps de 25 min et un volume de 60 ml, mais si on poursuit l'extraction avec des niveaux très élevés pour

chaque paramètre, la valeur en composés flavonoidiques diminue de 5.0 à 3.8 mgEQ/g (figure 16A).

### **III.3.5.2. Temps –masse**

Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le temps d'extraction, la masse et le taux d'extraction des composés flavonoidiques sont représentés dans la figure 16B. Les résultats obtenus montrent que le temps d'extraction, et la masse ( $X_1X_3$ ) présente un effet significatif avec  $P=0,0073$ . Une augmentation de la teneur en composés flavonoidiques a été observée avec l'augmentation de temps d'extraction de 20-25 min et la masse de 0.75-1 g, mais la tendance a été renversée lorsque le rapport a atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 25-30 min et une masse de 1-1.25 g une diminution remarquable de la quantité de composé extrait est constatée. Cela est due probablement à la dégradation des composés phénoliques par les ondes électromagnétiques émet par l'ultrason.

### **III.3.5.3. Volume-masse**

La figure 16C montre la surface de réponse qui présente l'effet de volume et la masse ( $X_2X_3$ ) sur l'extraction des composés flavonoidiques. Les résultats obtenus indiquent que l'interaction volume-masse est non significative avec la probabilité supérieure à 0,0759. Les résultats montrent que la teneur en composés flavonoidiques diminue lorsque la masse varie de 0.75 à 1 g et le volume de 50 à 60 g/ml. Si on augmente la masse de 1 à 1.25 g et on fixe le volume à 60 ml simultanément, la teneur en composé flavonoidiques augmente de 4.4 à 5.2 mg EQ/g. Cela peut s'expliquer par les effets multiplicateurs du traitement préalable et le potentiel en composés extractibles élevés. En pénétrant plus profondément dans la matrice solide, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi la libération des composés flavonoidiques. Le grand pouvoir d'imprégnation qui augmente considérablement la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire, faisant diminuer la résistance liée au transfert de matière interne.

### **III.3.6. Conditions optimales**

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux complets peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'extraction des composés flavonoidiques sont obtenues au niveau du domaine expérimental dans le tableau suivant

**Tableau 09** : Conditions optimales d'extraction des composés flavonoidiques par ultrason (mg EQ/g MS).

Temps d'extraction (min)	Volume (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg EQ/g MS)
<b>19</b>	42	1.18	09.45

### III.4. Test d'évaluation d'activité antioxydante

#### III.4.1. L'activité scavenger sur le radical DPPH

Le DPPH est un radical libre de couleur violette, il est réduit en un composé decouleur jaune en présence de composés antiradicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité [45]. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalon à différentes concentrations (Annexe 1). La capacité antioxydante a été exprimée en mg d'équivalents d'acide ascorbique (vitamine C) par g matière sèche (EAAC).

Les résultats montrent que tous les extraits présentent des activités antiradicalaires considérables variant de 347.21 à 3288.79 mg EAAC/g de MS (tableau 4). Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, volume et masse) sur l'activité antiradicalaire.

#### III.4.2. Coefficient de corrélation

L'analyse statistique a montré que le coefficient de corrélation  $R^2$  et celui d'ajustement sont de 0,91 et 0,88 respectivement qui sont proches de 1 et un manque d'ajustement du modèle qui est insignificatif à  $p < 0,05$ , indiquant que le modèle pourrait être utilisé pour prédire les résultats obtenus en terme de l'activité antioxydante (tableau 05).

##### III.4.2.1. Effet des facteurs (coefficients)

Les résultats du calcul des coefficients de régression estimés du modèle polynomial sont représentés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
DPPH				
Constante				
$b_0$	2298.72	74.33	30.30	< 0.0001*
Linéaire				
$b_1$	-35.25	45.52	-0.09	0,0324*
$b_2$	-279.19	45.52	4.04	0.0092
$b_3$	-328.94	45.52	-15.24	<0.0001*
Interaction				
$b_{12}$	-147.71	64.37	-1.56	0.0183*
$b_{13}$	-31.51	64.37	-2.11	0.0889
$b_{23}$	695.31	64.37	-1.23	0.0237
Quadratique				
$b_{11}$	285.61	67.00	-0.67	0.0378
$b_{22}$	-337.40	67.00	-0.10	0.0089*
$b_{33}$	-116.03	67.00	3.84	0,0521*

Significatif avec  $p < 0.05$ .

### III.4.3. Analyse du modèle mathématique

D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'activité antiradicalaire à partir des galles du *Pistacia atlantica* sont alors bien connues. Le modèle mathématique du BBD de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$\text{DPPH} = 2298.72 + (-35.25) X_1 + (-279.19) X_2 + (-328.94) X_3 - 147.71 X_1 X_2 - 31.51 X_1 X_3 + 695.31 X_2 X_3 - 285.61 X_1^2 - 337.40 X_2^2 - 116.03 X_3^2 \quad \text{(Eq. (08))}$$

#### III.4.3.1. Effet linéaire

D'après les résultats de la présente étude, il existe deux facteurs qui possèdent une influence significative négative sur l'activité antioxydante des galles du *Pistacia atlantica* qui sont : la masse ( $X_3$ ) qui a un  $P < 0.0001$ , volume de solvant ( $X_2$ ) avec un  $p = 0,0092$  suivi par le temps d'extraction qui a un  $p = 0,0324$ .

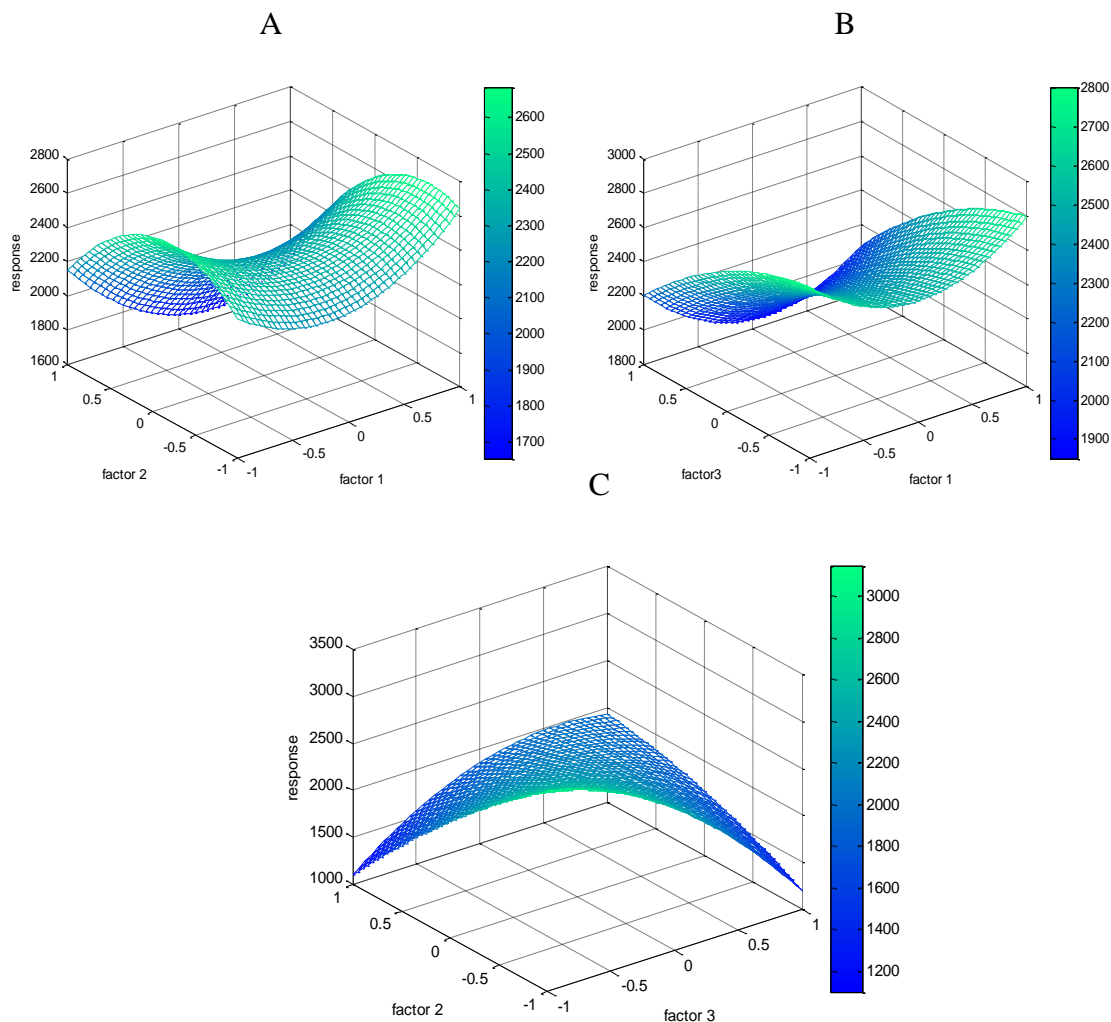
#### III.4.3.2. Effet quadratique

L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par le facteur de volume de méthanol ( $X_2 X_2$ ) avec  $p = 0,0089$ , il est suivi par l'effet quadratique du temps d'extraction ( $X_1 X_1$ ) avec  $p = 0,0378$ , contrairement à l'effet quadratique de la masse ( $X_3 X_3$ ) qui est non significatif avec  $p = 0,0572$ .

### III.4.4. Analyse des surfaces de réponse

#### III.4.4.1. Temps -volume

Le temps d'extraction-volume de solvant ( $X_1X_2$ ) influence d'une manière significative et joue un rôle important dans l'activité scavenger sur le radical DPPH avec  $p=0,0183$ . Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le volume, le temps d'extraction et l'activité antiradicalaire sont représentés dans la figure n°17A. Les résultats montrent l'activité scavenger sur le radical DPPH accroît lorsque le volume varie de 50 à 60 ml et le temps d'extraction de 20-25 min. Mais si on poursuit l'extraction avec des niveaux très élevés pour chaque paramètre, l'activité antioxydante diminue de 2400 à 2100 mg EAAC/g de MS.



**Figure 17:** Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur l'activité scavenger DPPH des galles du *P. atlantica*

### III.4.4.2. Temps –masse

La figure 17B montre la surface de réponse qui présente l'effet de temps d'extraction et la masse sur l'activité scavenger DPPH. Les résultats obtenus montrent que le temps d'extraction, et la masse ( $X_1X_3$ ) présente un effet insignifiant avec  $p=0,0889$ . Une diminution de l'activité antioxydante a été observée avec l'augmentation de temps d'extraction de 20-30 min et la masse de 0.75-1.25 g. Ce qui est compatible avec les résultats de figure 15B et 16B.

### III.4.4.3. Volume-masse

La figure n° 17C montre la surface de réponse qui présente l'effet de volume et la masse ( $X_2X_3$ ) sur l'activité antioxydante. Les résultats obtenus indiquent que l'interaction volume-masse est non significative avec la probabilité supérieure à 0,050. Une diminution remarquable de l'activité antiradicalaire a été constatée lorsque la masse varie de 0.75 à 1.25 g et le volume de 50 à 70 ml. Ce résultat est en accord avec les observations de figure 15C.

### III.4.5. Solution

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'activité antioxydante sont obtenues au sein du domaine expérimental.

**Tableau 11** : Conditions optimales de l'activité scavenger DPPH par ultrason (mg EAAC/g de MS).

Temps d'extraction (min)	Volume (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg EAAC/g de MS)
29	65	0.65	4806



## *Conclusion générale*

## IV. Conclusion

Ces dernières années, de nombreux chercheurs sont intéressés aux composés biologiquement actifs isolés d'extraits de plantes, qui sont considéré comme de véritables sources naturelles de substances dont il faut tirer le maximum de profit.

Les galles du *P. atlantica* est une source potentielle riche en CPT, a fin d'obtenir la performance maximale d'extraction nous avons utilisé l'ultrason.

L'extraction assistée par ultrasons a révélé être une technique très efficace pour l'extraction de composés phénoliques. Les extraits obtenus par cette technique contiennent des teneurs de composés phénoliques par rapport à la macération (extraction classique). En effet, L'extraction par ultrasons permet d'accroître le rendement d'extraction dans un temps courte, ce qui réduit l'apport d'énergie et de la dégradation de composés phénoliques. En outre, les extraits obtenus par ultrasons ont apparu une activité antioxydante élevée que les extraits obtenus par des techniques classiques d'extraction.

La présente étude a été réalisée pour contribuer à l'optimisation des conditions opératoires d'extraction des antioxydants par le dosage des composés phénoliques et flavonoidiques des extraits de la matière végétale des galles du *P. atlantica*.

Le modèle expérimental est divisé en deux parties. Des essais préliminaires sont effectués, selon le modèle classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres. Ces essais préliminaires sont effectués sur la matière végétale des galles du *P. atlantica*.

La réponse est modélisée sous forme d'un polynôme en fonction des paramètres précités par l'application du plan de BBD et de la MRS. D'après l'étude statistique nous pouvons conclure que :

Les modèles obtenus sont statiquement significatif  $p < 0,05$ .

Il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées,

$R^2 = 90,00\%$  et

$R^2_{ajus} = 80,00\%$ .

Le plan box-Behnken a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction ; composés phénolique (matière végétale 1.22g à un volume méthanol 60 ml pendant un temps d'extraction de 28 min); flavonoïdes (matière végétale 1.18g à un volume de méthanol 42 ml pendant un temps d'extraction de 19 min) et l'activité antiradicalaire (0.65g à un volume de méthanol 65 ml pendant un temps d'extraction de 29 min)

Pour compléter ces résultats il est intéressant d' :

- ✓ Optimiser d'autres paramètres influençant le taux d'extraction des polyphénols

- ✓ Utiliser des techniques d'analyses plus performantes telles que la HPLC et la RMN afin d'identifier la composition des extraits.
- ✓ Elargir l'échantillonnage et analyser l'effet de l'origine géographique sur la composition en antioxydants et sur leur activité biologique

## *References*

## References

- [1] **Evans, J. L. (2012).** "Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance?" *Indian Journal of Medical Research* **125**(3): 355.
- [2] **Martin S.,** Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéologie*. 51: 304-315.
- [3] **Chagnon P. (2015).** Plans d'expériences (partie 1) : Principes généraux. *Contrôles Essais Mesures*, 11: 69-72p.
- [4] **Telli, A.,** N. Mahboub. (2014). "optimisation des conditions *dactylifera L*" variete ghars." *Annales des Sciences et Technologie* **2**(2): 107-114.
- [5] **Pinelo, M.,** Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2013). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2111-2117.
- [6] **Arba M. (2000).** Les Opuntias à fruits comestibles dans certaines régions du Maroc. Actes IIème journée National. Culture de cactus. El kelaa des Sraghna. Maroc : 8.
- [7] **Mafart, P.,** Béliard, E. (2014). *Food industry engineering. Volume II. Separation techniques. Technique et documentation-Lavoisier.*
- [8] **Dibert, K.** et Cros, E. (2016). Solvent extraction of oil and chlorogenic from green coffee, Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, **10**(3): 199-214.
- [9] **Bimbenet, J.-J.,** A. Duquenoy. (2002). *Génie des procédés alimentaires: Des bases aux applications*, Dunod.
- [10] **Leybros, J.,** Fremeaux, P., (1990). Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés* **2**, J2780. 2781-J2780. 2721.
- [11] **Groubert, A. (1984).** *Techniques d'extraction végétale*. Montpellier, pharmacie.
- [12] Kaufmann, B., P. Christen. et al. (2001). Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochemical Analysis*, **12**: 327-331.
- [13] **Daniella.P. (2012).** Application of ultrasounds for transformation processes of agroalimentary products. *Food and Nutrition. Université d'Avignon*, 5-25(2012).
- [14] **Zhang, R.,** Xu Y., Shi Y. (2013). The extracting technology of flavonoids compounds, *Food and Machinery*. 21-22.
- [15] **Ninad R. J.,** Abhijeet R.C (2014). Chemical, Civil and Mechanical Engineering Tracks of 3rd Nirma University International Conférence on Engineering .Ultrasonic Assisted Extraction of Aloin from Aloe Vera Gel. 487-493.

- [16] **Yang, L.**, Cao, Y. L., Jiang, J. G., Lin, Q. S., Chen, J., Zhu, L.(2010).«Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl.» *J. Sep. Sci.*, vol. 33:1349–1355.
- [17] **Prasad, K. N.**, Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A. and Ismail, A.(2011). «Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels.» *Food Chemistry* ,128 (2011):1121–1127.
- [18] **Nassiri, H.**, Arabi, H., Hakim, S. and Bolandi, S.(2011).«Polymerization of propylene with Ziegler–Natta catalyst: optimization of operating conditions by response surface methodology (RSM)» *Polym. Bull*, 67:(7) 1393–1411.
- [19] **Majd, M. H.**, Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavif, S. A. and Bolourian, S.(2014).«Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology» *Industrial Crops and Products* , vol. 57 :195–202.
- [20] **Akalin, M. K.**, Tekin, K., Akyüz, M. and Karagöz, S.(2015).«Sage oil extraction and optimization by response surface methodology» *Industrial Crops and Products* , vol. 76 :829–835.
- [21] **Wu, J.**, Yu, D., Sun, H., Zhang, Y., Zhang, X. and Meng, F.(2015).«Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology» *Industrial Crops and Products*, vol.69:68–75.
- [22] **Simeonov, E.** , Tsibranska, I. , Minchev, A.(1999). Solid – liquid extraction from plants experimental kinetics and modeling ,*Chem.Eng.Journal*, 73 (1999).
- [23] **Goupy, J.** and Creighton, L.(2006).«Introduction aux plans d'expériences». Dunod, Paris, 324p.
- [24] **Kimouche, K.**(2008).«Etude de quelques plans d'expériences associées aux surfaces de réponse».Mémoire de Magister, Constantine (Algérie).
- [25] **Goupy, J.** (2006).«Les plans d'expériences». *Revue Modulad*, pp. 74-116.
- [26] **Faucher, J.** (2006). «Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue», Thèse de doctorat, spécialité: Génie électrique et automatique.Toulouse (France), pp. 198.
- [27] **Zaddem, M.** (2014).«Application de la méthode des surfaces de réponse pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain». Mémoire de maître ès sciences en génie agroalimentaire.Québec (Canada), pp.110.
- [28] **Alberti, A.**, Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A. and Mafra, L. I. (2013). «Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology» *Food Chemistry* , 149 (2014):151–158.

- [29] **Yang, L.**, Cao, Y. L., Jiang, J. G., Lin, Q. S., Chen, J., Zhu, L.(2010). «Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl.» *J. Sep. Sci.*, vol. 33:1349–1355.
- [30] **Jennan, S.**, Farah, A. and Mahjoubi, F.(2014).«Optimisation of ultrasound assisted extraction of *T. hyemalis* using the response surface methodology,» *J. Mater. Environ. Sci.* ,6(13): 773-778.
- [31] **Majd, M. H.**, Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavif, S. A. and Bolourian, S.(2014).«Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology,» *Industrial Crops and Products* , vol. 57 :195–202.
- [32] **Akahn, M. K.**, Tekin, K., Akyüz, M. and Karagöz, S.(2015).«Sage oil extraction and optimization by response surface methodology,» *Industrial Crops and Products* , vol. 76 :829–835.
- [33] **Wu, J.**, Yu, D., Sun, H., Zhang, Y., Zhang, X. and Meng, F.(2015).«Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology,» *Industrial Crops and Products*,vol.69:68–75.
- [34] **Kaddour, H. A. (2008)**«Contribution à l'étude du comportement morpho-physiologique et biochimique de *Pistacia atlantica* Desf. sp. *atlantica* stressé à la salinité.» *Mémoire de Magistère en physiologie végétale, option: Eco-physiologie végétale. Université d'Oran (Algérie)*, pp.94
- [35] **Monjause, A. (1980)** .«Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica* Desf. Biologie et foret.» *Revue forestière française* ,vol 4: 357-363.
- [36] **Benabdallah, F. Z. (2011)**. «Etude morphologique des feuilles et des fruits du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf. ) et valorisation des huiles essentielles des feuilles et de l'oléorésine.» *Mémoire de magistère en Biologie, Option: Biotechnologie*
- [37] **Dauphin, P. (2012)**. « *Guide des galles de France et d'Europe* ». Edition Belin, Paris, pp. 7-25. (Algerie), pp.76p.
- [38] **Rajopadhye, A., A., Upadhye, A., S., Dandge, C., N., and Naik, D., G. (2016)**.«Essential Oil From Leaf Galls on *Pistacia chinensis* sp. *integerrima*: Chemical Composition, In Vitro and In Vivo Antioxidant and Hepatoprotective Activity .» *TEOP* 19(7): 1648 - 1659.
- [39] **Kaur, G.**, Athar, M., Alam, S., M. (2007). «*Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages.» *Chemico-Biological Interactions* 171(2008): 272–282.

- [40] **Gourine, N.**, Sifi, I., Gaydou, E. M. and Yousfi, M. (2011). «Chemical Composition of the Essential Oil of Unripe Galls of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria.» *The Natural Products Journal*, 1(2): 125-127.
- [41] **Sifi, I.**, Dzoyem, J. P., Ouinten, M. Yousfi, M., McGaw, L. J. and Eloff, N., J. (2015). «Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of gall of *Pistacia atlantica* Desf. from Algeria.» *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 12 (3): 150-155.
- [42] **Gee J.M.**, Johnson I.T. (2001) Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 1-182
- [43] **Boizot, N.** and Charpentier, J.(2006).«Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.» *Cah. Tech. INRA*, vol. 1: 9-82.
- [44] **Vongsak, B.**, Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W.(2012).«Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method,» *Industrial Crops and Products* , 44 (2013): 566– 571. 571.
- [45] **Du, L.**, Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. (2013).«Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts,» *Food Chemistry* , 153 (2014) : 279–284.
- [46] **Wettasinghe M.**, Shahidi F. (1999). Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1801–1812
- [47] **Lapornik, B.**, M. Prošek,. (2005). "Comparison of extracts prepared from plant byproducts using different solvents and extraction time." *Journal of Food Engineering* **71**(2): 214-222.
- [48] **Khizar H.**, Sarfaraz H, Shabbar A, Umar F, Baomiao D, Shuqin X, Chenggsheng J, Xiaoming Z, Wenshui X. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation*
- [49] **Spigno, G.**, L. Tramelli. (2007). "Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics." *Journal of Food Engineering* 81(1): 200-208.
- [50] **Leandro, L. M.**, F. de Sousa Vargas. (2012). "Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins." *Molecules* **17**(4): 3866-3889.

- [51] **Tabaraki, R.** and Nateghi,A.(2011).«Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology,» *Ultrasonics Sonochemistry* , vol. 18: 1279–1286.
- [52] **Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A. and Ismail, A.(2011).** «Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels,» *Food Chemistry* ,128 (2011):1121–1127.
- [53] **Jennan, S., Farah, A. and Mahjoubi, F.(2014).**«Optimisation of ultrasound assisted extraction of *T.hyemalis* using the response surface methodology,» *J. Mater. Environ. Sci.* ,6(13): 773-778.
- [54] **Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y., (2008).** Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108, 977-985.
- [55] **El-Adawi, H., Y. Abdel-Fattah. (2011).** "Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from ‘milk thistle’seeds." *African Journal of Biotechnology* 10(48): 9804-9811
- [56] **Granato, D., G. F. Branco. (2010).** "Withdrawn: Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review." *Food Research International*
- [57] **Liu, M. et Zhao Z. (2009).** Germplasm resources and production of jujube in China. *ISHS Acta Horticulturae*, 840: 25 – 32.
- [58] **Tinsson, W. (2010).** *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67). Springer Science & Business Media.
- [59] **Kormin F, Ahmed I, bin Mohd Yunus R, Abidin Mohd Yusof Z. (2010).** The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *International Journal of Engineering & Technology IJET-IJENS*, 10(02): 7-12.

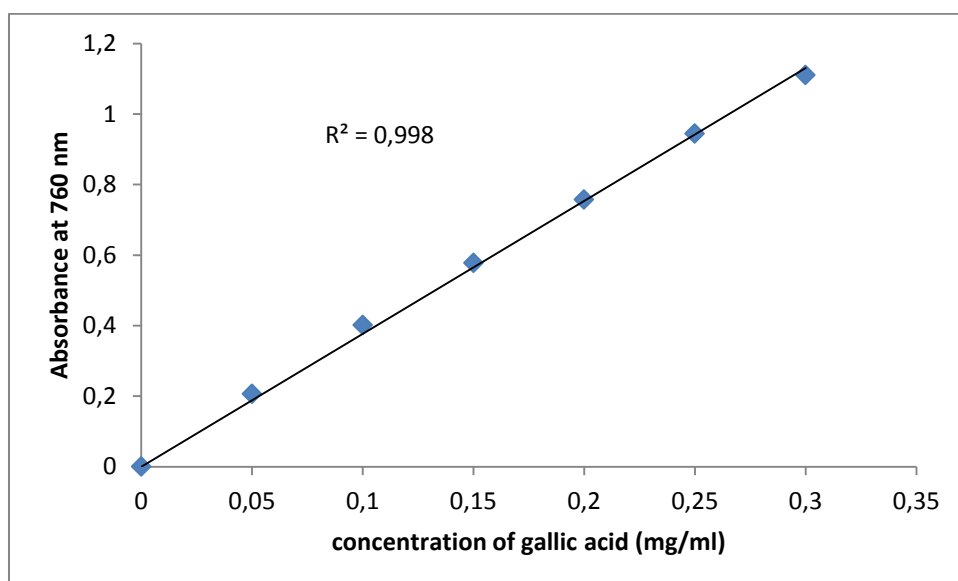
## *Annexe*

## LES ANNEXES

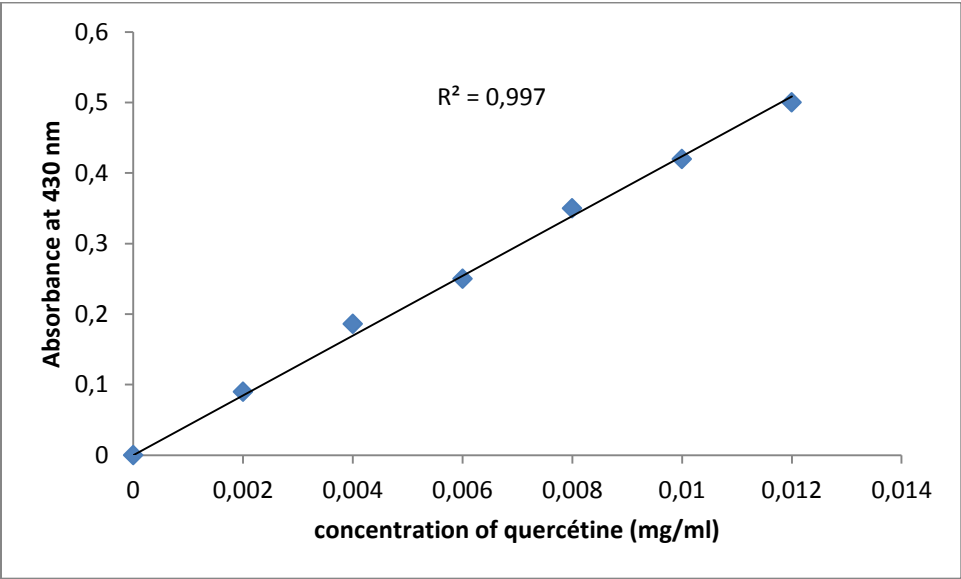
**Tableau 01** : Réactifs et produits chimiques

Réactifs et produits chimiques	
Méthanol	MeOH
Folin- ciocalteu	
Chlorure d'aluminium	AlCl <sub>3</sub>
Carbonate de sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
DPPH	2,2 – diphenyl -1- picrylhydrazyl
Acide gallique	
Acide ascorbique (vitamine C)	
La quercetine	

**Courbe standard d'acide Gallique**



**Courbe standard de Quercétine**



**Courbe standard de l'acide ascorbique**

