

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE AMAR TELIDJI DE LAGHOUAT

جامعة عمار تليجي الأغواط



FACULTE DES SCIENCES

كلية العلوم

DEPARTEMENT Sciences de la Matière

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : chimie organique appliquée

Présenté par :

BANOUH Abderrahman HBAIZ Zakaria

THEME

**Modélisation de l'extraction des antioxydants d'une plante locale
par le modèle Box-Behnken, et étude des activités antioxydantes**

Soutenu publiquement le 28/09/2020 devant le jury composé de :

BATANA F.Zohra

M.A.A

Présidente

AMI Yasmine

M.A.A

Examinatrice

BEN AHMED Ziyad

M.C.A

Rapporteur

Année Universitaire : 2019- 2020

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur « BEN AHMED Ziyad » maître de conférence (classe A) à la faculté des sciences, Université AMAR TELIDJI LAGHOUAT, d'avoir accepté de nous encadrer, nous le remercions pour sa disponibilité et son aide tout le long de ce modeste travail, qu'il trouve ici toutes nos gratitude.

Nous tenons à remercier tout particulièrement Mlle « BATANA Fatima zohra » Maitre assistant A à la faculté des sciences, Université AMAR TELIDJI LAGHOUAT, d'avoir accepté

de présider le jury.

Nous exprimons mes vifs remerciements à Mme « AMI Yasmine » Maitre assistant A à la faculté des sciences, Université AMAR TELIDJI LAGHOUAT, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Un grand merci à toutes et à tous.

Dédicaces

Je dédie ce travail : Celui qui n'a cessé de m'aider avec son indéfectible soutien :

A la mémoire de mon père.

A très chère mère.

A tous mes oncles.

A Mes frères :

A Toutes mes sœurs.

A Tous mes amis,

A mon cher pays « l'Algérie ».

HBAIZ Zakaria

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont
tout donné.*

*Je souhaite qu'ils trouvent dans ce travail toute ma reconnaissance et
tout mon amour.*

A mes frères

A mes sœurs.

A mon binôme zakaria et toute sa famille.

BANOUEH Abderrahman

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
I. Appellations Nom latin	3
2. Classification	3
3. Description	3
4. Utilisation et propriétés thérapeutiques	4
5. Composition chimique	5
II. Structure et propriétés des composés phénoliques	5
II.1 Les différentes classes de composés phénoliques	5
2. Les composés non flavonoïdes	5
2.1. Les acides phénoliques	6
2.2. Les composés flavonoïdes	7
3. Propriétés biologiques et pharmacologiques de composés phénoliques	10
4- Extraction et dosage des polyphénols	11
5. Paramètres influençant l'extraction	13
5.1. Effet du solvant	13
5.2. Effet du rapport liquide/ solide	13
5.3. Effet du temps d'extraction	13
5.4. Effet de taille des particules	13
Chapitre 2 : Généralités sur les plans d'expériences	
6. Méthodologie des plans d'expériences	14
6.1 .Définition des plans d'expériences	14
6.2. L'intérêt des plans d'expériences	14
7. Généralités sur les plans d'expériences	14
7.1. Réponse	15
7.2. Facteur	15
7.3. Domaine expérimental	15

7.4 Variables centrées réduites	15
7.5. Matrice d'expérience	15
7.6 Plan d'expérimentation	16
7.7. Méthodologie expérimentale	16
7.8. Types des plans d'expériences	16
7.9. Domaine d'utilisation	16
8. Optimisation par la méthode des surfaces de réponse	17

Matériels et méthodes

III. Echantillonnage	19
III.1. Extraction par macération	19
III.2 Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques	19
2.1. Analyse préliminaire	19
a) La masse de l'extraction	20
b) Le volume du solvant	20
c) Le temps d'extraction	20
3. Dosage des polyphénols totaux	20
4. Mode opératoire	20
4.1. Expression des résultats	21
5. Activité anti-radicalaire (DPPH)	21
5.1. Mode opératoire	21
5.2. Matrice d'expériences	22
6. Analyse statistique	22

Résultats et discussion

IV.1. Extraction des composés phénoliques par ultrason	23
IV.1.1. Extraction par ultrason	23
IV.1.2. Etudes préliminaires	23
a) L'effet de différents masse d'extraction	23
b) L'Effet de rapport (masse /volume)	24
c) L'effet de différents temps d'extraction	25
IV.2. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénolique totaux	26
IV.2.1. Plan d'expérience Box-Behnken	27

IV.2.2. Validation du modèle	29
IV.2.3. Le coefficient de détermination (R^2)	29
IV.2.4. Model global et manque d'ajustement	30
IV.2.5. Effet des facteurs (coefficients)	30
IV.2.6. Analyse du modèle mathématique	31
IV.2.7. Effet linéaire	31
IV.2.8. Effet quadratique	31
IV.2.9. Analyse des surfaces de réponse	32
a) Masse -volume	32
b) Masse- Temps	32
c) Volume-Temps	32
IV.2.10. Paramètres optimaux	34
IV.3. Test d'évaluation d'activité antioxydante	35
III.3.1. L'activité scavenger sur le radical DPPH	35
IV.3.2. Coefficient de corrélation	35
IV.3.3. Effet des facteurs (coefficients)	36
IV.3.4. Analyse du modèle mathématique	36
IV.3.5. Effet quadratique	36
IV.3.6. Analyse des surfaces de réponse	36
a) Masse -volume	36
b) Masse –Temps	37
c) Volume-Temps	37
IV.3.7. Solution	39
Conclusion général	40
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

BBD : plan de box behnken design

DPPH : 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl.

MSR : Méthode de surface de réponse

R² : Coefficient de détermination.

R²A : Coefficient de détermination ajusté.

TCP : Taux des composés phénoliques.

Liste Figures

Figure 1	: (a) Macrographie de <i>Pulicaria crispera</i> , (b) Photo de la plante <i>Pulicaria</i> (photo originale)	04
Figure 2	: Les dérivées de l'acide p-hydroxybenzoïque	06
Figure 3	: Les acides hydroxycinnamiques	06
Figure 4	: Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone	07
Figure 5	: Effet volume sur l'extraction des CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$).	25
Figure 6	: Effet de différents temps d'extraction sur les CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)	26
Figure 7	: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.	29
Figure 8	: Surface de réponse pour les effets masse /volumes (A), la masse/temps(B) et volume/temps (C) sur le rendement des composés phénolique des fruits du <i>Pulicaria crispera</i>	34
Figure 9	: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.	35
Figure 10	: Surface de réponse pour les effets masse/volume (A), la masse/temps (B) et volume/temps (C) sur l'activité scavenger DPPH des fruits <i>Pulicaria crisp</i>	39

Liste des tableaux

Tableau 1	: structure des différents classe des flavonoïdes	08
Tableau 2	: Principales méthodes d'études des composés phénoliques	12
Tableau 3	: matériel et produit de l'expérience	19
Tableau 4	: Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques du <i>Pulicaria crispa</i> .	27
Tableau 5	: la matrice expérimentale de Box-Behnken pour trois facteurs (X_1 , X_2 et X_3) et leurs réponses CPT et DPPH, exprimé en (mg/g matière sèche).	28
Tableau 6	: L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre	30
Tableau 7	: Coefficients de régression et leurs significations statistiques.	31
Tableau 8	: Conditions optimales d'extraction des composés phénoliques par ultrason (mg EAG/g MS).	34
Tableau 9	: Les coefficients de régression estimés du modèle polynomial du second degré.	36
Tableau 10	: Conditions optimales de l'activité scavenger DPPH par ultrason (mg EAAC/g de MS).	42

Introduction générale

La médecine traditionnelle était largement connue et répandue parmi nos ancêtres, en particulier dans les pays du continent Africain, ce qui rendait les chercheurs intéressés par les substances naturels d'efficacité biologique (l'activité antioxydants, antibactérienne, antipaludique). Elles fournissent une source illimitée des grands composés d'intérêt qui peuvent plus loin devenir de nouvelles drogues actives [1].

Aujourd'hui les plantes médicinales sont employées comme source de principes actifs très précieux et largement utilisés, ainsi qu'elles constituent une source importante de nouvelles molécules pour l'industrie [1]. Actuellement environ 25% des médicaments modernes sont développés à partir des plantes [2]. Quand on parle de la richesse naturelle des plantes médicinales en Afrique, on mentionne particulièrement notre pays l'Algérie. Les raisons qui ont contribué à l'étude de la médecine traditionnelle en Algérie :

- a- La richesse de la flore médicinale [3]. Alors que on compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques en Algérie [4].
- b- b-La persistance de l'usage des plantes par une proportion importante de la population [3].

Il est intéressant de noter la concurrence sur se étude, pour cette raison on chercher toujours plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles bioactives .

Les composés phénoliques sont des constituants importants en raison de leur contribution au goût et la couleur du fruit [5]. Ces dernières années, les composés phénoliques sont un sujet d'intérêt de nombreuses recherches scientifiques en raison de leurs effets positifs sur la santé humaine, attribués principalement à leurs activités antioxydantes. L'extraction est une étape importante dans l'isolement et dans l'identification et la quantification des composés phénoliques [5].

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]. Néanmoins, l'extraction est l'étape initiale et la plus importante pour récupérer les composés bioactifs à partir de matières végétales. En outre, de nombreux facteurs tels que la composition du solvant, la température

d'extraction, le rapport solvant-solide, le pH du solvant et la pression peuvent influencer d'une manière significative l'efficacité de l'extraction, l'activité antioxydante et le contenu phénolique. Par conséquent, il est nécessaire d'optimiser les conditions d'extraction pour obtenir les teneurs les plus élevées en ces composés.

D'autre part, la méthode traditionnelle d'optimisation prend beaucoup de temps, car un seul facteur seulement est pris en compte. Dans cette méthode, les interactions de divers facteurs sont ignorées et donc, les chances d'obtenir les vraies conditions optimales sont minimales. Pour surmonter cette difficulté, l'utilisation de la Méthodologie de Surface de Réponse (RSM) est utilisée.

Notre étude porte sur un végétal Méditerranéen très réputé en Algérie, *Pulicaria crispa*. Elle rentre dans la composition de "Mssakhen", remède traditionnel, qu'est donné aux femmes après l'accouchement. Elle est aussi utilisée comme épice pour parfumer le pain et la viande [6]. Les racines *Pulicaria crispa* sont également utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires.

Afin de tirer bénéfice et pour une meilleure valorisation l'industriel une bonne maîtrise des conditions d'extraction des polyphénols existants dans le *Pulicaria crispa* s'avère nécessaire. Dans cette optique, la présente étude vise à optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques des fleurs du *Pulicaria crispa* en utilisant la RSM afin d'évaluer l'influence des différents paramètres expérimentaux (solvant, temps, masse) sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Cette étude va nous permettre de répondre ainsi à deux questions, d'une part, qu'elles sont les meilleures conditions pour extraire des taux importants en composés phénoliques des fleurs du *Pulicaria odora*.

Afin de répondre à cette problématique la démarche suivante est adoptée : La première partie est une synthèse bibliographique qui présente la description du *Pulicaria crispa* et les méthodes d'extraction des polyphénols. La deuxième partie de ce travail est une étude expérimentale qui a pour but :

D'optimiser les conditions d'extraction (extraction assistée par ultrasons) des composés phénoliques du *Pulicaria odora*. De déterminer la meilleure méthode d'extraction en dosant les composés phénoliques et en évaluant l'activité antioxydante des différents extraits. Et nous allons finir avec la présentation, l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus.

Chapitre 1 :
Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

La plante étudiée dans le présent travail est une plante saharienne de la région du Hogar Algérien dans la wilaya de Tamanrasset .

1. Appellations Nom latin : *Pulicaria crispa*.

1.1 Noms vernaculaires

Connue sous plusieurs noms vernaculaires en fonction des régions : « SEKBA » dans le sud Algérien (Hoggar, Tamanrasset), « AL-THAGHAR » à Gezira (Khartoum) ou encore « JATHJATH » en Arabie Saoudite (ALNOUR, 2007).

2. Classification

Selon la taxonomie de Cronquist (1981), la plante *Pulicaria crispa* est classée comme suit :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Compositae

Genre : *Pulicaria*

Espèce : *Crispa*

3. Description

Pulicaria crispa se développe très rapidement, tolère les conditions désertiques difficiles et pousse sur des sols sablonneux et rocheux et peut également être propagée par graines [7]. Plante annuelle (vivace), à racines pivotantes, de 12 à 75 cm de haut, à tiges densément ramifiées de la base de la plante à aspect feutré dû au couvert de poils blancs laineux. Ses feuilles sont sessiles ; quelque peu amplexicaules, linéaires à obtus, ondulées et rarement dentées, tomenteuses des deux pages de poils laineux, atteignant 0.5 à 6 cm ; et sont beaucoup plus petites sur les tiges supérieures. Les fleurs sont solitaires, terminales, hémisphériques et hétérogames. Elles sont très visibles, de couleur jaune d'or à orangée, de 0.5 à 1 cm de diamètre, elles ont la spécificité d'être nombreuses, bractées, acuminées, glabres ou ciliées et souvent glandulaires [9]. Les akènes cylindriques sont lisses ou à peine côtelés, parsemés de

poils blancs antorsés etcouronnés d'une aigrette double constituée de 6-8 soies ou 9-10 soies à peine scabres et d'une cupule externe irrégulièrement dentée.



Figure 1 : (a) Macrographie de *Pulicaria crisper*, (b) Photo de la plante *Pulicaria* (photo originale)

4. Utilisation et propriétés thérapeutiques

L'utilisation des feuilles de *P.crispa* est orientée vers plusieurs vols ; en tant qu'épices afin de relever le goût des aliments, en tant qu'infusions (tisanes), pour repousser les insectes...etc. [9].

D'après la même source, les membres de ce genre sont également traditionnellement utilisés pour leurs bienfaits sur la santé :

- ✓ Réduction des symptômes de la grippe et du rhume.
- ✓ Traitement des maux de dos.
- ✓ Soulagement des troubles intestinaux.
- ✓ Traitement des blessures.
- ✓ Effet tonique. • Relaxant et anti stress.

Il est scientifiquement rapporté que les membres du genre *Pulicaria* en général possèdent d'autres propriétés thérapeutiques très importantes, spécialement l'espèce que nous étudions, on cite : [10].

- Activité antioxydante.
- Activité antimicrobienne.
- Activité anti leucémique.
- Activité anti spasmodique.
- Activité anti cancéreuse .

Il ne faut pas également négliger ses propriétés galactagogues et anti épileptique [8].

5. Composition chimique

Les espèces du genre *Pulicaria* contiennent divers composés bioactifs, qui sont d'ailleurs la raison des multiples propriétés thérapeutiques de ces plantes. D'après la littérature[8,10], on peut citer

- Monoterpènes.
- Flavonoïdes.
- Acétylènes.
- Isocomènes.
- Lactones sesquiterpéniques.

II. Structure et propriétés des composés phénoliques

II.1 Les différentes classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans tous les tissus végétaux depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils se classent parmi les métabolismes secondaires, par opposition aux protéines, lipides et carbohydrates qui sont les constituants indispensables à la reproduction et à la croissance des végétaux. Pratiquement tous les végétaux fabriquent des phénols et les stockent dans divers organes. Leur présence assure à la plante une protection contre les agents pathogènes, ainsi qu'une aide à la reproduction et à la survie de l'espèce. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins) [11].

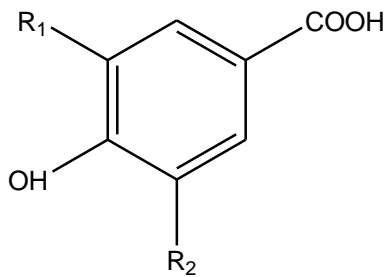
Le terme 'composés phénoliques' désigne de nombreuses substances regroupées en famille. Les différents composés d'une même famille se différencient par la nature et la position des substituants fixés sur un squelette aromatique commun. Les deux classes principales sont les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes.

2. Les composés non flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette «flavone».

2.1. Les acides phénoliques

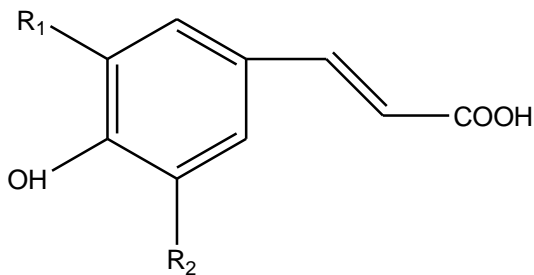
On distingue tout d'abord les dérivées de l'acide benzoïque, composé d'un squelette de sept atomes de carbone (Figure 2).



Acides hydroxybenzoïques	R ₁	R ₂
Acide hydroxybenzoïque	H	H
Acide protocatechique	OH	H
Acide vanillique	OCH ₃	H
Acide gallique	OH	OH
Acide syringique	OCH ₃	OCH ₃

Figure2 : Les dérivées de l'acide p-hydroxybenzoïque

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de type C₆-C₃ (figure 3) et qui sont très répandus dans les plantes supérieures, l'acide p-couramique étant le plus important [12].



Acides hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂
Acide p-couramique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	H
Acide sinnamique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 3 : Les acides hydroxycinnamiques

Parmi les acides hydroxycinnamiques estérifiés, l'acide chlorogénique, ester quinique de l'acide caféique, est très répandu dans les fruits. Ce composé est impliqué dans les mécanismes de brunissement enzymatique. Sa quinone est très réactive et susceptible de réagir par voie d'oxydation couplée [12].

Les acides hydroxybenzoïque (squelette (C₆-C₁) (figure 1.1)) sont rarement trouvés dans les fruits mais peuvent être détectés après dégradation des flavonoïdes, et notamment après déglycosylation. Ces composés sont fréquemment présents sous forme liée et peuvent entrer dans la constitution de structures complexes, telles que les tanins hydrolysables. Les esters de l'acide gallique sont retrouvés dans certains fruits notamment le galatte d'épicatéchine qui entre dans la composition des tanins condensés du raisin [13].

2.2 Les composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone (C₆-C₃-C₆) comportant deux cycles benzénique A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone qui correspond à la phényl-2 benzopyrone (figure 4), la numérotation notée sera appliquée pour les différentes sous-classes de flavonoïdes. Ces dernières sont différenciées par le niveau d'oxydation du cycle pyrane: on peut aussi distinguer les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et d'autres classes, telles que les flavones, les flavanones et dihydrochalcones.

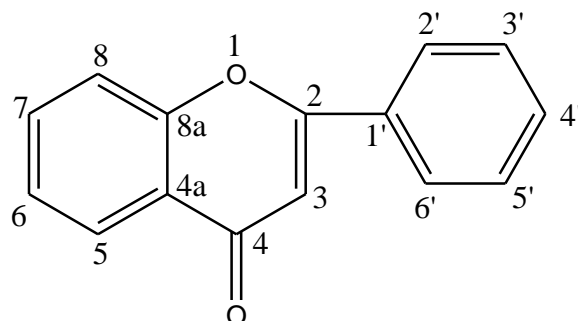
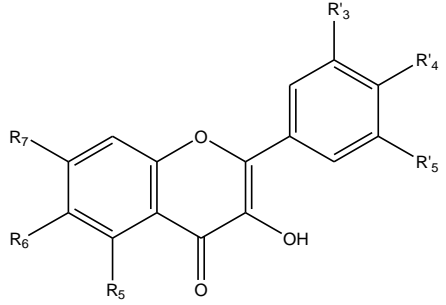
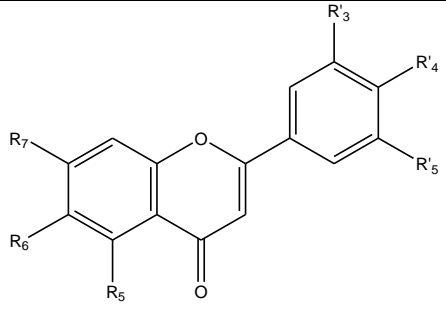
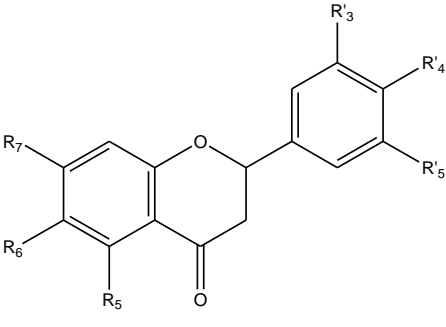
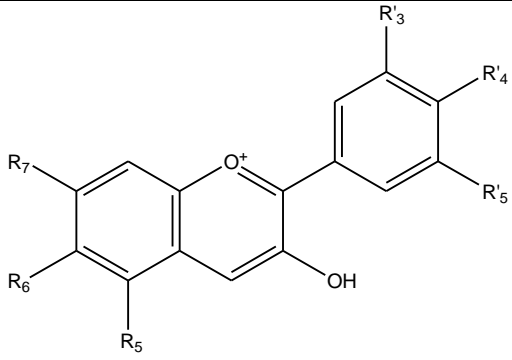
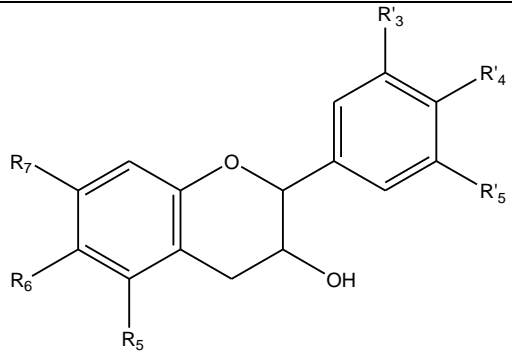
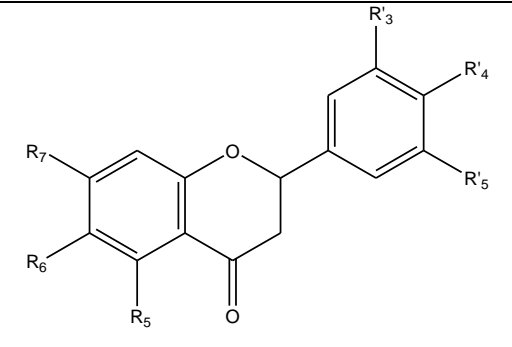
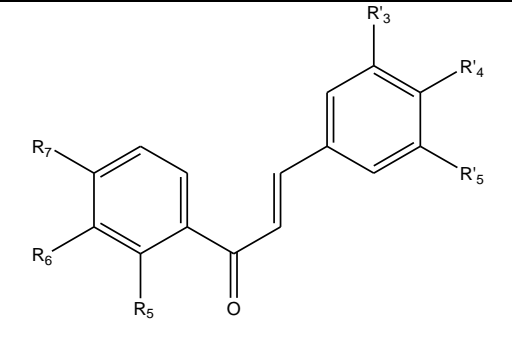
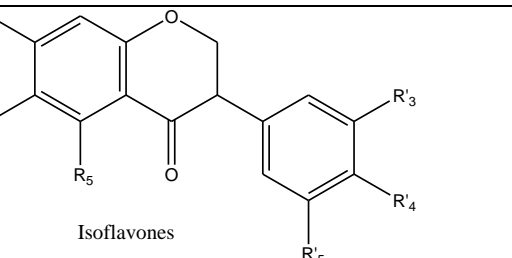


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone

Le terme ‘flavonoïde’, utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner [14], regroupe tous les composés dont la structure est basée sur celle de la flavone, phényl-2 benzopyrone (figure 4). Leur biosynthèse se fait à partir d’un précurseur commun, la 4, 2, 4’, 6’ – tétrahydroxychalcone (figure 4) [15]. Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes [16] dont la structure varie selon le degré d’oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central [11]. Les plus importantes sont les flavones et flavonols, pigments jaunes, les anthocyanidines, pigments bleus et rouges des fleurs et des fruits, les catéchines, les flavanones, les flavanols, chalcones, isoflavones etc... (tableau 1).

Tableau (1) : Structures des différentes classes des flavonoïdes

Noms de structures	Formule de structures
Flavonols	
Flavones	
Flavononols	

<p>Athocyanidines</p>	
<p>Flavon-3-ols ou catéchines</p>	
<p>Flavanones</p>	
<p>Chalcones</p>	
<p>Isoflavones</p>	 <p>Isoflavones</p>

3. Propriétés biologiques et pharmacologiques de composés phénoliques

Les flavonoïdes sont depuis longtemps reconnus comme des molécules possédant un nombre remarquables d'actions biochimiques et pharmacologiques. Suggérant que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. Certains d'entre eux (essentiellement dans des préparations à base de rutine, de rutoside et de quercétine) sont depuis longtemps employés empiriquement dans la pathologie circulatoire en tant que veinotonique et vasculoprotecteur [17].

D'importance historique, on note l'observation d'un mélange de deux flavonoïdes appelés citrine et possédant une activité semblable à celle de la vitamine C [18]. Le terme de vitamine P a alors été introduit pour indiquer que ce produit diminuait la perméabilité et la fragilité capillaire ainsi que les signes d'hypovitaminose C chez les animaux d'expérimentation. Bien qu'appelée vitamine P, cette substance ne répondait pas à la définition d'une vitamine. Cependant, il a été démontré que les flavonoïdes prévenaient l'oxydation de l'acide ascorbique et ainsi en augmentait l'activité biologique.

Les principales propriétés biologiques des flavonoïdes sont :

- Une action antioxydante s'effectuant par «piégeage» des radicaux libres.
- Une activité antibactérienne significative.
- Une activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-allergique résultant de leur capacité à inhiber la formation et la libération de prostaglandines (médiateur intercellulaire de l'inflammation) et de leucotriènes (médiateur intercellulaire de l'inflammation et de l'allergie) [9]. Certains flavonoïdes agissent en augmentant la perméabilité capillaire [10] et d'autres, en inhibant la libération d'histamine [16].
- Une activité radioprotectrice attribuée au piégeage des radicaux hydroxydes [18].
- La capacité d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, contribuant ainsi à réduire les tendances à la thrombose [13].
- Certaines propriétés antivirales. La quercétine par exemple réduit l'infection due à la présence de certains virus elle en diminue la réplication [14].
- Une activité anti-sécrétoire gastrique aussi efficace que la cimetidine utile dans le traitement de l'ulcère de l'estomac [15].

- Un pouvoir inhibiteur de l'aldose réductase, enzyme impliquée dans la pathologie des cataractes. Cette enzyme catalyse la réduction du glucose et du galactose en leurs polyols qui s'accumulent alors en grandes quantités au niveau du cristallin qui devient opaque [16]. Un composé tel que la rutine bloque l'aldose réductase et peut constituer un médicament complémentaire du diabète sucré [17].
- La capacité d'inhiber la protéine kinase, enzyme impliquée dans un grand nombre d'activités cellulaires et responsable entre autre de la prolifération des tumeurs [18]. Ainsi, la quercétine empêche la croissance de nombreuses tumeurs malignes [14]. Une étude consacrée à l'activité anti-tumorale des flavonoïdes et plus particulièrement aux relations entre la prolifération des cellules tumorales et la structure chimique des flavonoïdes a montré que les flavones substituées par un glucose inhibent la croissance des tumeurs, alors que les mêmes composés substitués par un rhamnose ou un lutinose en une position identique sont inactifs. L'isoquercétine est le composé le plus actif [15].
- Une activité inhibitrice de la xanthine oxydase, enzyme qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique responsable des crises de Gouttes [17]. Des travaux épidémiologiques ont été consacrés à l'étude de la relation entre l'apport des flavonoïdes, le cancer et les maladies cardio-vasculaires [18]. A ce jour, les conclusions de ces recherches suggèrent qu'un apport élevé en flavonoïdes, tels que la quercétine pourrait réduire le risque de maladie coronarienne, mais il ne semble pas jouer un rôle important dans la prévention du cancer. Les flavonoïdes possèdent donc un très large éventail d'actions biologiques à ce jour de nombreux travaux de recherches concernant les propriétés des molécules ne cessent d'être publiés. D'importants progrès ont été faits pour tenter de comprendre leur mécanisme d'action et essayer d'établir des relations entre la structure et l'activité de ces composés [16].

4- Extraction et dosage des polyphénols:

L'extraction et le dosage des composés phénoliques se fait selon plusieurs méthodes les plus utilisées et employées sont résumés dans le tableau 1 [19].

Tableau (2): Principales méthodes d'études des composées phénoliques

	Techniques	Principe
Extraction	Extraction par les solvants (macération)	Le contacte entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols présents dans les cellules par rupture du tissus végétale et par diffusion
	Extraction par chromatographie sur colonne	Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols et flavonoïdes des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux.
	Extraction supercritiques (SFE)	-Le CO2 supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité lui confère une grande capacité de diffusion lui permettant d'avoir accès à des composées phénoliques liés a la paroi cellulaire et sa densité relativement élevé lui confère un pouvoir de solvation ce qui permet un meilleur taux d'extraction. -Procédé non dénaturant. -Temps d'extraction réduit.
	ultrason	vibration de même nature que le son, mais de fréquence supérieure à la plus haute fréquence audible pour un homme. Ces vibrations sont produites dans la matière à une fréquence allant 16KHZ à 1GHZ
Dosage		Dosage par spectrophotométrie
		Dosage par HPLC

5. Paramètres influençant d'extraction:

L'extraction des composés phénoliques dépend du type de solvant, la nature et la préparation de matériel d'extraction, la structure chimique des composés phénolique, la température, le temps d'extraction, le rapport solide-liquide, et la méthode d'extraction utilisée.

5.1. Effet du solvant:

Un solvant est, par définition, un fluide qui a le pouvoir de solubiliser d'autres substances menant à une solution homogène. Un solvant d'extraction est choisi par:

- ses propriétés physiques : densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc. Déterminant les conditions de l'épuisement, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation.

- la nature des principes à dissoudre, - ses caractéristiques économiques et son prix de revient [20].

- Idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux [21].
- Il doit pouvoir extraire les composés polaires et apolaires ou bien être sélectif [22].

5.2. Effet du rapport liquide/ solide

L'extraction des composés phénoliques s'améliore avec l'augmentation du ratio liquide/ solide, puisqu'il agit sur le gradient de concentration entre la matrice végétale et le solvant qui favorise le transfert de matière [23].

5.3. Effet du temps d'extraction

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé, etc.). Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et ce, sans diminution notable du rendement. A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes [24].

5.4. Effet de taille des particules

Il est généralement admis que sous une forme broyée, la matière végétale présente une plus grande surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer la cinétique et

d'améliorer le rendement [25]. La diffusion interne est aussi plus rapide dans le cas de particules fines. Cependant, les particules de taille très fine posent des problèmes technologiques comme par exemple , un tassement du lit de solides provoquant une diminution de la perméabilité du lit au solvant et l'établissement de courants préférentiels et d'endroits du lit où le solvant ne circule pas. Les particules très fines sont également plus difficiles à se séparer de l'extrait liquide après la fin de l'extraction [26].

6. Méthodologie des plans d'expériences

A l'époque actuelle bon nombre de procédés de fabrication ou d'expérience en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement. Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses (modèle impossible à ajuster, résultats incohérents, etc...) soit à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la méthode des plans d'expérience est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche.

6.1 Définition des plans d'expériences

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique.

La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. (Norme ISO 3535-3) [27].

6.2 L'intérêt des plans d'expériences

L'intérêt majeur des plans d'expérience réside dans le fait qu'ils permettent d'optimiser le nombre d'expérimentations à réaliser lors de la phase d'essais, en déterminant au préalable les réels facteurs ou combinaisons de facteurs influents sur la réponse du système à étudier [27].

7. Généralités sur les plans d'expériences

Ces plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie qu'il est nécessaire de définir :

7.1 Réponse

On qualifie de réponse la grandeur qui est observée pour chaque expérience réalisée [28]. En d'autres termes, c'est le résultat mesuré d'une étude. Sachant qu'à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble de ces dernières, forme la surface de réponse. La valeur d'une réponse ne peut être modifiée que de manière indirecte en faisant varier les facteurs [27].

7.2 Facteur

Un facteur peut être toute variable obligatoirement contrôlable, pouvant influencer sur la réponse observée. La différence fondamentale entre la notion de variable et celle de facteur tient donc dans le fait que tout facteur doit pouvoir être modifié sans difficulté. La valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience est appelée niveau [27]. Les facteurs peuvent être : Quantitatifs, Qualitatifs, Contrôlables, Incontrôlables, Continus et discontinus.

7.3 Domaine expérimental

Il présente l'espace dans lequel peuvent varier les facteurs. Les informations tirées des résultats expérimentaux ne seront valables que dans ce domaine.

7.4 Variables centrées réduites

Soit A, la variable naturelle ou réelle dont le niveau bas A⁻ correspond à la variable normée -1 et le niveau A⁺ à +1.

La valeur centrale ou milieu du domaine est :

$$A_0 = \frac{A^+ + A^-}{2} \dots\dots\dots (1)$$

On introduit également la notion du pas :

$$\text{Pas} = \frac{A^+ - A^-}{2} \dots\dots\dots (2)$$

Le passage des variables d'origines A aux variables codées notées X est donnée par :

$$X = \frac{A - A_0}{\text{Pas}} \dots\dots\dots (3)$$

7.5 Matrice d'expérience

Une matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente l'ensemble des expériences à réaliser. Elle est toujours écrite sous forme codée. Elle est constituée de N lignes

correspondants au nombre d'expériences et K colonnes correspondantes au nombre de variables. Dans une matrice donnée un élément X_{ij} correspond au niveau de la ième et de la j^{ème} variable.

7.6 Plan d'expérimentation

Un plan d'expérimentation correspond à la « traduction » de la matrice d'expérience en une matrice directement utilisable par l'expérimentateur, car les variables seront exprimées en variables naturelles. Le plan d'expérimentation doit faire l'objet d'une analyse minutieuse pour voir si toutes les expériences sont réalisables et si elles ne présentent aucun risque [27].

7.7 Méthodologie expérimentale

La démarche à respecter est la suivante :

- Définition de l'objectif.
- Choix des réponses expérimentales.
- Choix des facteurs et du domaine expérimental d'intérêt.
- Etablir la stratégie expérimentale.
- Construction de la matrice d'expériences.
- Construction du plan d'expérimentation.

7.8 Types des plans d'expériences

Il existe actuellement un nombre important de plans différents. Chacun, par ses propriétés, permet de résoudre certains problèmes particuliers. Nous pouvons cependant citer quelques types des plans d'expériences en deux grandes catégories [28]:

- ✓ Les plans de criblage (screening)
- ✓ Les plans d'optimisation (MSR)
- ✓ Les plans de mélange

7.9 Domaine d'utilisation

Ils interviennent dans de nombreux domaines industriels. On peut notamment citer :

- Industrie agroalimentaire
- Industries chimiques, pétrochimiques et pharmaceutiques ⊗ Industries mécaniques et automobiles
- Industries métallurgiques

8. Optimisation par la méthode des surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponses (MSR) est une technique visant à déterminer les variations de la réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative. Cette méthode permet de déterminer une relation d'approximation entre les variables d'entrée et les variables de sortie. En effet, la réponse de sortie dépend de la variation des paramètres d'entrée qu'on appelle stimuli. Ces derniers peuvent être représentés par des variables aléatoires qu'on note X_i avec $i = 1, \dots, n$.

Ces variables aléatoires permettent de représenter les variations spatio-temporelles des paramètres d'entrée par des modèles mathématiques.

Ces derniers résument la relation d'approximation entre la réponse de sortie et la variable d'entrée. La représentation géométrique de cette relation d'approximation est appelée surface de réponse [29]. La construction des surfaces de réponses s'effectue suite à l'ajustement du modèle en utilisant des fonctions mathématiques telles les polynômes.

La méthode des surfaces de réponses passe par trois étapes : la construction du plan expérimental, la modélisation de la réponse et les représentations graphiques.

Les plans utilisés dans le cadre d'une étude de RSM sont des plans quadratiques tels que les plans centraux composites (Box-Wilson) ou les plans de Box-Behnken.

La modélisation de la réponse est réalisée à l'aide de techniques de régression qui permettent de relier une réponse « y » à un ensemble de facteurs « X_i » selon la relation suivante :

$$y = f(X_1, X_2, X_3 \dots \dots \dots X_k)$$

On peut avoir une bonne approximation de cette relation par un polynôme de second degré qui permet de décrire les phénomènes étudiés. Ce modèle inclut les effets linéaires, les effets d'interaction et les effets quadratiques des facteurs. Le modèle de surface des réponses du second degré peut s'écrire de la manière suivante :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

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

Une fois la modélisation effectuée, il faut valider les modèles obtenus. Pour cela, des analyses statistiques sont à considérer : le coefficient de détermination R^2 et le coefficient de détermination ajustée R^2_{adj} . Après l'étape de la modélisation, nous représentons le modèles graphiquement à l'aide des courbes des surfaces de réponse qui permettent d'observer le comportement des réponses en fonction des paramètres afin d'optimiser le système expérimental (paramètres de la réaction) [30].

Matériels et méthodes

Tableau (3): matériel et produit de l'expirions

Matériel	Produit	
ultrason	Matière sache (<i>Pulicaria crispa</i>)	folin-ciocalteu
rotavapour	méthanol	Na ₂ CO ₃
spectrophotométrie	H ₂ O	Acide gallique
Papier filtre	DPPH	Acide ascorbique

III-Echantillonnage

Les fruits de *Pulicaria crispa* étudiés proviennent de la région de Aflou située à la wilaya de Laghouat . En septembre 2018, les fruits ont été récoltés au stade final de leur maturité. 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 parties aériennes du *Pulicaria crispa* ont été broyées, tamisées et conservées dans des sacs en papier jusqu'à leurs utilisations.

III.1-Extraction par macération:

- **Principe:**

La méthode d'extraction utilisée pour les composés phénoliques est la macération. L'objectif de l'extraction est de libérer les substances phénoliques présentes dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. Ces derniers sont extraits par extraction solide-liquide en utilisant l'eau et le méthanol comme solvants, mais d'autres solvants peuvent être utilisés tels que l'éthanol, acétonitrile, l'acétone et l'acétate d'éthyle. La teneur en polyphénols est changée avec les conditions d'extraction: le temps de macération, la température, le ratio matière végétale/solvant et la concentration de solvant [31].

2- Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques

Il existe plusieurs paramètres qui influencent l'extraction des composés phénoliques: la méthode d'extraction, le choix du solvant, le volume du solvant, la dimension des particules, le temps d'extraction, l'acidité, la température...etc.

2.1 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.

a) La masse de l'extraction

A un temps de 15 min et un volume de méthanol de 20 ml, les échantillons ont été extraits avec des masses qui varient de 0.5 à 3g. Tous les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C.

b) Le volume du solvant

L'extraction a été effectuée en plusieurs séries de volume de méthanol dans un intervalle (20-100 ml). Tandis que le temps et la masse sont fixés à 15 min et 1,5g, respectivement. Les extraits ont été filtrés et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur à 45°C.

c) Le temps d'extraction

1,5g de poudre du *Pulicaria crispera* été mélangée avec 50 ml de méthanol pure et placée dans un appareil ultrasonique (Joident Ultrasonic- Cleaner, METO 5, Ningbo, Chine) avec un temps d'extraction qui varie entre (5 min à 35 min). L'extrait a été filtré et le méthanol a été éliminé à l'aide du rota-vapeur 45°C.

3. Dosage des polyphénols totaux:

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de *Pulicaria crispera* a été effectué par spectrophotométrie UV selon la méthode du réactif de Folin - Ciocalteu. Ce dosage est fondé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin - Ciocalteu consiste en une solution jaune acide (Ac) contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin - Ciocalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides d'où la formation d'un complexe bleu[32]

• Principe:

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales, et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules

4. Mode opératoire

500µl réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) ont été mélangés avec 500µl d'extrait après 2 minutes, 2ml de carbonate de sodium à 2% ont été rajoutés et l'absorbance a été mesurée à 760nm contre un blanc après 30 minutes d'incubation à 25°C.

4.1 Expression des résultats

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire $y = a x + b$ réalisé par un standard étalon « acide gallique » à différentes concentrations et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

5. Activité anti-radicalaire (DPPH) :

Le DPPH (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense, soluble dans du méthanol, fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques.

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 Diphényl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune [33].

5.1 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 :

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

Abs_C : Absorbance du contrôle (sans l'ajout de l'extrait) ;

Abs_E : 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_E : La quantité de l'échantillon utilisé en g (1g).

α : la pente de

5.2. Matrice d'expériences

Le modèle 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 02). Sur la base des données expérimentales, un modèle polynomial de second ordre correspondant au modèle Box-Behnken a été appliqué pour corréler la relation entre les variables indépendantes et la réponse pour prédire les conditions optimisées. Le modèle quadratique a été construit selon l'équation suivante [27]:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

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.

6. 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

IV. Résultats et discussion

IV.1. Extraction des composés phénoliques par ultrason

IV.1.1. Extraction par ultrason

Afin d'évaluer les conditions optimales et lancer une extraction par cette méthode, il nous faudra d'abord déterminer des conditions de départ.

2. Etudes préliminaires

Les études préliminaires permettent la détermination des niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimental utilisé afin de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des composés phénoliques pour chaque variable indépendante.

a) L'effet de différents masse d'extraction

L'influence de la masse du matière végétale sur le rendement en composés phénoliques totaux des extrais étudiés est illustrée dans la figure n°5. L'effet de la masse sur l'extraction des CPT des fruits du *Pulicaria crispa* a été évalué à l'aide de six rapports (0.5:20, 1:20, 1.5:20, 2:20, 2.5:20, et 3:20 g/ml) sur une période d'extraction de 15 min, (figure n°5). L'analyse statistique révèle une différence significative à $p < 0,05$ entre les différentes masses. La masse de 2 g de la matière végétale a donné un meilleur rendement en CPT avec un taux de $58,93 \pm 13$ mg EAG/g de MS, suivie par 1.5 g avec une teneur de $55,78 \pm 24$ mg EAG/g MS, alors que 0.5g a donnée le taux le plus bas de $34,69 \pm 12$ mg EAG/g de MS. De 2,5 à 3 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 du masse d'extraction de 3 g est accompagnée d'une diminution en CPT ($37,56 \pm 8$ mg EAG /g MS). D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'intervalle optimal concernant la masse est défini entre 1,5-2,5g

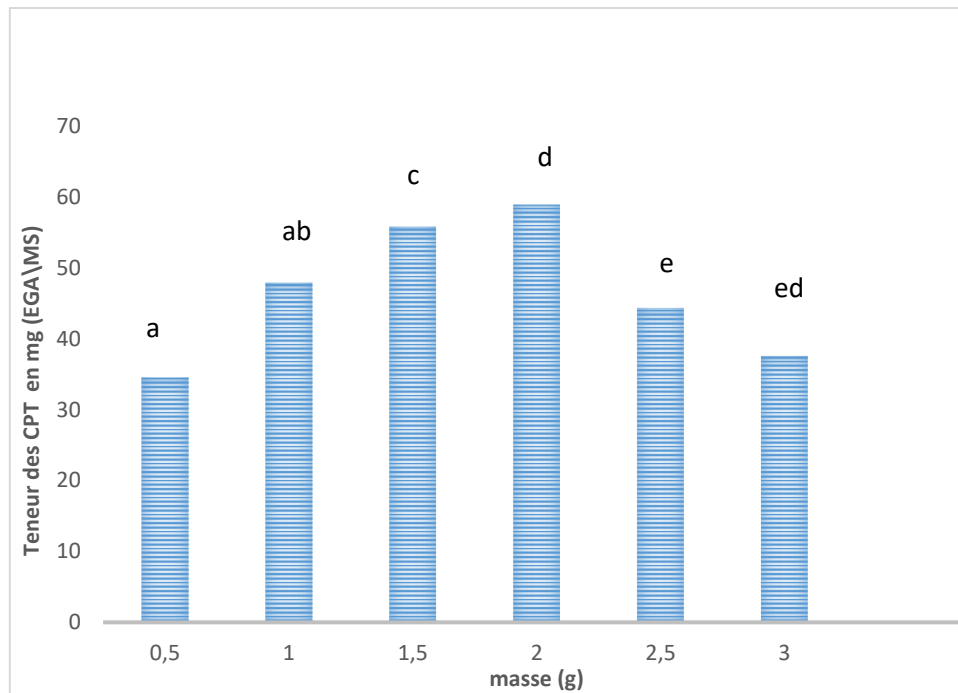


Figure 5 : Effet de différentes masses sur CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

b) L'Effet de rapport (masse /volume)

Le volume de solvant, ou rapport masse de poudre/volume de solvant, est un facteur influençant sur l'extraction de composés phénoliques, c'est pour ça on a procédé à différentes extractions avec différents volumes de solvant. La figure 6 montre les résultats de ces essais. L'effet de rapport sur l'extraction des protéines des fruits du *Pulicaria crispa* a été évalué à l'aide de Cinque rapports (2:20, 2:40, 2:60, 2:80 et 2:100 g/ml) sur une période d'extraction de 20 min et la température de 25°C, (figure n°). L'analyse statistique révèle une différence significative à $p < 0,05$ entre les différents rapports. Le rapport 2:80 g/ml a donné un meilleur rendement en composés phénoliques avec un teneur de 64,95 mg EA/g de MS, suivie par 2:60 g/ml avec une teneur de 59,78 mg AG/g MS, alors que 2:20 g/ml a donnée le taux le plus bas de 44,56 mg EAG/g de MS. De 2:80 à 2:100, les teneurs des composés phénoliques n'augmentent plus, ce qui veut dire que l'augmentation de solvant n'est pas utile pour extraire plus de composés protéiques. 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. Le rapport 2:80 a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 2:60 à 2:100 g/ml a été choisie pour les essais de MSR.

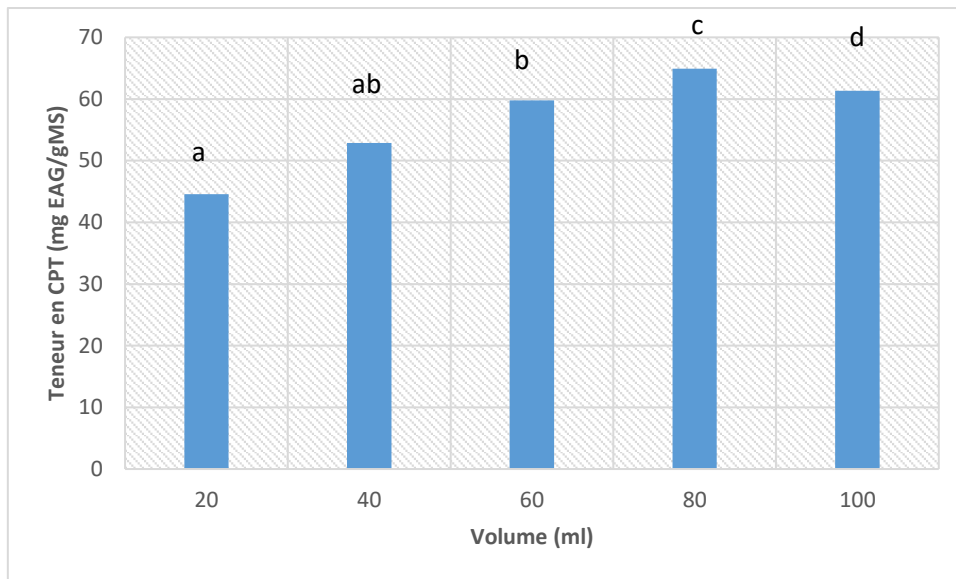


Figure 6: Effet volume sur l'extraction des CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$).

c) L'effet de différents temps d'extraction

Le temps de contact entre les deux phases est aussi l'un des paramètres les plus importants à maîtriser. Il correspond au temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact. Ce dernier peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et de cela influencer l'efficacité de l'extraction. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint. Dans notre cas, les temps d'extraction ont été de l'ordre de 5 minutes jusqu'à 35 minutes, les résultats sont représentés dans le graphe de la figure n°. Tandis que les autres conditions d'extraction ont été fixées comme suivantes : la température 25°C et le rapport (2g\100ml)

La teneur des composés protéiques des fruits du *Pulicaria crispa* atteint une valeur maximale de 45,78 mg EAG/MS à un temps d'extraction de 20 min. Au-delà de cette période, la teneur n'augmente plus, ce qui veut dire que le temps d'extraction prolongé n'est pas utile pour extraire plus de composés phénoliques. Cependant une exposition prolongée des rayonnements électromagnétiques pendant le processus d'extraction au ultrason peut mener à la dégradation thermique des composés phénoliques. L'étude statistique révèle une différence significative ($P < 0,05$) entre les teneurs en polyphénols extraites à différents temps d'extraction (5-25 min), qui varient entre 24,87 et 45,78 mg EAG/g de MS.

Le temps de 20 min a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 15-25min a été choisie pour les essais de MSR

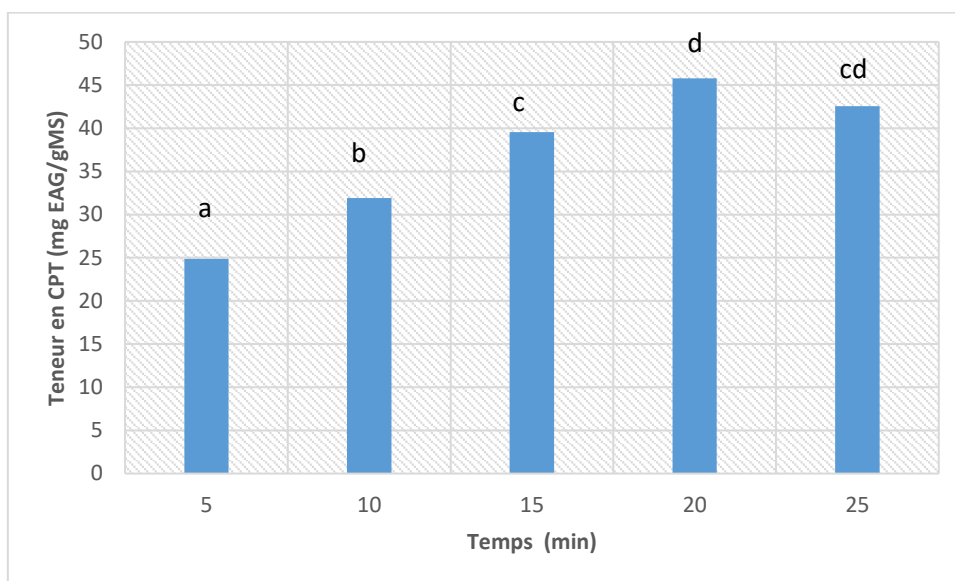


Figure 7: Effet de différents temps d'extraction sur les CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

IV.2. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénolique totaux

Trois facteurs, qui sont la masse (X_1), le volume d'extraction (X_2) et le temps d'extraction (X_3), ont été utilisé afin d'optimiser l'extraction par macération des polyphénols totaux du *Pulicaria crispera*.

Selon l'analyse présentée ci-dessus, il peut être déduit que toutes les variables mentionnées affectent l'efficacité et le rendement de l'extraction. Bien que ces effets aient été traités séparément, il convient de noter que, dans le système, elles interagissent. Le produit de l'interaction de ces variables se reflète dans le contenu phénolique des extraits obtenus.

Les principaux facteurs à prendre en compte durant l'optimisation sont présentés avec les conditions optimales respectives déterminées en fonction de l'étude réalisée.

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 2:

Tableau (4): Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques du *Pulicaria crispera*.

Variables		Niveaux		
		-1	0	1
Masse (g)	X ₁	1	1.5	2
Rapport (g/ml)	X ₂	60	80	100
Temps (min)	X ₃	15	20	25

IV.2.1. Plan d'expérience Box-Behnken

Les données expérimentales obtenues à partir des 15 essais illustrées dans le tableau 03 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 model choisi. Les résultats ont montré que la teneur en CPT varie entre 87,52 et 289 mg EAG/ g de matière sèche (tableau 03), ceux-ci ne font que confirmer que les facteurs (temps, volume et masse) ont une influence sur l'extraction de CPT.

Tableau (5): la matrice expérimentale de Box-Behnken pour trois facteurs (X_1 , X_2 et X_3) et leurs réponses CPT et DPPH, exprimé en (mg/g matière sèche).

Expérimental	Facteurs			Réponse	
	X_1 (g)	X_2 (ml)	X_3 (min)	CPT mg EAG/ g	DPPH mg EAAC/g
1	0	0	0	289	231,54
2	-1	0	1	87,52	176,08
3	1	-1	0	250,18	233,89
4	0	-1	-1	244,17	306,30
5	-1	-1	0	30,97	211,38
6	1	0	1	127,55	164,78
7	0	1	-1	202,32	40,73
8	0	0	0	259,59	242,53
9	1	1	0	41,35	219,14
10	1	0	-1	243,53	335,64
11	-1	1	0	100,09	257,41
12	0	-1	1	237,84	200,72
13	-1	0	-1	139,8	334,79
14	0	1	1	200,27	212,88
15	0	0	0	229,96	232,61

IV.2.2. Validation du modèle

Le modèle mathématique, dans les plans d'expériences, unit la réponse qui est dans cette étude la teneur en composés phénoliques aux facteurs qui ont un effet sur elle. Dans l'objectif d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

IV.2.3. Le coefficient de détermination (R^2)

Dans la présente étude, le coefficient de détermination (R^2) du model est égale à 0,98 (tableau 4), ce qui signifie qu'uniquement 2% des variations ne sont pas expliquées par le model. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajustée est de l'ordre de (R^2 ajusté =0.87), ce qui est assez élevé pour confirmer la haute significativité du model, sachant que le R^2 représente la valeur du coefficient de détermination (R^2) après élimination des termes (coefficient) inutiles du model. Un modèle contenant beaucoup de termes inutiles (non significatifs) auront une valeur de R^2 ajusté très inférieur à celle du R^2 [26].

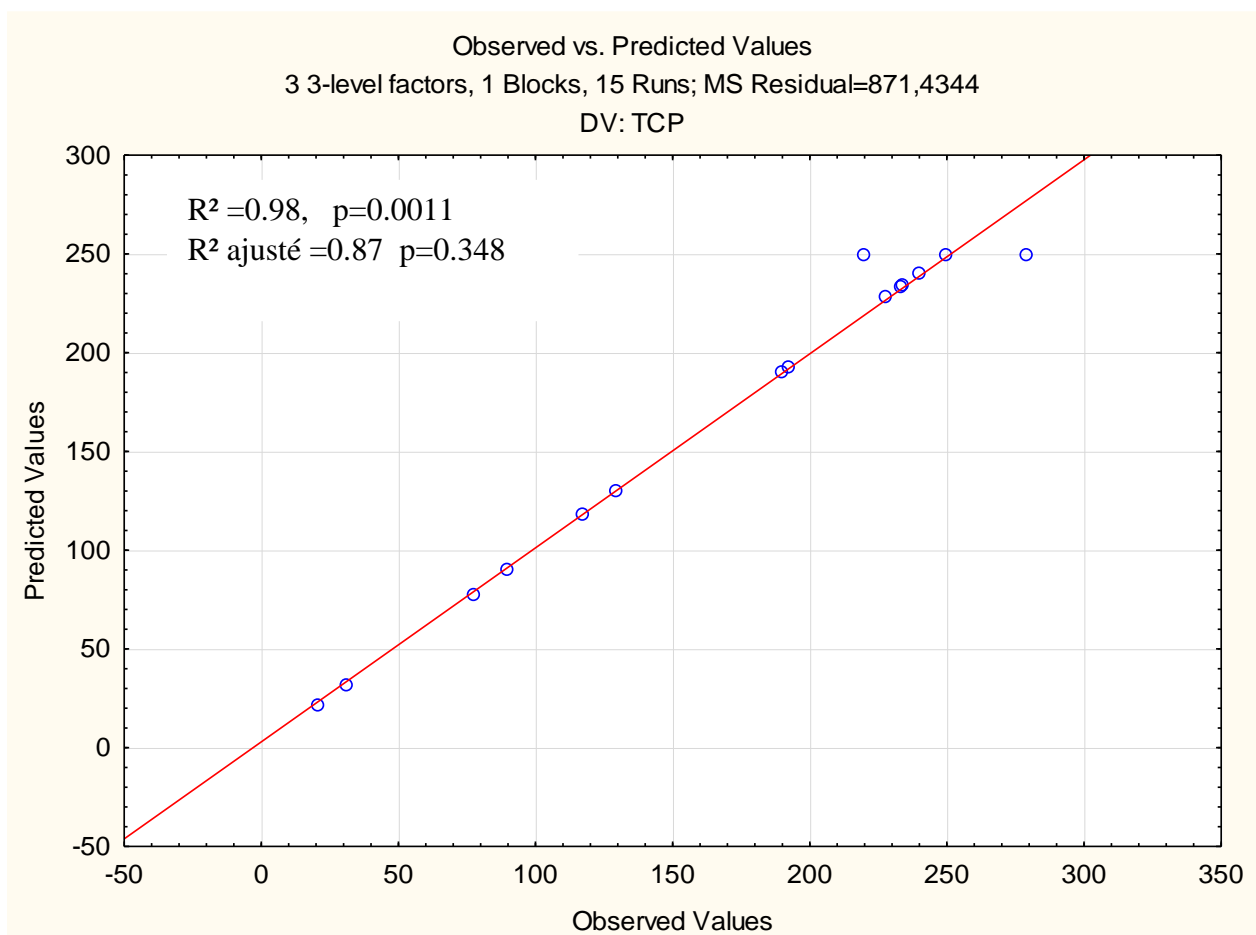


Figure 8: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

IV.2.4. Model global et manque d'ajustement

L'analyse de la variance de la régression du model (Tableau 6), montre que le model est très significatif ($p < 0,05$), 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 ($p > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme la validation du modèle.

Tableau (6) : L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre.

Régression	R²	R² (ajusté)	Rapport F du modèle	Prob.>F	Défaut d'ajustement (Rapport F)	Défaut d'ajust. (Prob.>F)
Y_{CPT}	0.98	0.87	108.45	<0.01	0.90	0.63
Y_{DPPH}	0.90	0.85	88.90	0.003*	34.56	0.834

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

IV.2.5. 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.

Les p-value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les plus petits p-value présentent la plus grande signification du facteur correspondant . Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 07

Tableau (7): Coefficients de régression et leurs significations statistiques.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
CPT				
constant				
b_0	148,79	64,99	4,33	< 0.0043*
linéaire				
b_1	77,45	56,90	3.77	0,006*
b_2	-59.80	40,78	-42.45	0.0017*
b_3	-57.83	30,67	-10.78	<0.987
interaction				
b_{12}	-138,49	45,78	-61.89	0.0379*
b_{13}	-31.85	56.91	-91.23	0.0132*
b_{23}	-1.44	26.91f	-0.05	0.0954
Quadratique				
b_{11}	112,70	38.31	3.38	0.0341*
b_{22}	41,16	45.01	7.21	<0.002*
b_{33}	-2,80	18.01	21.18	0,0547

Significatif avec $p < 0.05$.

IV.2.6. Analyse du modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné 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 fruits du *Pulicaria crispa* sont alors bien connues. Le modèle mathématique du BBD de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$\text{CPT} = 148,79 + 77,45 X_1 - 59,80 X_2 - 138,49 X_1 X_2 + 112,70 X_1^2 + 41,16 X_2^2 - 2,80 X_3^2$$

IV.2.7. 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 fruits du *Pulicaria crispa* est la masse d'extraction (X_1) et le rapport (X_2) avec une probabilité de $p = 0,0060$; et $0,0017$ respectivement, cependant l'impact est non significatif pour le facteur (X_3) à savoir le temps.

IV.2.8. 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 la masse d'extraction ($X_1 X_1$) avec $p = 0,0341$, contrairement à l'effet quadratique de temps ($X_3 X_3$) qui est non significatif avec $p = 0,0547$

IV.2.9. Analyse des surfaces de réponse

a) Masse -volume

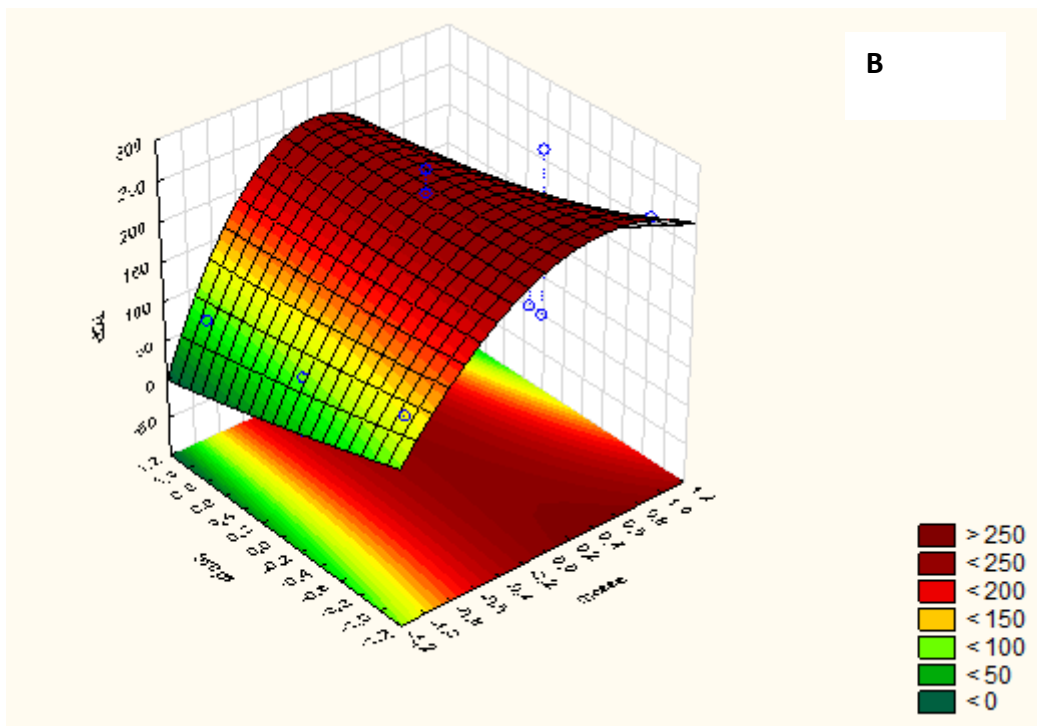
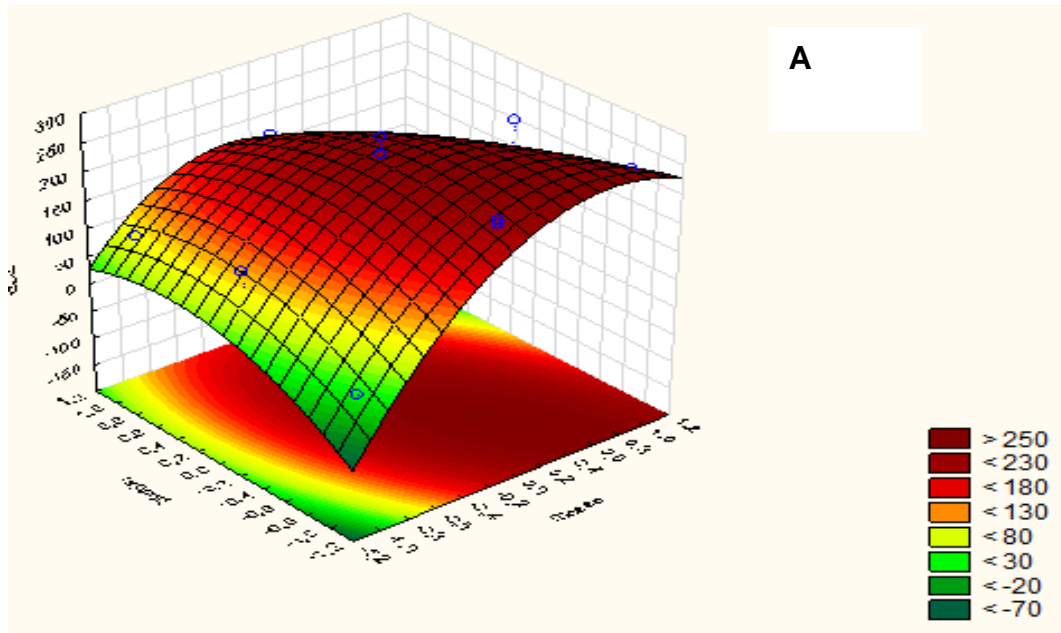
Le couple masse-volume (X_1X_2) influence d'une manière significative et joue un rôle important dans l'extraction des CPT avec $p=0,0397$. Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre la masse d'extraction, le volume et le taux d'extraction des CPT sont représentés dans la figure n°9A. Si on augmente la masse d'extraction et le volume et on fixe le temps à 20 min simultanément, la teneur en composés phénoliques augmente de 70 à 250 mg EAG/g donc la masse d'extraction et le volume augmentent proportionnellement avec le taux d'extraction des CPT.

b) Masse- Temps

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°9B. Les résultats obtenus montrent que le couple temps d'extraction et la masse (X_1X_3) présente un effet significatif avec $p=0,0132$. Une diminution de la teneur en composés phénoliques a été observée avec l'augmentation du temps d'extraction de 20-25 min et la masse de la matière sèche de 2-2.5g, mais la tendance a été renversée lorsque le rapport a atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 15-20 min et la masse de 1.5-2 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 [25].

c) Volume-Temps

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 9. Les résultats obtenus montrent que le couple le temps et le volume (X_2X_3) présente un effet non significatif avec $p=0,0954$. EAG/g. Les résultats montrent que la teneur en composés phénoliques diminue lorsque le temps varie de 20 à 25 min et le volume de 80 à 100 /ml. Si on augmente le temps de 15 à 20 min et on fixe le volume à 80 ml simultanément, la teneur en composé phénoliques augmente de 168 à 240 mg EAG /g.



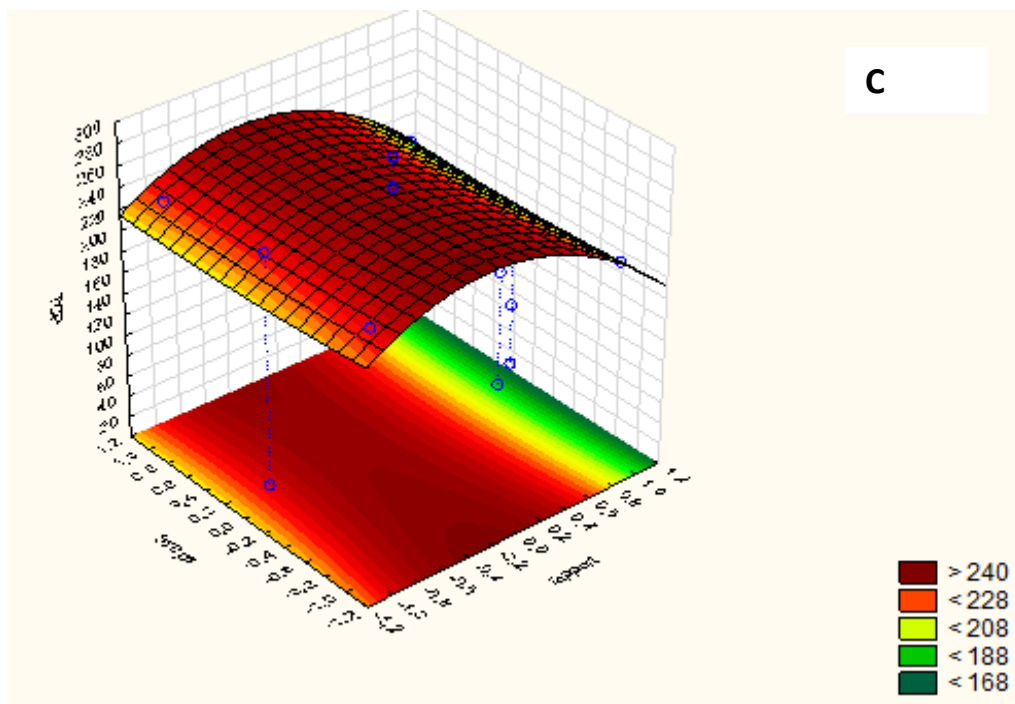


Figure (9): Surface de réponse pour les effets masse /volumes (A), la masse/temps(B) et volume/temps (C) sur le rendement des composés phénolique des fruits du *Pulicaria crispa*

IV.2.10. 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 08.

Tableau (8) : 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)
25	95	1,75	434,23

IV.3. Test d'évaluation d'activité antioxydante

IV.3.1. L'activité scavenger sur le radical DPPH

Le DPPH est un radical libre de couleur violette, il est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés antiradicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 515nm, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité [30]. 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 anti-radicalaire considérables variant de 40,73 à 334,59 mg EAAC/g de MS (tableau 5). Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, volume et masse) sur l'activité anti-radicalaire.

IV.3.2. Coefficient de corrélation

L'analyse statistique a montré que le coefficient de corrélation R^2 et celui d'ajustement sont de 0,90 et 0.85 respectivement qui sont proches de 1 et un manque d'ajustement du modèle qui est insignifiante à $p < 0,05$, indiquant que le modèle pourrait être utilisé pour prédire les résultats obtenus en terme de l'activité antioxydante (tableau 06).

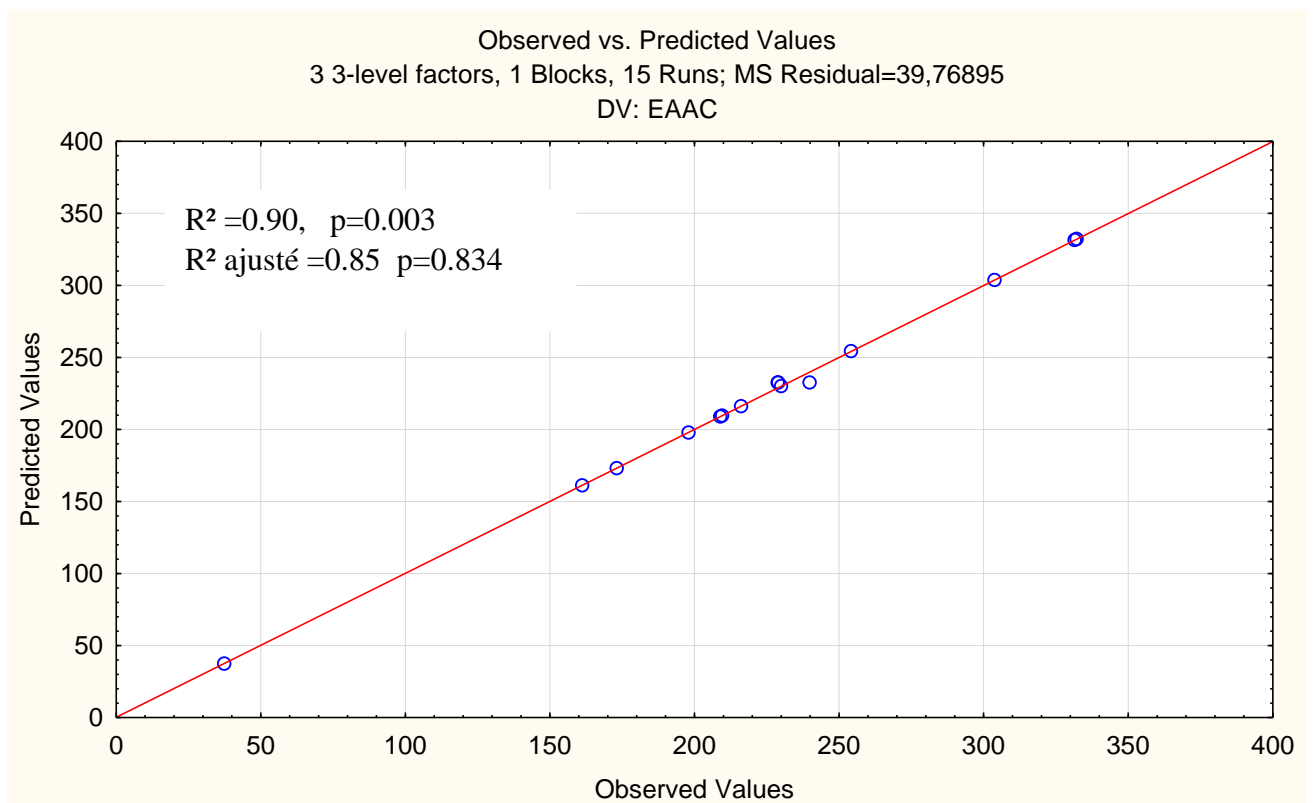


Figure 10: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

IV.3.3) Effet des facteurs (coefficients)

Les résultats du calcul des coefficients de régression estimés du modèle polynomial sont représentés dans le tableau 9.

Tableau (9) : Les coefficients de régression estimés du modèle polynomial du second degré.

Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
DPPH				
constante				
b_0	221,35	79.33	40.30	< 0.0001*
linéaire				
b_1	-7.53	35.02	-0.14	0,0224*
b_2	-32.00	15.12	45,89	0.0045
b_3	-98.74	25.42	-14	<0.005*
interaction				
b_{12}	-29.53	74.37	-4.56	0.0378*
b_{13}	-6.30	45.67	-7.11	0.0569
b_{23}	139	87.37	-9.23	0.0837
Quadratique				
b_{11}	-28,56	23.00	-8.67	0.0178
b_{22}	33,74	56.00	-3.10	0.0129*
b_{33}	11,60	66.00	4.84	0,0721*

Significatif avec $p < 0.05$.

IV.3.4 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 fruits du *Pulicaria crispa* sont alors bien connues. Le modèle mathématique du BBD de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$\text{DPPH} = 221,36 - 7.53 X_1 - 32. X_2 - 98.78X_3 - 29,53 X_1 X_2 - 6,30 X_1 X_3 + 139,06 X_2 X_3 - 28,56 X_1^2 + 33,74 X_2^2 + 11,60 X_3^2$$

IV.3.5 Effet quadratique

L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par le facteur de volume de méthanol ($X_2 X_2$) avec $p=0,0129$, il est suivi par l'effet quadratique du masse ($X_1 X_1$) avec $p=0,0178$, contrairement à l'effet quadratique du temps d'extraction ($X_3 X_3$) qui est non significatif avec $p=0,0721$.

IV.3.6. Analyse des surfaces de réponse

a) Masse -volume

La masse-volume de solvant ($X_1 X_2$) influence d'une manière significative et joue un rôle important dans l'activité scavenger sur le radical DPPH avec $p=0,0378$. Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le volume, le temps d'extraction et l'activité antiradicalaire sont

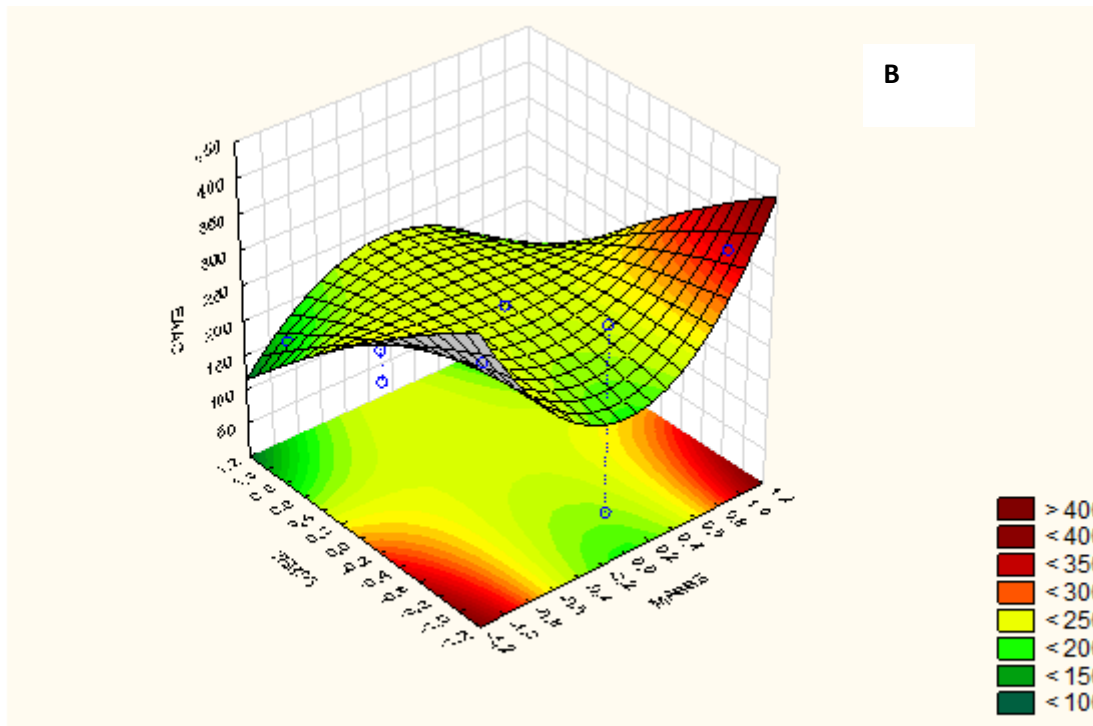
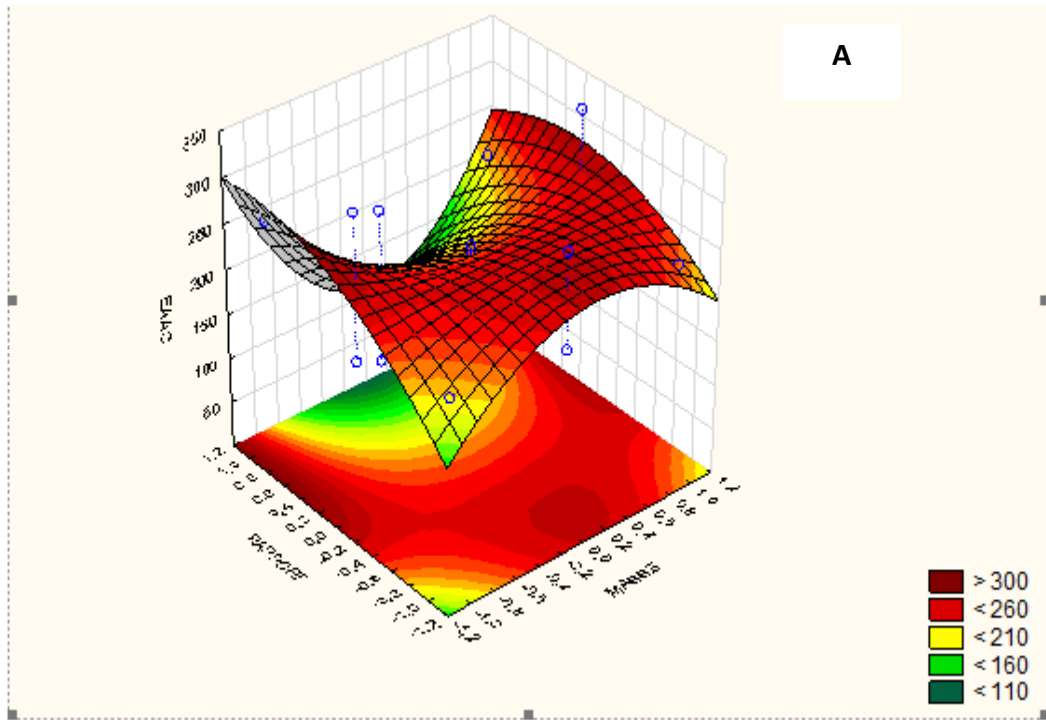
représentés dans la figure 11A. Les résultats montrent l'activité scavenger sur le radical DPPH accroît lorsque le volume varie de 60 à 80 ml et la masse d'extraction de 1-1,5 g. Mais si on poursuit l'extraction avec des niveaux très élevés pour chaque paramètre, l'activité antioxydante diminue de 300 à 110 mg EAAC/g de MS.

b) Masse –Temps

La figure 11B 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 $p=0,0569$. Une augmentation de l'activité antioxydante a été observée avec l'augmentation de temps d'extraction de 15-20 min et la masse de 1-1,5 g, mais la tendance a été renversée lorsque le rapport a atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 20-25 min et une masse de 1,5-2 g une diminution remarquable de l'activité antioxydante est constatée. Cela est due probablement à la dégradation des composés phénoliques (antioxydants) par les ondes électromagnétiques émet par l'ultrason.

c) Volume-Temps

La figure 11C montre la surface de réponse qui présente l'effet de volume et le temps d'extraction (X_2X_3) sur l'activité antioxydante. Les résultats obtenus indiquent que l'interaction volume-temps est non significative avec la probabilité supérieure à 0,050. Une diminution remarquable de l'activité antiradialaire a été constatée lorsque le temps d'extraction varie de 15 à 25 min et le volume de 60 à 100 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 antioxydants par les ondes électromagnétiques. Ce qui explique la valeur maximal de 300 mg EAAC/g de MS à un temps de 15 min et un volume de 60 ml, mais si on poursuit l'extraction avec des niveaux très élevés pour chaque paramètre, l'activité antiradialaire diminue de 300 à 20 mg EAAC/g de MS.



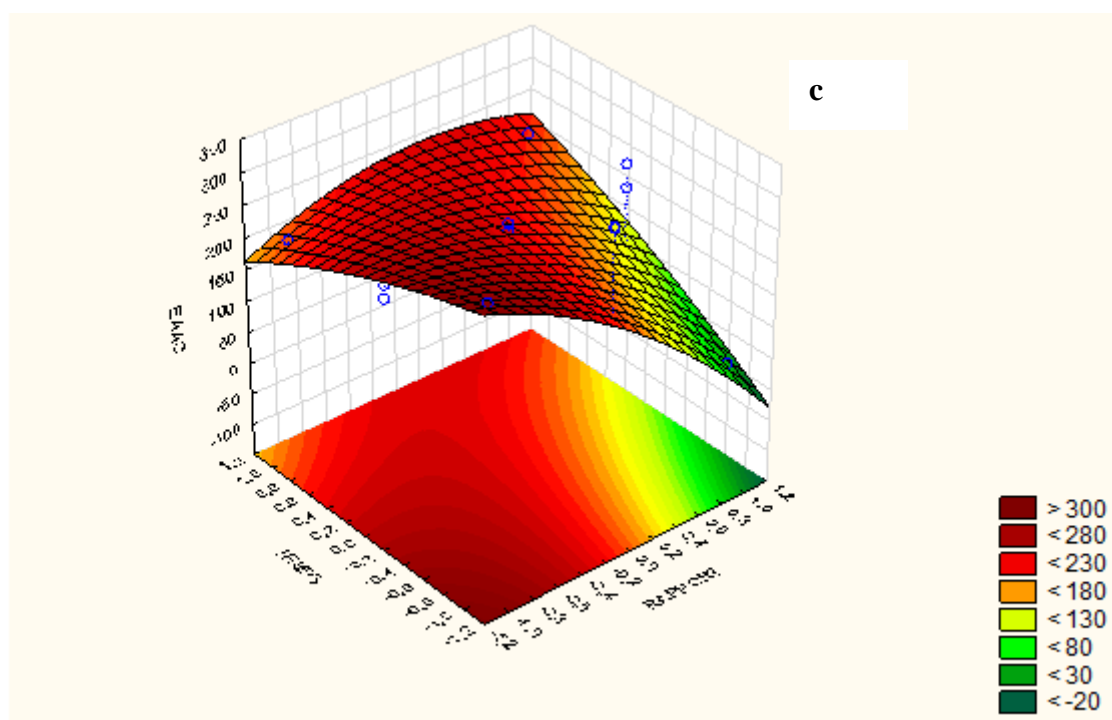


Figure 11: Surface de réponse pour les effets masse/volume (A), la masse/temps (B) et volume/temps (C) sur l'activité scavenger DPPH des fruits *Pulicaria crispa*

IV.3.7. Solution

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

Tableau (10) : 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)
22	78	1,5	4806

Conclusion

Conclusion générale

Pulicaria crisper renferme des potentialités pharmacologiques intéressantes dont la mise-à-jour pourrait donner à cet arbuste un nouvel essor. Cependant, *Pulicaria crisper* et notamment les produits qui en sont dérivés, ne sont pas valorisés comme ils devraient l'être en Algérie.

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à l'étude des fleurs de cette espèce qui est présente sur tout le pourtour du bassin méditerranéen, tout en essayant d'apporter les conditions d'extraction des composés bioactifs (composés phénoliques) qu'elles contiennent par une optimisation en utilisant le plan de surface de réponse.

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 poudre des fruits de *Pulicaria crisper*.

La présente étude a pour but d'optimiser l'extraction des antioxydants par le dosage des composés phénoliques des extraits de poudre des fruits de *Pulicaria crisper*.

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 statistiquement significatif $p < 0,05$.

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

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

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

Le plan box-Benken a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction ; composés phénolique (matière végétale 1.75g à un volume méthanol 95 ml pendant un temps d'extraction de 25 min) et l'activité antiradicalaire (1,5g à un volume de méthanol 78 ml pendant un temps d'extraction de 22 min)

En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- ✚ Utiliser des techniques d'analyse avancées (CCM, HPLC, CPG, ...) pour identifier les :
 - ✚ antioxydants de l'extrait.
 - ✚ Déterminer l'activité antibactérienne vis-à-vis d'autres souches bactériennes.

- ✚ Étudier les autres activités biologiques (in vivo) de l'extrait optimal; anti-inflammatoire, antimutagène, anticancérogène...etc. de l'extrait optimal.
- ✚ Élargir l'échantillonnage pour l'ensemble du territoire national; et analyser l'effet de l'origine géographique sur la composition en antioxydant, et sur leur activité biologique.
- ✚ L'optimisation d'extraction par des autres méthodes.

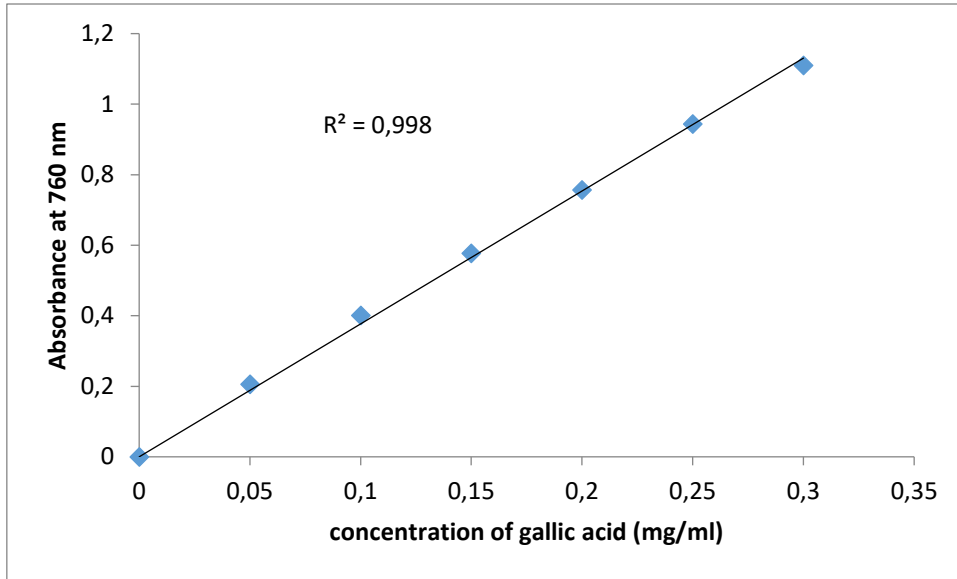
Références bibliographiques

- [1] SANAGO, R. (2006). "Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle Université Bamako (Mali) 53, 1p.
- [2] CHIBANI, S. (2013). "Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien."
- [3] BABA AISSA. F. (1990) Les plantes médicinales en Algérie , LE MONDE DES PHARMACIENS ,3p.
- [4] GAUSSEN, H. et H. LEROY (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed, Masson,2p.
- [5] HELLER, W. et GEIGER, H., (1988), "The Flavonoids Advances in Research Since 1980, Harborne", J.B.(Eds), Chapman and Hall, London. , 399.
- [6] MARKHAM, K.R., (1996), "Method in Plant Biochemistry", Académie Press Limited, (1989), 198. ls", Carcinogenesis, V.17, n°11, 2385-2387.
- [7] ZOGHET M.F. et AL-ALSHEIKH A. (1999). Wild plants in the region of riyadh. King saud university press, Riyadh, Saudi Arabia, pp: 194-195.
- [8] CHAUDHARY S.A. (2000). In: Flora of the kingdom of saudi arabia (Part 3), vol. 2. Ministry of Agriculture and Water, Riyadh, Saudi Arabia, pp : 432.
- [9] QAID M Al-Hajj N.,WANG H X.,MA C.,LOU Z.,BASHARI M. et THABIT R.(2014). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (Pulicaria inuloides-Asteraceae and Ocimum forskoleiLamiaceae).Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13 (8): 1287-1293.
- [10] MOTHANA R.,GRUENERT R.,BEDNARSKI P.J. et LINDEQUIST U.(2009). Evaluation of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of some Yemeni plants used in folk medicine. Pharmazie 64: 260–268.
- [11] RIBERAU GAYON, P., "Les Composes Phénoliques des Végétaux", Dunod, Paris, (1968), 254.
- [12] FORGET RICHARD, F.C., ROUET M, M.A., GOUPY, P.M., PHILIPPON, J. et NICOLAS, J., (1992),"Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-Methylcatechol in Model Solution by Apple Polyphenol Oxidase", Journal of Agricultural and Food Chemistry, V.40, 2114-2122.

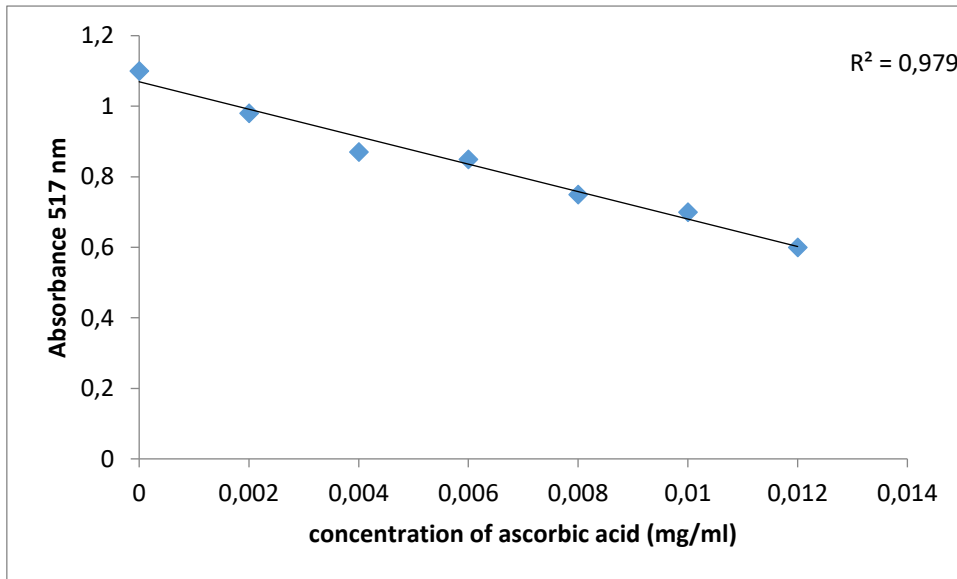
- [13] FORGET RICHARD, F.C. et GAUILLARD, F.A., (1997), "Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-Methylcatechol in Model Solution by Combinations of Pear (Pyrus Communis Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase : A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.45, 2472-2476.
- [14] KADER, F., ROVEL, B., GIRARDIN, M. et METCHE, M., (1997), "Mechanism of Browning in Fresh High Bush Blue Berry Fruit (Vaccinium Corymbosum L), Rôle of Blue Berry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V.74, 31-34.
- [15] MACHEIX, J.J., FLEURIET, A. et BILLOT, J., (1990), "Fruits Phenolics -I-", CRS Press, Boca, 378.
- [16] FANKEL, E.N., WATERHAUSE, A.L. et KINSELLA, J.E., (1993), "Inhibition of Human LDL Oxidation by Resverstrol", *The Lancet*, V.341, 1103-1104.
- [17] JANG, M., Cai, L. et VDEANI, G.O., (1997), "Cancer Chimiopreventive Activity of Resverstrol, A Natural Product Derived from Grapes", *Science*, V.275, 218-220.
- [18] HARBORNE, J.B., (1975), "The Flavonoids", Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London.,.
- [19] TABARAKI, R. et NATEGHI, A. (2011). «Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology,» *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18: 1279–1286.
- [20] PRASAD, K. N., HASSAN, F. A., YANG, B., KONG, K. W., RAMANAN, R. N., AZLAN, A. et 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.
- [21] JENNAN, S., FARAH, A. et MAHJOUBI, F. (2014). «Optimisation of ultrasound assisted extraction of T.hyemalis using the response surface methodology,» *J. Mater. Environ. Sci.*, 6(13): 773-778.
- [22] AL-FARSI, M.A., Lee, C.Y., (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108, 977-985.
- [23] EL-ADAWI, H. Y. ABDEL-F. (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

- [24] 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*
- [25] LIU, M. et ZHAO Z. (2009). Germplasm resources and production of jujube in China. *ISHS Acta Horticulturae*, 840: 25 – 32.
- [26] TINSSON, W. (2010). *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67). Springer Science & Business Media.
- [27] EVANS, J. L. (2012). "Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance?" *Indian Journal of Medical Research* 125(3): 355.
- [28] MARTIN S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51: 304-315.
- [29] CHAGNON P. (2015). Plans d'expériences (partie 1) : Principes généraux. Contrôles Essais Mesures, 11: 69-72p.
- [30] TELLI, A., N. Mahboub. (2014). "Optimisation des conditions *dactylifera L*" variété ghars." *Annales des Sciences et Technologie* 2(2): 107-114.
- [31] GEE J.M., Johnson I.T. (2001) Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 1-182

Annexes



Courbe standard d'acide Gallique



Courbe standard de l'acide ascorbique