

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم علوم المادة

DEPARTEMENT Sciences de la Matière



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : chimie organique appliquée

Par :

M^{lle} .BERNOU Waffa

M^{lle} .BADAOUI Lalia

THEME

**Application de la Méthode des Surfaces de Réponse (MSR) pour
l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des
feuilles du « *A. radiata Asteracea* »**

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

M^r . GUIBADJ Abdenacer

Pr

Président

M^{me} .Ami Yasmina

MAA

Examinatrice

M^r .Sebiane Sofiane

MAA

Examinateur

M^r .Ben Ahmed Ziyad

MCA

Rapporteur

Année Universitaire : 2018- 2019

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le dieu nos créateur. Nous tiens à exprimer toute nos gratitude et reconnaissance à notre encadreur Dr.Benahmed ziyad. qui d'avoir accepté de diriger ce travail et, d'avoir mis à nos disposition tous les moyens qui permis de mener à terme cette étude et aussi pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent également à tous ce qui nous avons aidé faire aboutir ce travail. Enfin, à tous les étudiants de notre promotion et nous souhaitons le bon courage à tous les étudiants pour finir ces études, et à tous les enseignants de DEPARTEMENT Sciences de la Matière

Dédicaces

Je dédie ce travail :

Celui qui n'a cessé de m'aider avec son indéfectible soutien :

Au terme de toutes ces années d'étude, je dédie ce modeste travail en signe de respect et de remerciement, à ceux qui ont donné un sens à mon existence qui m'ont soutenu jours et nuits durant tout mon parcours. A vous très chers parents, je vous dis merci pour votre soutien moral et financier et surtout pour vous ma très chère mère pour tous ses sacrifices, sa patience, sa confiance et son amour.

Mon cher père celle qui a été bougie allumant vers la réussite

A Mes très chères sœurs

A Mon très chers frère

A Mes amis badaoui lalia , hada bouhouia ,ben hourma bouthiana

Dédicaces

A celle qui m'a soutenue nuits et jours ,et durant tout mon parcours Très

chère mère je te dis: merci.

A la mémoire de mon père: ton souvenir toujours vivace dans mon cœur

m'a soutenue tout au long de ce travail.

A mes sœurs Houaria ;Souad, Hanan

A mes chers frères Mohamed, Mustapha, Habib, Karim

A ma binôme Bernou wafa et tous mes amis

A toutes les mains qui m'ont été tendues...

A toute la promotion chimie organique 2019-2020.

Liste des abréviations

ANOVA	: <i>analyse de variance</i>
Ac.G	: <i>Acide gallique.</i>
BBD	: plan de box behnken design
CCD	: plan composite centre de design
DPPH	: 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl.
E.D	: <i>Eau distillée</i>
F.C	: <i>Folin – Ciocalteux</i>
FVT	: <i>flavonoïde totaux</i>
MSR	: Méthode de surface de réponse
PBB	: plan box behnken
R²	: <i>Coefficient de détermination.</i>
R² ajusté	: <i>Coefficient de détermination ajusté.</i>
CPT	: Composés phénoliques totaux.

Liste Figures

Figure n°01	: <i>Anvillea radiata</i>	04
Figure n°02	:Structures des acides hydrox benzoïques	07
Figure n°03	:Structures des acides hydrox cinnamiques	07
Figure n°04	:Structure chimique des flavonoïdes	08
Figure n°05	:Quelques structures des flavonoïdes	08
Figure n°06	:Structure chimique d'un anion phénoxyde	09
Figure n°07	:Mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques	10
Figure n°08	:Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique	11
Figure n°09	:Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs	14
Figure n°10	:Extraction par ultrason	16
Figure n°11	:Réaction d'une structure polyphénolique avec le radicale DPPH	19
Figure n°12	:Effet de différents temps d'extraction sur les CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)	21
Figure n°13	:Effet volume sur l'extraction des CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)	22
Figure n°14	:Effet de différentes masses sur CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)	24
Figure n°15	:Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues	27
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 phénolique des feuilles du <i>Anvillea radiata</i>	31
Figure n°17	:Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues	32
Figure n°18	:Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur le rendement des composés flavonoidiques des feuilles du <i>Anvillea radiata</i>	35
Figure n°19	:Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps (B) et volume/masse (C) sur l'activité scavenger DPPH des feuilles du <i>Anvillea radiata</i>	39

Liste tableaux

Tableau 01	:Classification systématique d' <i>Anvillea radiata</i>	04
Tableau 02	:La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour 3 facteurs	15
Tableau 03	:Les domaines expérimentaux des facteurs étudiés dans l'optimisation des composés phénoliques des feuilles du <i>Anvillea radiata</i>	25
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	26
Tableau 05	:L'analyse de la variance des modèles polynomiaux de second ordre	27
Tableau 06	:Coefficients de régression et leurs signification statistiques	29
Tableau 07	:Conditions optimales d'extraction des composés phénoliques par ultrason	31
Tableau 08	:Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré	32
Tableau 09	:Conditions optimales d'extraction des composés flavonoidiques par ultrason	35
Tableau 10	:Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré	37
Tableau 11	:Conditions optimales de l'activité scavenger DPPH par ultrason	39

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01

Sommaire

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les plantes étudiées

Présentation des plantes Asterasae	03
I.1- Famille des Astéracées	03
I.1.2. Generalite sur plant <i>Anvillea radiata</i>	03
I.1.2.1. Description botanique	03
I.1.2. 3.1. Classification botanique des plantes étudiées	04
I.1.2. 3.2. Noms vernaculaires	04
I.1.2.4. Répartition géographique	04
I.1.2.5. Utilisation traditionnelle	05
I.1.2.5. 1.Effets thérapeutiques	05
I.1.2.6. Composition chimique	05

Chapitre 2 : Composés phénoliques

I.2. Métabolites secondaires	06
I.2.1. Composés phénoliques	06
I.2.1. Acides phénoliques	06
I.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques	06
I.2.2. Flavonoïdes	08
I.2.2. 1. Classification	08
I.2.3. Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres.	09
I.2.3.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols	09
I.2.3.2. Mécanismes d'action contre les radicaux libres	09
I.3. Méthodes d'extractions des composés bioactifs à partir des plantes	10
I.3.1.Méthodes classiques	10
I.3.2. Méthodes alternatives	11

I.3.2. 1. Extraction assistée aux ultrasons	11
---	----

Chapitre 3 :méthode de surface de réponse

I.4- Généralités sur les plans d'expériences	13
I.4.1- Définition	13
I.4.1.1. Principe	13
I.4.1.2. Terminologie	13
I.4.2.Plans pour surfaces de réponse (RSM)	13
I.4.3. Plan de Box-Behnken à trois facteurs	14
I.4.3.1. Définition du plan de Box- Behnken	14
I.4.3.2. Description du plan	14

Matériels et méthodes

II- Matériels et méthodes	16
II.1 – Récolte	16
II.1.1 - Préparation des échantillons	16
II.2- Protocole utilisé pour l'extraction	16
II.2.1- Modèle expérimental	17
II.2.2- Expériences a un facteur	17
II.2.2.1- Temps d'extraction	17
II.2.2. 2- Le volume de solvant	17
II.2.2. 3- La masse de l'extraction	17
II.3- Dosage des composés phénoliques	17
II.3.1- Dosage des phénols totaux	17
II.3.2- Dosage des flavonoïdes	18
II.3.3- Test DPPH (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)	18
II.3.3.1- Mode opératoire	19
II.4- Application du plan d'expérience	19
II.5- Analyse statistique	20
Résultats et discussion	21
III Résultats et discussion	21
III.1- Extraction des composés phénoliques par ultrason	21

III.1.1- L'effet de differents temps d'extraction	21
III.1. 2- L'effet de volume de solvant	22
III.1.3 - L'effet de defferent masse d'extraction	23
III.2- Optimisation des conditions d'extraction des composés phénolique totaux	24
III.2.1- Plan d'expérience Box-Behnken	25
III.2.2- Validation du modèle	27
III.2.3- Modèle mathématique	28
III.2.4- Effet des facteurs (coefficients)	28
III.2.5- Effet linéaire	29
III.2.6- Effet quadratique	30
III.2.7- Analyse des surfaces de réponse	30
III.2.7.1-Temps-volume ($x_1 * x_2$)	30
III.2.7.2-Temps-masse($x_1 * x_3$)	30
III.2.7.3-Volume-masse($x_2 * x_3$)	30
III.2.8- Paramètres optimaux	31
III.3- Optimisation des conditions d'extraction des composés flavonoidiques	32
III.3.1- Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoides	32
III.3.2- Coefficient de corrélation	32
III.3.3- Effet des facteurs (coefficients)	33
III.3.4- Analyse du modèle mathématique	33
III.3.4- 1Effet lineaire	34
III.3.4.2- Effet quadratique	34
III.3.4.3- Effet d'interaction	34
III.3.5- Analyse des surfaces de réponse1	34
III.3.5.1-Temps-volume ($x_1 * x_2$)	34
III.3.5.2-Temps-masse($x_1 * x_3$)	34
III.3.5.3-Volume-masse($x_2 * x_3$)	34
III.4- Parametre optimaux	35
III.4.1- Test d'évaluation d'activité antioxydante	36
III.4.1.1- L'activité scavenger sur le radical DPPH	36
III.4.2- Coefficient de corrélation	36
III.4.3- Analyse du modèle mathématique	36
III.4.2.1- Effet de facteurs(coefficients)	36

III.4.3.1 1- Effet lineaire	37
III.4.3.2- Effet quadratique	38
III.4.3.3- Analyse des surfaces de réponse	38
III.4.3.3.1- Temps-volume ($x_1 * x_2$)	38
III.4.3.3.2- Temps-masse($x_1 * x_3$)	38
III.4.3.3.3- Volume-masse($x_2 * x_3$)	38
III.4.4- Solution	39
Conclusion	40
référence	41

Introduction générale

I. Introduction

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité [1]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90% de la médecine traditionnelle en Afrique.

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques et restent très peu explorés, autant d'un point de vue phytochimique que d'un point de vue pharmacologique [2].

L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie [3]. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. A titre indicatif, les alcaloïdes font partie de ces composés et sont, à faibles doses, dotés de propriétés pharmacologiques et toxicologiques remarquables. De même, les polyphénols, forment un groupe très diversifié de molécules dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies [4].

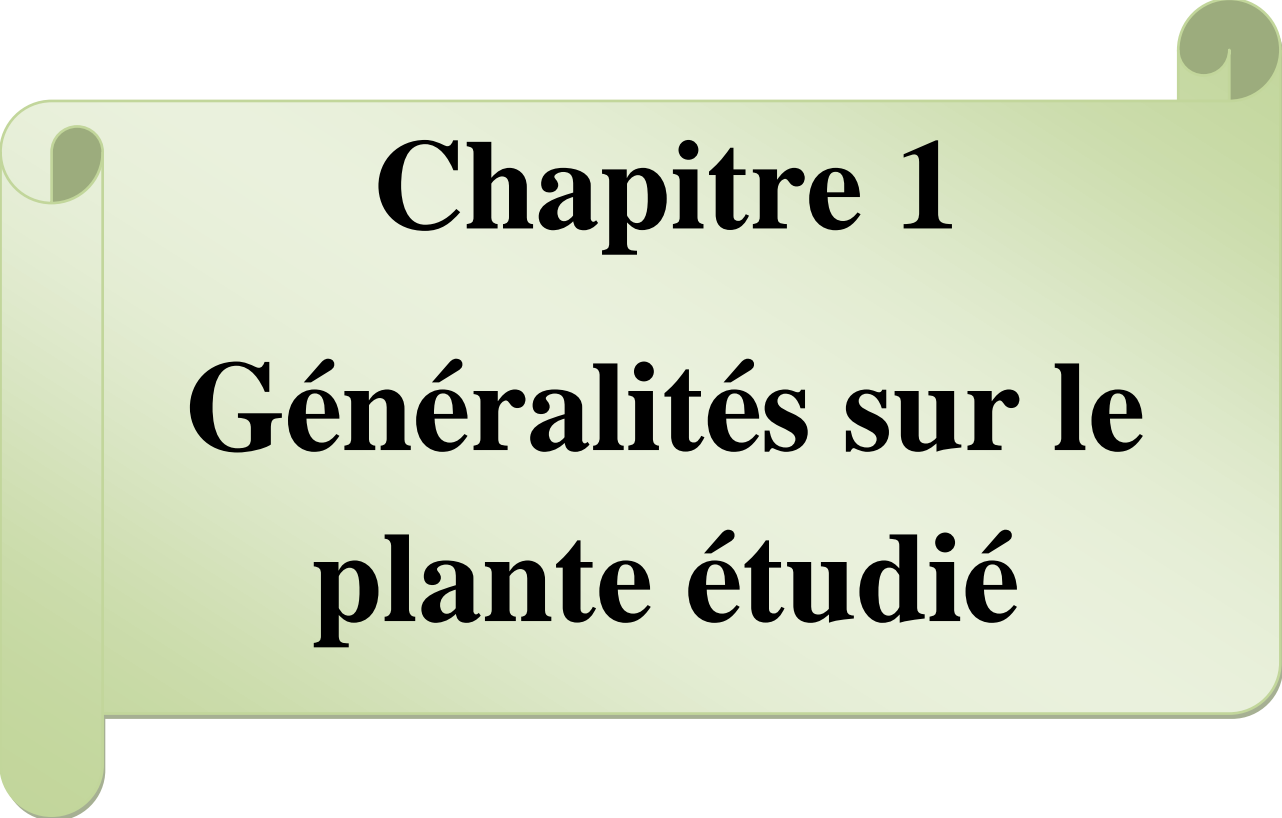
Les extraits bruts, naturels de ces composés et l'isolement à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle, peuvent être des ressources de nouveaux médicaments [5]. Ainsi, les plantes peuvent être considérées comme des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent, entre autres, une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannins condensés...) [5].

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à une espèce de la famille des Astéracées. La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce d' *Anvillea radiata* provenant de différentes régions de Constantine (Nord-Est Algérie).

Le but de cette étude est de doser les teneurs en composés bioactifs tels que les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes. Et pour évaluer l'influence des différents paramètres expérimentaux (solvant, temps, température) sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante, on a procédé à une optimisation afin de déterminer les conditions optimales d'extraction de ces derniers afin d'obtenir le meilleur rendement en composés phénoliques et la meilleure activité antioxydante.

Dans ce contexte nous avons réalisé un travail comprenant trois chapitres, le premier est une étude bibliographique qui comporte une description de la plante étudiée, des généralités sur les polyphénols et certaines méthodes d'extractions de ces composés. Le deuxième chapitre illustre la partie expérimentale qui se divise en deux axes : L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de la plante étudiée par une méthode d'extraction (Ultrasons), puis l'étude du pouvoir antioxydant. Le troisième chapitre est consacré à la présentation, l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus par la méthode de surface de réponse (MRS) développée par le plan de Box Behenken (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.



Chapitre 1
Généralités sur le
plante étudié

I. Présentation des plantes Astéracées

I.1. Famille des Astéracées

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur [6]. Les Astéracées (Asteraceae) sont une grande famille de plantes dicotylédones, appelées aussi Composées ou, plus rarement des Composacées. En effet, ce que l'on prend à première vue pour des « fleurs » chez ces plantes est en réalité composé de fleurs minuscules, réunies en inflorescences appelées capitules. (Dictionnaire de l'Académie française, 2016).

Ce sont des plantes herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes. Elle comporte plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [7]. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces [8]. Une des propriétés typiques de cette famille est sa richesse en composés naturels divers, on y trouve des terpénoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes [9]. La famille *Asteraceae* est parmi les familles les plus représentatives en nombre d'espèces, elle renferme plus de 30 espèces [10]. Les feuilles sont le plus souvent alternées, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées [11]. Les fleurs sont généralement dissemblables dans un même capitule, celles du centre ayant à la fois étamines et pistil tandis que celles de la périphérie sont ordinairement et uniquement femelle. Les fruits sont des achènes, c'est-à-dire des fruits secs, indéhiscent et contenant chacun une seule graine [9].

I.1.2. Généralité sur plant *Anvillea radiata*

I.1.2.1. Description botanique

Plante arbuste très rameux, boisé, en masse embranché, 20-50 cm de haut. Feuilles ; petites, rudement triangulaires, avec un grand pétiole et un membre fortement denté, un grands capitules solitaires ont un diamètre de 3-5 cm avec de longues ligules. Fleurs ; sont toutes jaune-orange, l'extérieur ceux 25 millimètres. Le fruit est un non-fleshy; cypsella prismatique indéhiscent (achène de deux carpelles). Il fleurit habituellement au printemps, mais peut fleurir tout au long de l'année [12].



Figure 1: *Anvillea radiata*

I.1.2. 3.1. Classification botanique des plantes étudiées

La classification systématique d'*Anvillea radiata* est détaillée dans le **Tableau1** (si Dessous).

Tableau1 : Classification systématique d'*Anvillea radiata* [8]

Embranchement	Spermatophyte
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae.
Genre	<i>Anvillea</i>
Espèce	<i>Anvillea radiata</i>

I.1.2. 3.2. Noms vernaculaires

Nom vernaculaire en arabe : Nougd . [4]

I.1.2.4. Répartition géographique

Est une plante arbuste très rameux, endémique du Sud-ouest Algérien et Sud-est Marocain, [13]. Cette espèce accepte une large variété d'états de sol et se développe sur les sols caillouteux des oueds, sur les regs environnants (plateaux rocheux répandu avec de petits cailloux) et dans les dayas. Elle prospère en conditions climatiques graves à moins de 100 millimètres de précipitations par année [14].

I.1.2.5. Utilisation traditionnelle

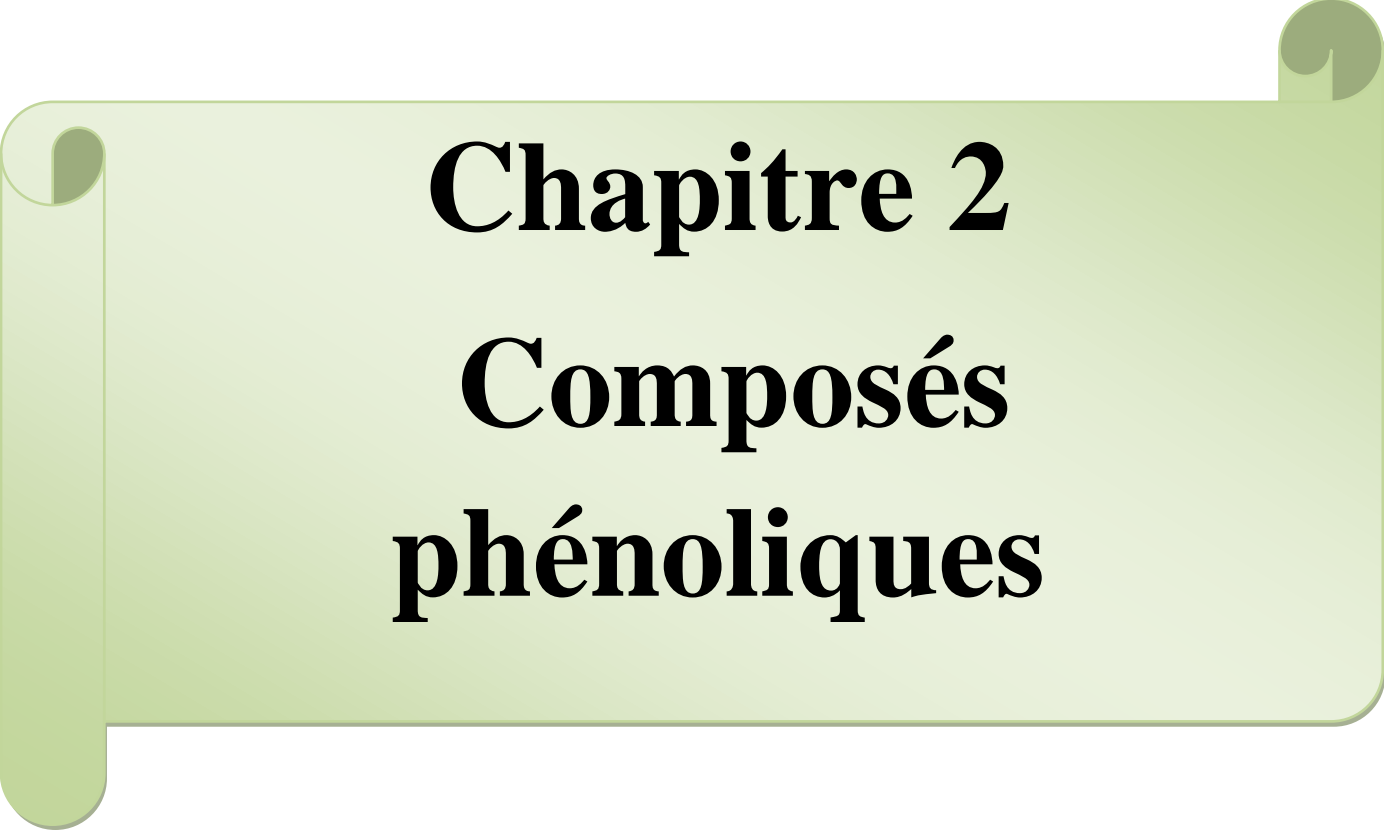
Cette plante est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies comme le diabète, l'indigestion, les courbatures, le refroidissement pulmonaire, ainsi que, pour le traitement des gastro-entérites, des spasmes et colique, des arthrites et des rhumatoïdes [15].

I.1.2.5. 1.Effets thérapeutiques

Selon la tradition locale, l'infusion (ou la macération) des feuilles et des tiges sont utilisées dans le traitement des pathologies broncho-pulmonaires (refroidissement pulmonaire) et digestive. Les pousses d'*A. radiata*, en infusion à froid ou chaud, sont utilisés comme remède contre le diabète, Traite les maux de l'estomac ; contre le microbe de l'appareil génital des femmes, Contre la toxicité [15].

I.1.2.6. Composition chimique

Sur le plan composition chimique, peu d'étude ont été réalisées sur cette plante. Dans ce sens [16] ont montré que cette plante est un réservoir riche en phytoconstituants tels que les Alcaloïdes, saponins, Terpènes, Tanins, Flavonoïdes, Steroïdes et les Cardenolides. De même 13 flavonoïdes dont 4 aglycones et 9 flavonol glycosides ont été isolés [17].



Chapitre 2
Composés
phénoliques

I.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires (MS) sont des molécules organiques complexes synthétisées par Les plantes autotrophes [18]. Ce sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) [19]. Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante [20]. Bio synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème [21]. En 1987 Plus de 8500 métabolite secondaire sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) [21].

I.2.1. Composés phénoliques

Les polyphénols sont des antioxydants très répandus dans le règne végétal, leur structure de base est constituée d'un noyau benzénique lié à une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres, ils possèdent plusieurs fonctions biologiques telles que la protection contre le stress oxydatif et les maladies dégénératives [22].

Les polyphénols sont très nombreux, plus de 8000 structures identifiées; ils sont classés selon la complexité du squelette de base, le degré de modifications de ce squelette et les liaisons avec d'autres molécules, suite à cette différence de structure, les polyphénols sont classés en quatre groupes voir les acides phénoliques, flavonoïdes, tannins et lignines [23].

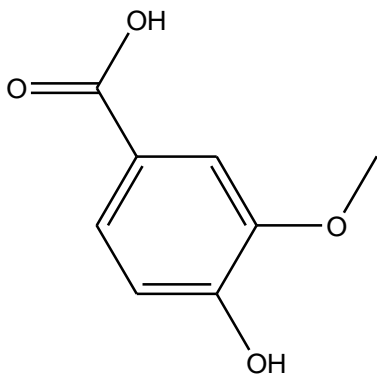
I.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques qui possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La dénomination acide phénolique est réservée aux dérivés des acides benzoïques (C6-C1) et cinnamiques (C6-C3) [24].

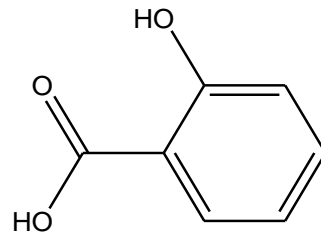
Les acides phénoliques sont repartis en deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques. La figure 2 illustre la structure de quelques acides hydroxybenzoïques.

I.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques

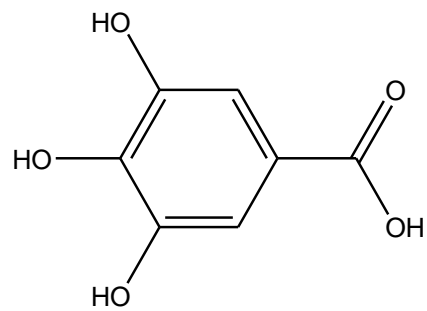
Les acides hydroxycinnamiques sont des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique, généralement ces acides sont sous forme d'esters [23]. La figure 2 illustre la structure de quelques acides hydroxybenzoïques.



Acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque

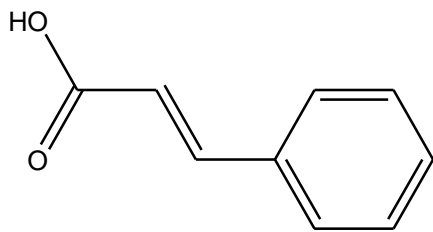


Acide p-hydroxybenzoïque

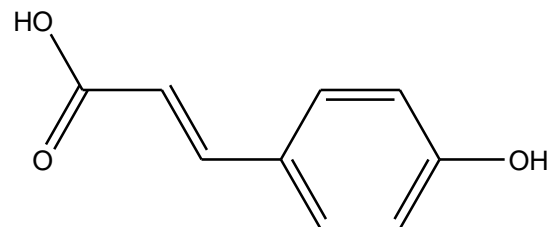


Acide gallique

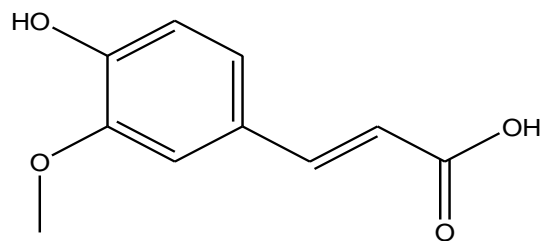
Figure n°2 : Structures des acides hydroxybenzoïques



Acide cinnamique



p-Coumarique acide



Acide ferulique

Figure n°3 : Structures des acides hydroxycinnamiques

I.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe importante de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [25]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6).

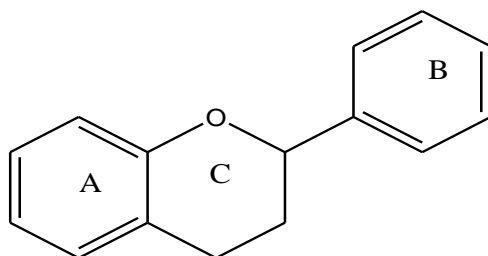


Figure n°4: structure chimique des flavonoïdes

I.2.2. 1. Classification

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4. Les groupes principaux sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones, et les anthocyanidines.

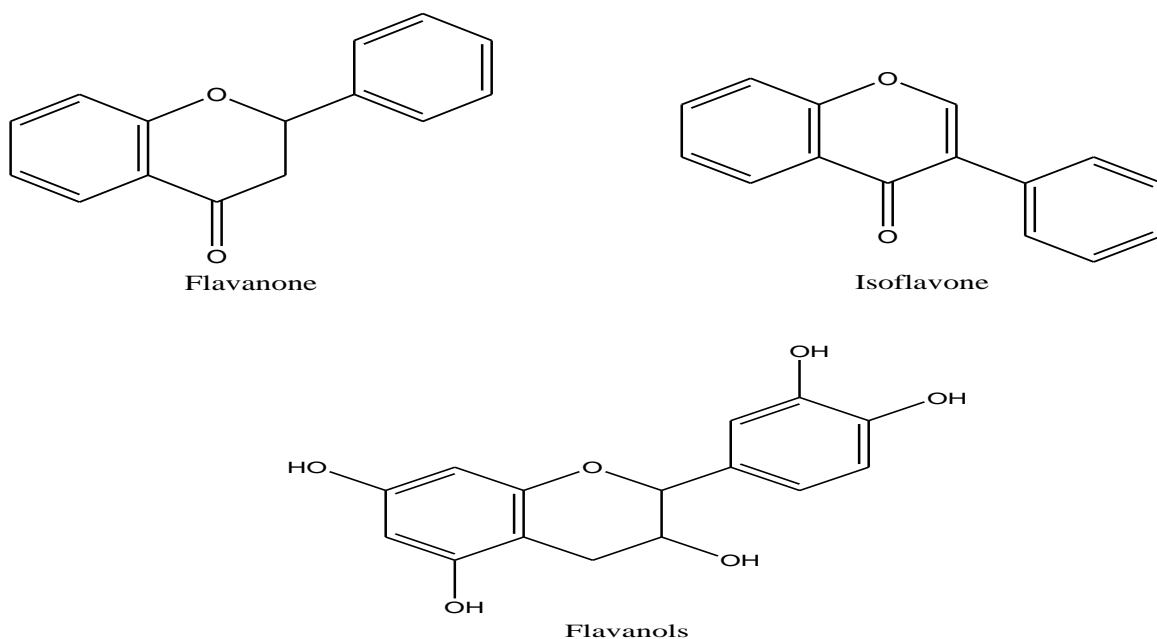


Figure n°5: Quelques structures des flavonoïdes

I.2.3. Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres.

I.2.3.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes (Figure 6) stabilisés par résonnance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical [26] ; l'électron lui pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical [27]. Il peut ensuite réagir avec un autre radical libre [28].

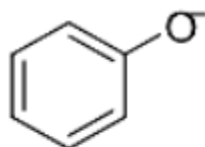


Figure n°06 : Structure chimique d'un anion phénoxyde.

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel[26]. Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale

I.2.3.2. Mécanismes d'action contre les radicaux libres

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions (Figure 7) est directement liée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres de groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyls. Ainsi, des différentes familles connues des polyphénols, les flavonoïdes sont-ils ceux qui, en particulier, réunissent toutes ces caractéristiques [29].

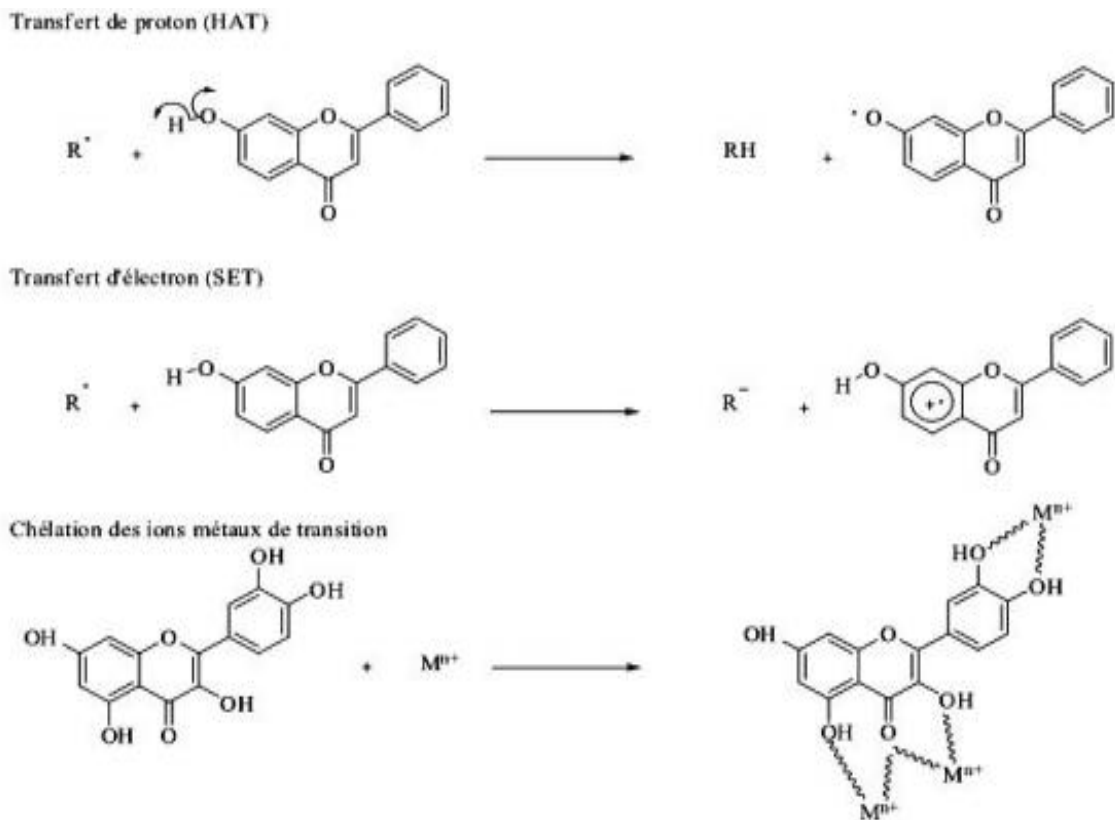


Figure n°07 : Mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques . **RH** : produit stable et **R** : radical libre

I.3. Méthodes d'extractions des composés bioactifs à partir des plantes

L'extraction est la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement Impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales [30].

I.3.1.Méthodes classiques

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : Soxhlet, l'hydro-distillation et la macération avec un mélange alcool-eau ou une graisse chaude[31].

I.3.2. Méthodes alternatives

L'extraction de molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps d'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents. Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par solvant accélérée sont des techniques rapides et efficaces pour extraire des composés chimiques des matrices solides de plantes. Ces techniques peuvent fonctionner à haute température et/ou haute pression améliorant nettement la but de palier la cinétique d'extraction [32].

I.3.2. 1. Extraction assistée aux ultrasons

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale [33].

Le principe de cette procédure est illustré dans la figure 08

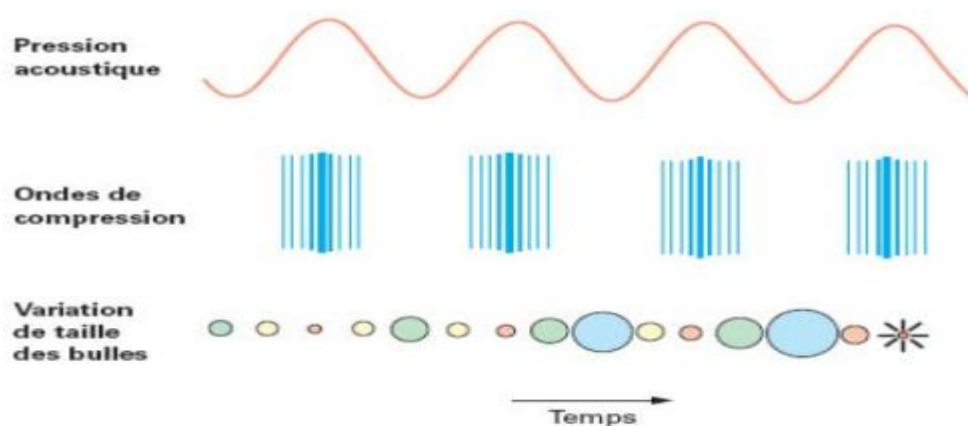
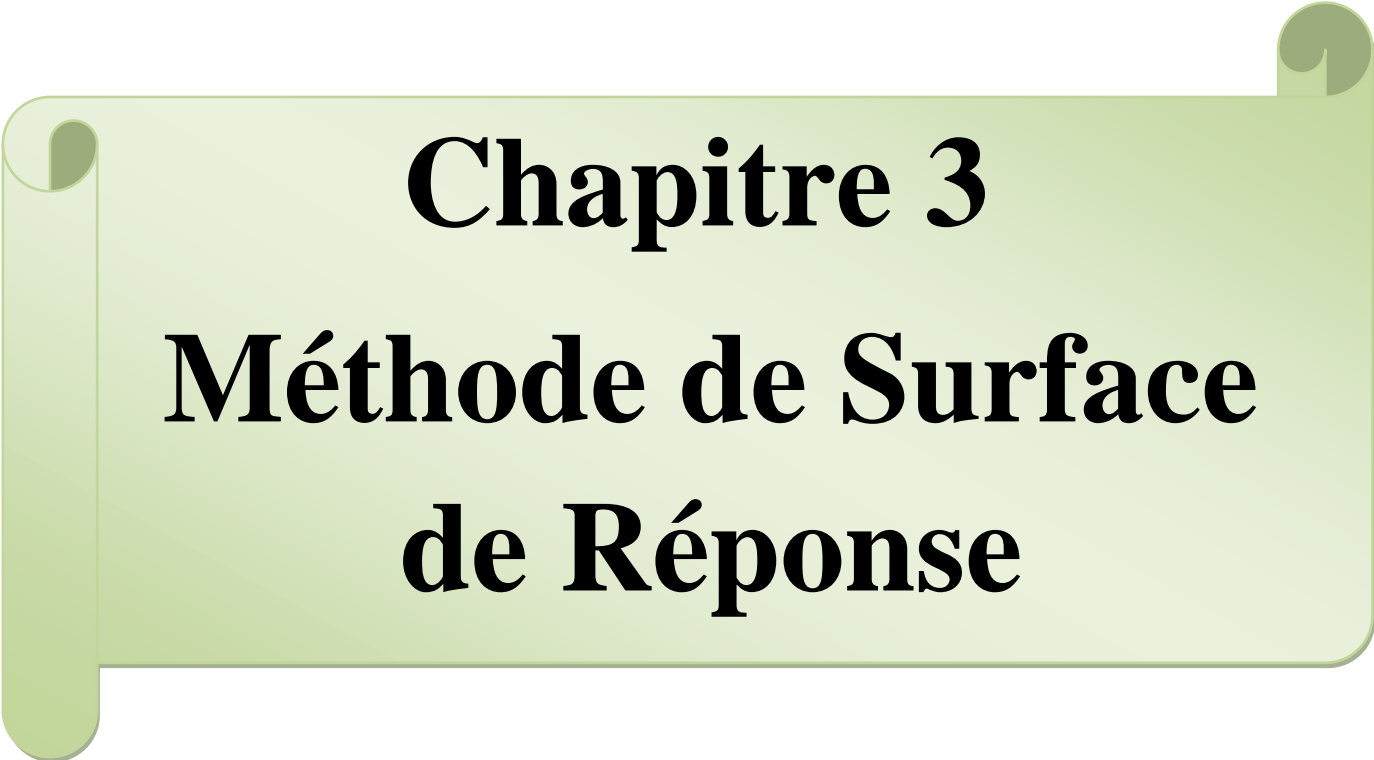


Figure n°08 : Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique

L'ultrason fait référence aux ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse [34]. Ce phénomène est appelé la cavitation acoustique



Chapitre 3
Méthode de Surface
de Réponse

I.4. Généralités sur les plans d'expériences

I.4.1. Définition

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 [35]. La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats, et minimiser le nombre des essais sans toutefois sacrifier la qualité. L'objectif principal peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expérience » [35].

I.4.1.1. Principe

Il consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse [35].

I.4.1.2. Terminologie

- **Réponse** : C'est la grandeur physique étudiée [36].
- **Facteur** : Sont les variables qui peuvent modifier la réponse [37].
- **Niveau d'un facteur** : Est la valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience [37].
- **Domaine d'étude** : domaine expérimental délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés [38].
- **Plan d'expérimentation**: matrice déclinant l'ensemble des conditions expérimentales, imposées aux variables naturelles pour la réalisation des différents essais, dans le cadre du plan d'expériences choisi [38].
- **Matrice d'expériences** : indique les niveaux pris par les variables codées aux différentes expériences [38].

I.4.2. Plans pour surfaces de réponse (RSM)

La méthode des surfaces de réponse (RSM) est une technique d'analyse statistique puissante, bien adaptée à la modélisation des processus complexes ou la réponse est influencée par plusieurs variables et dont l'objectif est d'optimiser cette réponse. Box et Wilson sont les premiers à introduire la théorie de la RSM en 1951, et qui devient par suite la plus utilisée pour l'optimisation des processus. Dans ce modèle, plusieurs type de plans sont utilisés, les plus connus et les plus utilisés sont les plans composites centrés, les plans Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans hybrides [38].

Le modèle mathématique utilisé avec le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est un modèle du second degré classique :

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

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.

I.4.3. Plan de Box-Behnken à trois facteurs

I.4.3.1. Définition du plan de Box- Behnken

Ce sont des structures symétriques dans lesquelles 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 [39].

I.4.3.2. 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 [40].

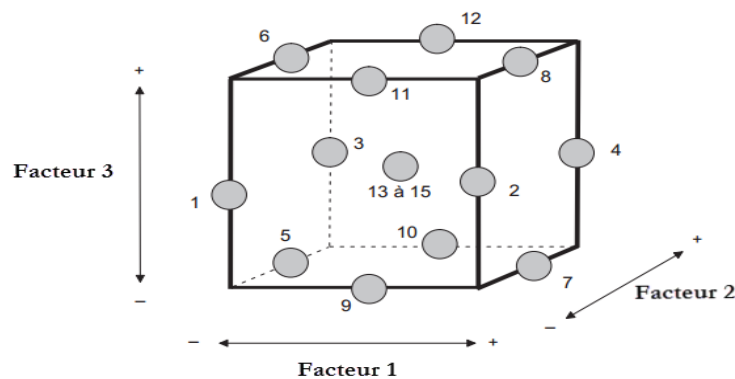


Figure n°9: Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs.

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 [40].

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 prennent pour coordonnées $(0, \pm 1, \pm 1)$ [39]

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 [39].

Tableau 02: La matrice expérimentale du plan de Box-Behnken pour 3 facteurs[39].

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



Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1 Récolte

Le travail réalisé porte sur l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles *A. radiata* au début du mois d'octobre de l'année 2018, dans Djebel El houache à Constantine.

II.1.1- Préparation des échantillons

Une fois la récolte du matériel végétal est réalisée, l'échantillon est séché à l'air libre dans un endroit sec pendant 15 jours puis broyé à l'aide d'un broyeur électrique, puis la poudre a subi un tamisage afin d'obtenir une granulométrie de 125 μ m. Les poudres obtenues sont par la suite conservées dans des sachets en papier à l'abri de la lumière pour éviter la photo-oxydation des substances actives contenues dans la poudre et seront utilisées par la suite pour la préparation des extraits bruts

II.2. Protocole utilisé pour l'extraction

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.

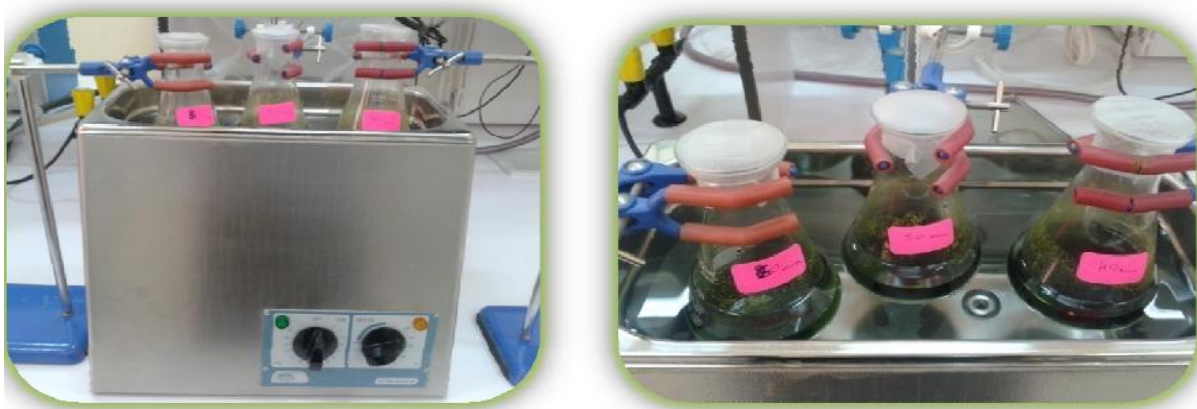


Figure n°10: Extraction par ultrason (photo original)

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.

La poudre des feuilles du *A. radiata* et mélangée à un certain volume du méthanol (la concentration a été choisie selon le modèle expérimental) dans un tube. Ensuite, les tubes ont été

immergés dans un bain d'eau de sonication, et irradiés à une puissance de 50Hz à différents temps d'extraction (min) et masse (g), tel que défini par les conceptions expérimentales.

II.2.1. Modèle expérimental

II.2.2. Expériences à un facteur

Des expériences à un facteur ont été menées pour évaluer les effets des trois paramètres expérimentaux sur l'efficacité de l'extraction. Il s'agit de la masse des feuilles *A. radiata* (0,5-2g), le volume de méthanol (10-100 ml) et le temps d'extraction (5-30 min). Sur la base des résultats d'expériences à un seul facteur, trois facteurs qui ont exercé une influence majeure sur l'efficacité de l'extraction seraient sélectionnés dans la conception de la méthode de surface de réponse subséquente

II.2.2.1. Le temps d'extraction (X1)

1g de poudre des feuilles du *A. radiata* a été mélangée avec 100 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 40 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 (X2)

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 20 min et 1g, 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 (X3)

A un temps de 20 min et un volume de méthanol de 50 ml, les échantillons ont été extraits avec des masses qui varient de 0.5 à 2.5g. 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 composés phénoliques

II.3.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été fait selon la méthode décrite par (Singleton et Rossi, 1965). Un volume de 500 µl d'extrait a été additionné de 1 ml de réactif de Folin– Ciocalteu dilué à (1/10). Après 2 mn d'incubation à l'obscurité, 1 ml de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés. L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 760 nm après 30 minutes d'incubation au bain marie à 50°C et refroidissement direct dans un bain de glace, le dosage est effectué en triple. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, établie avec le standard étalon d'acide gallique et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de poudre (mg EAG/g).

III.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de former avec le groupement (CO) un complexe jaunâtre en présence de chlorure d'Aluminium [42]. La détermination de la quantité des flavonoïdes totaux contenue dans les extraits de *A. radiata* a été réalisée par la méthode colorimétrique décrite par Khennouf, et al., (2010). 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. La teneur en flavonoïdes contenue dans l'extrait est calculée par référence à une courbe d'étalonnage, établie avec le standard étalon de Quercétine et exprimée en milligrammes d'équivalents de Quercétine par gramme de la poudre (mg EQ/g).

II.3.3. Test DPPH (2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structureactivité 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 \cdot reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur mauve bien caractéristique de la solution de DPPH \cdot . 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 \cdot , 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 \cdot alors transformé en une molécule stable DPPH-H [43].

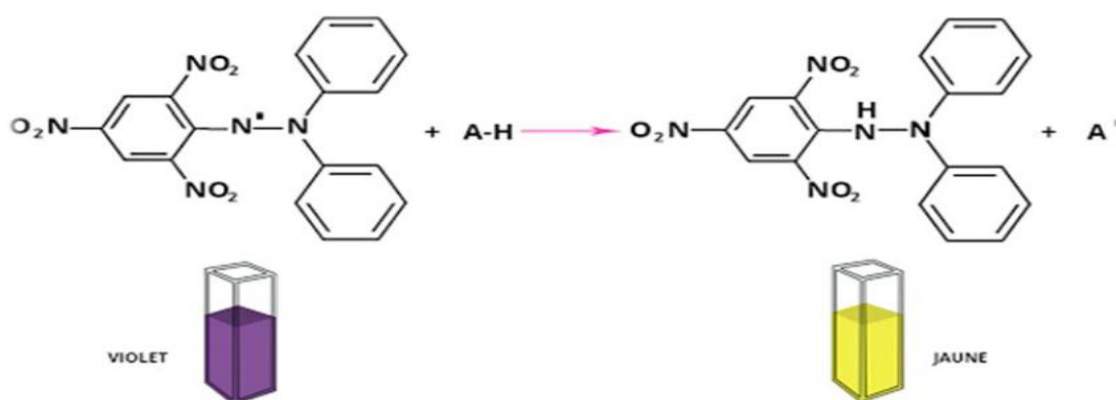


Figure n°11 : Réaction d'une structure polyphenolique avec le radicale DPPH

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 antioxydant 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_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).

II.4. Application du plan d'expérience

L'optimisation de la méthode d'extraction est réalisée en employant le plan de Box Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de trois variables indépendantes : le temps (min), solvant (ml), et la masse (g) qui sont désignés par X1, X2 et X3 respectivement. Les études préliminaires effectuées, ont permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans le tableau 3.

Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser trois réponses : Le taux des polyphénols totaux, les flavonoïdes et l'activité antioxydant par le test d'inhibition du radical DPPH. Selon la formule : $N = 2k(k - 1) + 3Cp$ 15 essais ont été réalisés ; de manière à pouvoir estimer le model mathématique des réponses investiguées. Où : **N** : est le nombre d'expériences. **k** : est le nombre de facteurs et **Cp** le nombre de points centraux

La méthodologie des surfaces de réponses permet de modéliser les réponses étudiées sous forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-dessous :

$$y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i x_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} x_i x_j + E$$

Où :

Y représente la réponse étudiée (dans notre cas, y représente CPT, flavonoïdes et l'inhibition de DPPH); B_0 , est un coefficient constant, B_i , B_{ii} et B_{ij} sont des coefficients des limites linéaires, quadratiques et interactives, respectivement, et le x_i et x_j représentent les variables indépendantes codées et E représente l'erreur expérimentale.

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

Les études préliminaires permettent la détermination des niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimentale utilisé à fin de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des CPT pour chaque variable indépendante. Dans cette méthode d'extraction conventionnelle nous avons étudié, en fonction des teneurs en polyphénols totaux (CPT) qui sont exprimés en mg Equivalent Acide Gallique (EAG) /g de Matière sèche (MS), trois paramètres (temps, volume de solvant et la masse).

III.1.1. 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. 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. Le temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela influence l'efficacité de l'extraction [44]. Par contre, un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques. Dans notre cas, les temps d'extraction ont été de l'ordre de 15 minutes jusqu'à 40 minutes, les résultats sont représentés dans le graphe de la figure n°12. Tandis que les autres conditions d'extraction ont été fixées comme suivantes : la masse (1g) et le volume de méthanol 100 ml.

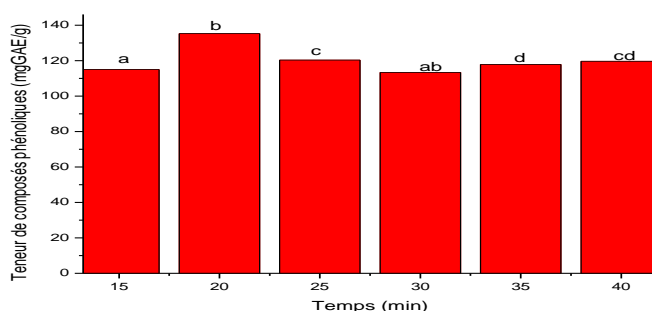


Figure n°12 : Effet de différents temps d'extraction sur les CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

La teneur des composés phénoliques des feuilles du *Anvillea radiata* atteint une valeur maximale de 137 mg EAG /g de matière sèche à un temps d'extraction de 20 min. De 20 min à 40 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. Cela est probablement dû à la dégradation des composés phénoliques causée des rayonnements électromagnétiques à des temps d'extraction prolongés. L'étude statistique révèle une différence significative ($P < 0,05$) entre les teneurs en polyphénols extraites à différents temps d'extraction (15-25 min), qui varient entre 117 à 137 mg EAG/g de MS.

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

III.1.2. L'Effet de volume de solvant

L'extraction par solvant est la procédure la plus utilisée généralement pour préparer des extraits de la matière végétale due à leur facilité d'utilisation, efficacité et une large applicabilité. Le volume de solvant, est un facteur influençant sur l'extraction de polyphénols, c'est pour ça on a procédé à différentes extractions avec différents volumes de solvant. La figure n°13 montre les résultats de ces essais.

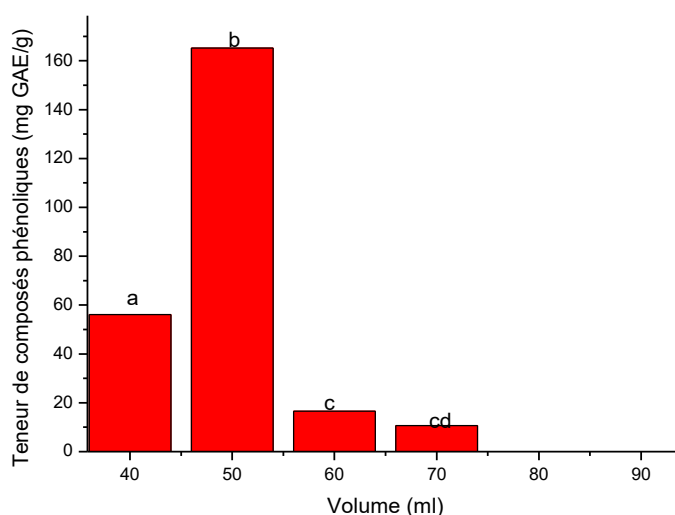


Figure n°13 : Effet volume sur l'extraction des CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$).

Dans la présente étude, le rapport a été augmenté en gardant constant le poids solide (1g), 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. Les résultats obtenus dans la figure n°13 montrent que la variation du volume a un effet sur le taux d'extraction des polyphénols totaux comme l'ont cité plusieurs auteurs dans leurs travaux dont [45]. Les teneurs augmentent avec l'augmentation de volume de solvant ce qui concorde avec les données de la littérature où [45] ont trouvé 50 ml de solvant d'extraction ont permis d'extraire le maximum de CPT. En outre, [46] ont trouvé un volume de 30 ml comme proportion du solvant adéquate pour l'extraction des teneurs les plus élevée. Dans notre étude, le volume qui a révélé la plus faible concentration est de 70 ml alors que la meilleure est attribuée à un volume de 50 ml. Les résultats de l'étude statistique montrent une différence significative entre les teneurs extraites par ces ratios qui varie de 15 à 165 mg EAG/g de MS. En augmentant le volume de méthanol de 40 à 50 ml, on obtient un meilleur rendement d'extraction qui passe de 55 mg EAG/g de poudre à 165 mg EAG/g de poudre respectivement, au de la ce volume les taux en composés phénoliques diminues. Ce qui est probablement dû à la solubilité accrue des composés phénoliques. Le volume de 25ml a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 40-60 ml a été choisie pour les essais de MSR.

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 on a procédé à différentes extractions avec différentes masses. L'influence de la masse du matière végétale sur le rendement en composés phénoliques totaux des extrais étudiés est illustrée dans la figure n°14. L'effet de la masse sur l'extraction des CPT des feuilles du *Anvillea radiata* a été évalué à l'aide de six rapports (0.5:50, 1:50, 1.5 :60 et 2 :50 g/ml) sur une période d'extraction de 20 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 450 mg EAG/g de MS, suivie par 0.5 g avec une teneur de 380 mg EAG/g MS, alors que 2.5g a donnée le taux le plus bas de 110 mg EAG/g de MS. De 1 à 2.5 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 2 g est accompagnée d'une diminution en CPT (120 mg EAG /g MS).

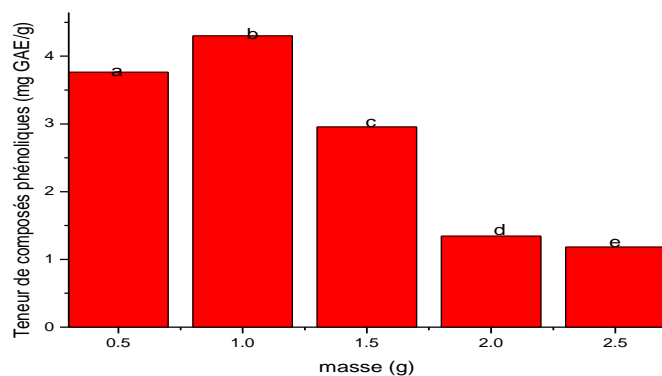


Figure n°14 : Effet de différentes masses sur CPT. *Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

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. La masse de 1g a été sélectionné pour les essais préliminaires, tandis que la gamme 0.5-1.5 g a été choisie pour les essais de MSR.

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

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

Variables		Niveaux		
		-1	0	1
Temps (min)	X ₁	15	20	25
Volume de solvant (ml)	X ₂	40	50	60
Masse (g)	X ₃	0.5	1	1.5

III.2.1. Plan d'expérience Box-Behnken

Basées sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante (temps, volume et masse) influençant le CPT ont été choisies. Les données expérimentales obtenues à partir des 15 essais ont été analysées aléatoirement à l'aide d'un plan d'expérience Box Behnken Design (BBD). Les réponses mesurées sont comparées à celles prédites pour l'estimation de l'écart et l'erreur expérimentale afin de vérifier la validité du modèle choisi. Les résultats ont montré que la teneur en CPT varie entre 116,48 et 316,93 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	118,88	1,77	3323,07
2	-1	0	1	162,76	2,17	2054,70
3	1	-1	0	190,78	1,24	1478,63
4	0	-1	-1	124,55	1,19	316,239
5	-1	-1	0	170,39	1,56	408,547
6	1	0	1	316,93	2,43	4608,54
7	0	1	-1	123,13	0,81	2960,68
8	0	0	0	269,06	2,51	882,051
9	1	1	0	168,61	1,58	2249,57
10	1	0	-1	144,50	1,60	837,606
11	-1	1	0	176,41	0,88	211,965
12	0	-1	1	237,94	1,44	1902,56
13	-1	0	-1	116,48	1,17	1017,09
14	0	1	1	241,13	1,98	2158,97
15	0	0	0	170,03	1,56	774,358

III.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.

Les résultats enregistrés dans le **tableau 5** indiquent que le modèle représente de manière adéquate la relation entre les paramètres choisis et la réponse en composés phénoliques. Cette analyse montre que le modèle est significatif ($P < 0,05$) avec un coefficient de régression R^2 de 0.90 (**Figure 15**). De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté R^2 ajusté est de l'ordre de 0.93 et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$).

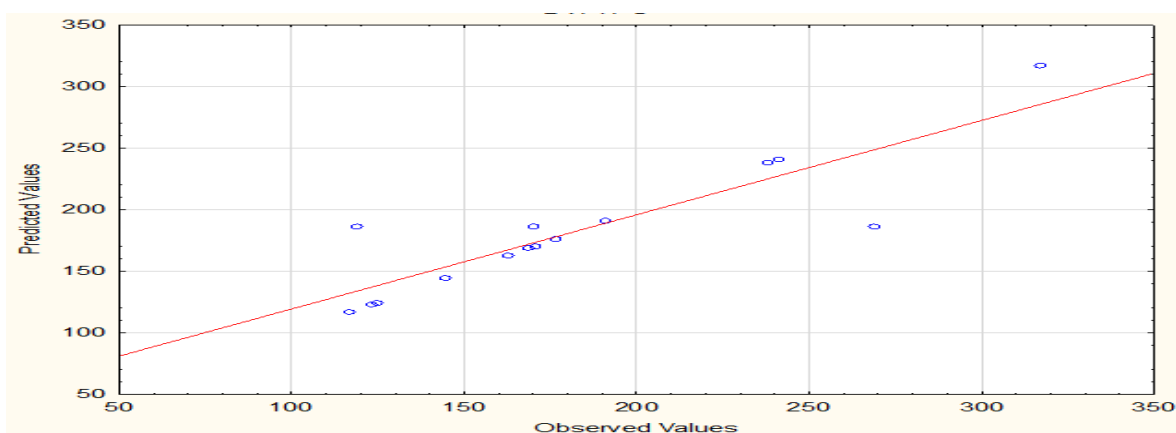


Figure n°15 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

Ce dernier représente la valeur du coefficient de détermination (R^2) après élimination des termes (coefficients) inutiles du modèle. Dans un modèle, si la P-value du défaut d'ajustement est significative, ce modèle sera rejeté.

Tableau 05 : 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 _{CPT}	0.90	0.93	410.23	<0.0250*	0.77	0.82
Y _{Flavonoïde}	0.88	0.85	756.40	0.0337*	79.64	0.121
Y _{DPPH}	0.83	0.78	80.33	0.012*	55.89	0.64

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

III.2.3. Modèle mathématique

Le modèle mathématique du plan BBD des 15 essais reliant la teneur en composés phénoliques et les paramètres expérimentaux est présenté par la relation suivante :

$$\text{CPT} = 185.99 + 24.34 X_1 - 1.79 X_2 - 56.26 X_3 - 7.04 X_1 X_2 + 31.53 X_1 X_3 + 1.15 X_2 X_3 - 2.98 X_1^2 - 6.46 X_2^2 + 2.16 X_3^2$$

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.

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 06

Tableau 06: Coefficients de régression et leurs significations statistiques

	Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
CPT					
Constant	b_0	185.99	30.22	4.21	0.001
Linéaire	b_1	24.34	11.75	1.19	0.002
	b_2	-1.79	-0.078-	-0.016	0.609
	b_3	56.26	24.56	1.51	0.030
Interaction	b_{12}	-7.04	-1.12	-0.18	0.0031
	b_{13}	31.53	16.89	-0.089	0.589
	b_{23}	1.15	0.18	0.03	0.132
Quadratique	b_{11}	-2.98	-0.25	-0.75	0.0124
	b_{22}	-6.46	-4.22	-0.162	0.8655
	b_{33}	2.16	-0.98	0.054	0.0425

III.2.5. Effet linéaire

Les deux facteurs; le temps et la masse influencent de manière significative le taux des composées phénoliques avec des valeurs de (P=0.002 et 0.03) respectivement. Par contre l'influence de volume est non significative (P=0.609).

III.2.6. Effet quadratique

Les résultats obtenus, indiquent que seulement deux facteurs possédant un effet quadratique sur l'extraction des composés phénoliques, à savoir : le temps d'extraction (X_1X_1) et la masse de la matière sèche du *Anvillea radiata* (X_3X_3) avec une probabilité de $P= 0,012$ et $0,0425$, respectivement. Contrairement à l'effet quadratique le volume (X_2X_2) qui est non significatif avec $P=0,865$. Ces résultats montrent que le temps d'extraction, et la masse de la matière sèche du *Anvillea radiata* jouent un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques, ce qui est déjà rapporté par plusieurs auteurs [47,48].

III.2.7. Analyse des surfaces de réponse

III.2.7.1. Temps –volume (X_1X_2)

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°16. Les résultats obtenus montrent que le couple temps d'extraction et la masse (X_1X_2) présente un effet significatif avec $P=0,0031$. Une augmentation de la teneur en composés phénoliques a été observée avec l'augmentation du temps d'extraction de 15-20 min et le volume de solvant de 40-50 ml, mais la tendance a été renversée lorsque le rapport a atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 20-25 min et le volume de 50-60 ml une diminution remarquable de la quantité de composé extrait est constatée. Cela est dû probablement à la dégradation des composés phénoliques par les ondes électromagnétiques émet par l'ultrason.

III.2.7.2. Temps –masse (X_1X_3)

Les résultats obtenus de l'étude d'interaction entre le temps d'extraction, la masse et le taux d'extraction des composés phénoliques sont représentés dans la figure 16B. Les résultats obtenus montrent que le temps d'extraction, et la masse (X_1X_3) présente un effet non-significatif avec la probabilité supérieure à 0,05. Si on augmente le temps d'extraction et la masse d'extraction et on fixe le volume à 40 ml simultanément, la teneur en composés phénoliques augmente de 140 à 280 mg EAG/g donc le temps d'extraction et la masse augmentent proportionnellement avec le taux d'extraction des CPT.

III.2.7.3. Volume-masse (X_2X_3)

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 phénoliques. Les résultats obtenus indiquent que l'interaction volume-masse est non significative avec la probabilité supérieure à 0,132. Les résultats montrent que la teneur en composés phénoliques diminue lorsque la masse varie de 1 à 1.5 g et le volume de 40 à 60 g/ml. Si on augmente la masse de 0.5 à 1g et on fixe le volume à 60 ml simultanément, la teneur en composé phénoliques augmente de 130 à 145 mg EAG/g.

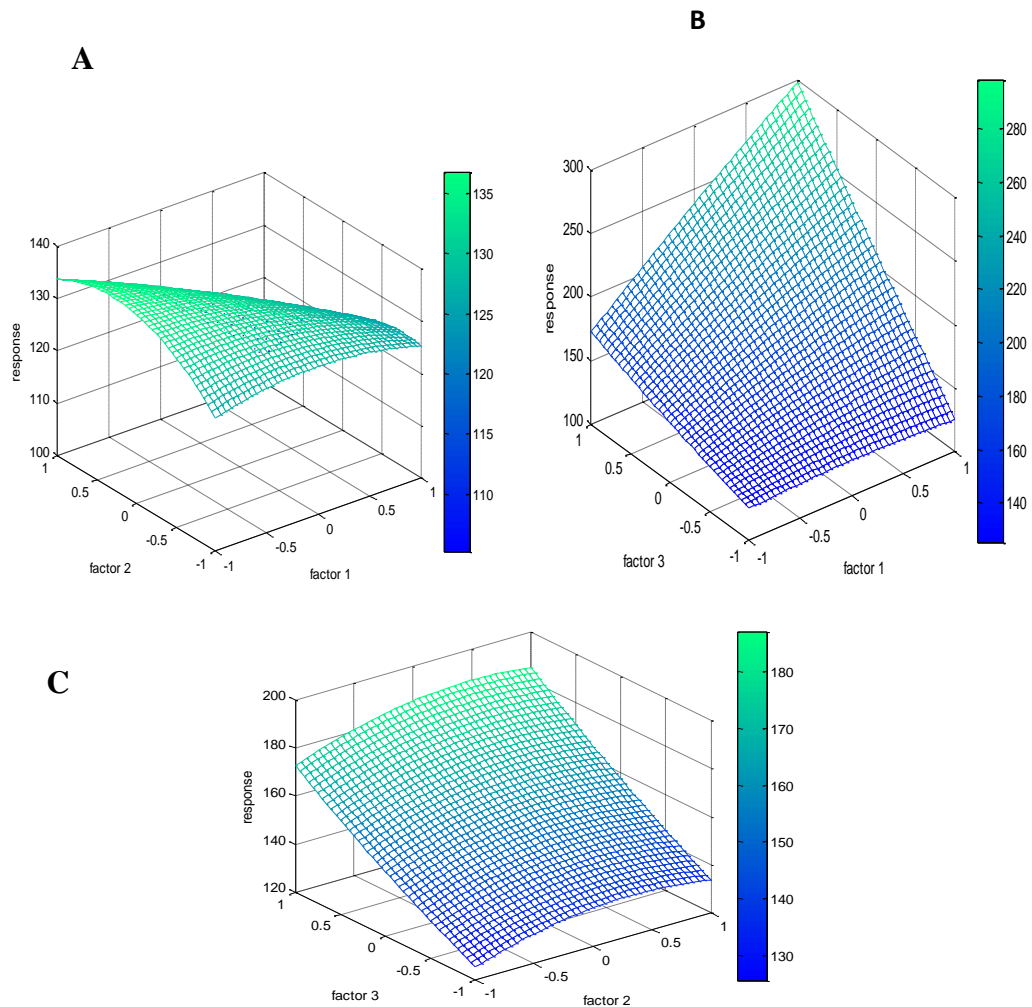


Figure n° 16: Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur le rendement des composés phénolique des feuilles du *Anvillea radiata*

III.2.8. 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

Temps d'extraction (min)	(Volume) (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg GAE/g MS)
25	60	1.5	138.61

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

III.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoides

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la quercétine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,89$ (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 0.81 à 2.17 mg EQ/g de MS (Tableau 4). Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, volume et masse) sur le taux des flavonoides

III.3.2. Coefficient de corrélation

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 . Les résultats de l'analyse de la variance de la régression obtenus sont représentés dans la figure (17) et (Tableau 5).

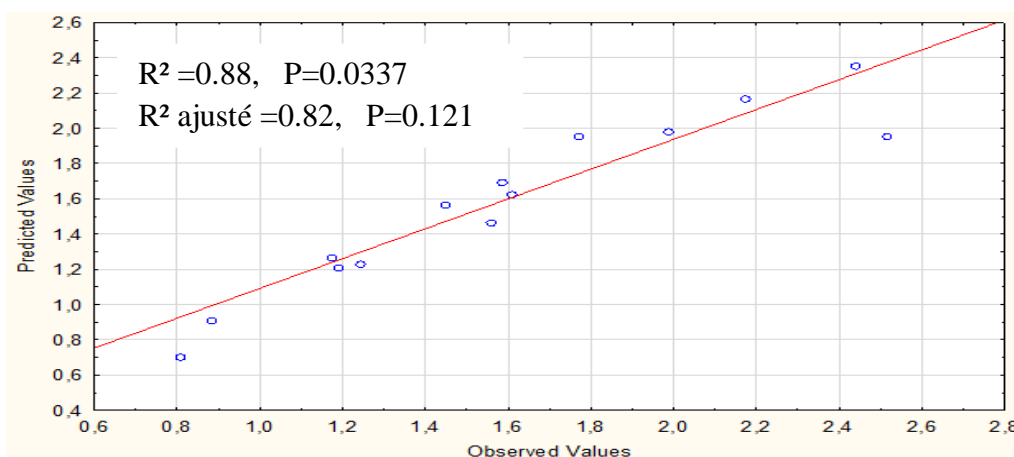


Figure n°17 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

L'analyse statistique a montré que le coefficient de corrélation R^2 et celui d'ajustement sont de 0,88 et 0,82 respectivement qui sont proches de 1 et un manque d'ajustement du modèle qui est non-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 modèle polynomial du second degré.

	Terme	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
FVT					
Constant	b_0	1.95	0.194	10.025	0.00169
Linéaire	b_1	0.13	0.019	1.136	0.030708
	b_2	-0.02	0.010	-0.183	0.04362
	b_3	0.408	0.013	3.426	0.23611
Interaction	b_{12}	0.25	0.012	1.507	0.019207
	b_{13}	-0.042	0.005	-0.249	0.81274
	b_{23}	0.22	0.001	1.3617	0.023143
Quadratique	b_{11}	-0.078	0.0026	-0.4037	0.01030
	b_{22}	-0.560	0.132	-0.1784	0.02415
	b_{33}	-0.031	0.016	3.4266	0.86538

Significatif avec $p < 0.05$.

III.3.4. Analyse du modèle mathématique

Connaissant les valeurs du coefficient b_0 , les coefficients linéaires, les coefficients des interactions et quadratiques de chaque facteur, ces valeurs sont rapportées dans la fonction de Y_{FVT} , le modèle mathématique postulé est un modèle polynomial de second degré présenté par la relation suivante :

$$\begin{aligned}
 \text{FVT} = & 1.95 + 0.13 X_1 - 0.02 X_2 + 0.408 X_3 + 0.25 X_1 X_2 - 0.042 X_1 X_3 + 0.22 X_2 X_3 - 0.078 X_1^2 \\
 & - 0.56 X_2^2 - 0.031 X_3^2 \quad \quad \quad \text{(Eq.(07))}
 \end{aligned}$$

III.3.4.1. Effet linéaire

L'équation 07 montre que le facteur qui influence d'une manière significative sur l'extraction des FVT par ultrason est le temps d'extraction (X_1) avec une probabilité inférieure de 0.05 et F-ratio ($F= 1.136$). suivi par et le volume de solvant (X_2) avec une probabilité P (0,04362) et F-ratio ($F=-0.183$) Cependant l'impact est non significatif pour la masse de la matière sèche du *Anvillea radiata*.

III.3.4.2. Effet quadratique

Les effets quadratiques X_1^2 (temps*temps) et X_2^2 (solvant*solvant) influencent d'une manière significative sur la teneur en des flavonoïdes totaux, avec des probabilités P de 0.0103 et 0.0241, respectivement.

III.3.4.3. Effet d'interaction

Les interactions X_1*X_2 (temps* volume de solvant), et X_2*X_3 (volume de solvant *masse) sont significative sur l'extraction des composés flavonoïdes à partir des feuilles du *Anvillea radiata* avec des probabilités P de 0.0192 et 0.0231, respectivement. Alors que les interactions X_1*X_3 (temps *masse), ne été pas significatives. Ces interactions sont montrées dans la figure 18.

III.3.5. Analyse des surfaces de réponse

III.3.5.1. Temps -volume (X_1*X_2)

Les résultats illustrés dans la figure 18 (A) montrent que l'augmentation le volume de solvant de 40 à 50 ml avec le temps de 15 à 20 min améliorent le rendement d'extraction. Une augmentation de volume d'extraction au-delà de 50 ml et un temps supérieur à 20 min marque un déclin progressif de la réponse.

III.3.5.2. Temps-masse (X_1*X_3)

Comme le montre la figure 18 (B) une augmentation de la masse de la matière sèche de 0.5 à 1g et le temps d'extraction de 15 à 20 min augmente le rendement de l'extraction. Mais à une masse supérieure à 1g et un temps supérieur à 20 min, on remarque une diminution du rendement d'extraction.

III.3.5.3. Volume-masse (X_2*X_3)

L'interaction entre le volume d'extraction et la masse (Figure. 18. (C)) montre que la teneur en FVT augmente rapidement avec l'augmentation de la masse du matière sèche, en fixant le temps à 20 min, alors qu'avec une augmentation du volume liquide au-delà de 50 ml, une légère diminution a été observée sur la teneur en FVT.

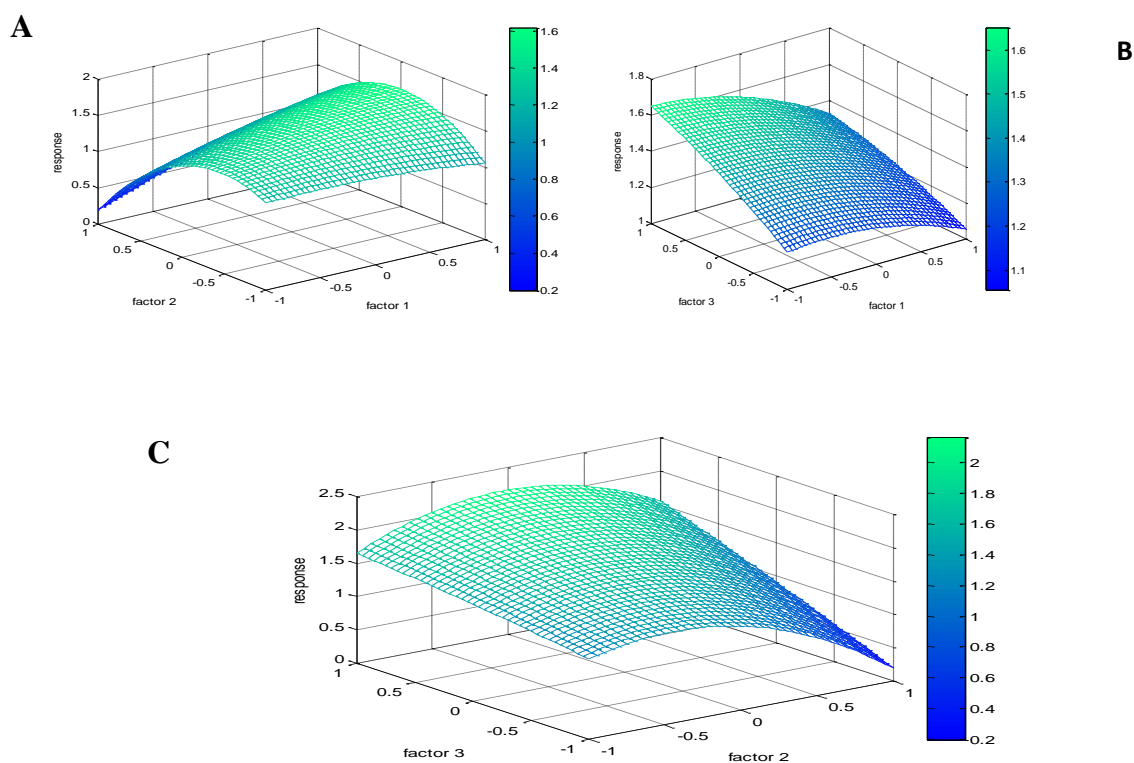


Figure n°18: Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps(B) et volume/masse (C) sur le rendement des composés flavonoidiques des feuilles du *Anvillea radiata*

III.4. Paramètres optimaux

Les conditions optimales de l'extraction des composés flavonoidiques par ultrason à partir des feuilles du *Anvillea radiata* ont été obtenues en utilisant les équations de régression de la méthodologie de surface de réponse (Eq.(07)). Le tableau 9 indique le volume du solvant, le temps et la masse qui permettent de donner la meilleure réponse en flavonoides totaux

Tableau 09 : Conditions optimales d'extraction des composés flavonoidiques par ultrason

Temps d'extraction (min)	Volume (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg EQ/g MS)
25	60	1.5	3.348

III.4.1. Test d'évaluation d'activité antioxydante

III.4.1.1. L'activité scavenger sur le radical DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical libre stable, utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant naturel d'épurer un radical libre (free radical-scavenging). 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 316.239 à 4608 mg EAAC/g de MS (tableau 4). Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, volume et masse) sur l'activité anti-radicalaire

III.4.1.2. Coefficient de corrélation

Dans la présente étude, la valeur de coefficient de corrélation R^2 est de l'ordre de 0.83, signifiant que uniquement 17% des variations ne sont pas expliquées par le modèle.

De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) est d'environ de 0.78, qui est assez élevée pour confirmer la haute significativité du modèle, sachant que ce terme représente la valeur du coefficient de détermination (R^2) après élimination des termes (coefficients) inutiles du modèle.

III.4.1.3. Analyse du modèle mathématique

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

$$\text{DPPH} = 1659.82 + 685.25 X_1 + 434.40 X_2 + 699.14 X_3 + 241.88 X_1 X_2 + 683.33 X_1 X_3 - 597.00 X_2 X_3 - 138.88 X_1^2 - 433.76 X_2^2 + 608.54 X_3^2 \dots \dots \dots \text{(Eq.(08))}$$

III.4.1.2.1. 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.

	Ter me	Coefficients	Erreur standard	Rapport t	Probabilité > t
DPPH					
Constant	b_0	1659,82	679.37	2.44	0.001
Linéaire	b_1	685,25	416.33	1.67	0.233
	b_2	434,40	310.10	1.04	0.026
	b_3	699,14	216.36	1.68	0.015
Interaction	b_{12}	241,88	188.353	0.41	0.0031
	b_{13}	683,33	258.63	1.16	0.0619
	b_{23}	-597,00	333.23	-1.07	0.7961
Quadratique	b_{11}	-138,88	57.89	-0.22	0.0012
	b_{22}	-433,76	133.56	0.70	0.3963
	b_{33}	608,54	144.87	0.993	0.7856

Significatif avec $p < 0.05$.

III.4.1.3.1. Effet linéaire

Les facteurs influençant l'activité antioxydante des extraits des feuilles du *Anvillea radiata* sont le temps d'extraction, volume de solvant et la masse. Seul l'effet temps qui n'est pas significati

III.4.1.3.2. Effet quadratique

Il y'a deux effets quadratique volume de solvant ($X_2 * X_2$) et la masse ($X_3 * X_3$) qui n'sont pas significatifs. Par contre l'influence de temps d'extraction ($X_1 * X_1$) qui est significatif avec $P = 0,0572$.

III.4.1.3.3. Analyse des surfaces de réponse

III.4.1.3.3.1. Temps –volume ($X_1 * X_2$)

Le temps d'extraction-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 $P=0,0031$. Les résultats (figure n°19A) montrent l'activité scavenger sur le radical DPPH accroît lorsque le volume varie de 40 à 50 ml et le temps d'extraction de 15-20 min. Mais si on poursuit l'extraction avec des niveaux très élevés pour chaque paramètre, l'activité antioxydante diminue de 2000 à 1650 mg EAAC/g de MS.

III.4.1.3.3.2. Temps –masse ($X_1 * X_3$)

Les résultats obtenus montrent que le temps d'extraction, et la masse ($X_1 * X_3$) présente un effet non-significatif avec la probabilité supérieure à 0,05. Si on augmente le temps d'extraction et la masse d'extraction et on fixe le volume à 50 ml simultanément, l'activité antiradicalaire augmente de 1200 à 3450 mg EAG/g donc le temps d'extraction et la masse augmentent proportionnellement avec l'activité antioxydante.

III.4.1.3.3.3. Volume-masse ($X_2 * X_3$)

Comme le montre la figure 19 (C) une augmentation de la masse de la matière sèche de 0.5 à 1.25g et le volume de solvant d'extraction de 40 à 52.5 ml augmente l'activité antiradicalaire. Mais à une masse supérieure à 1.25g et un volume de solvant supérieur à 52.5 ml, on remarque une diminution de l'activité antioxydante

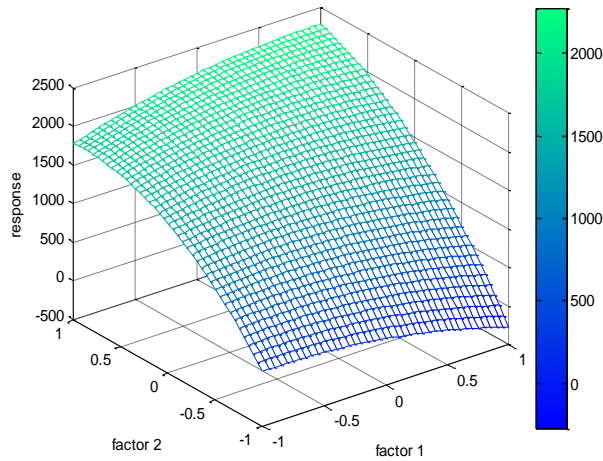
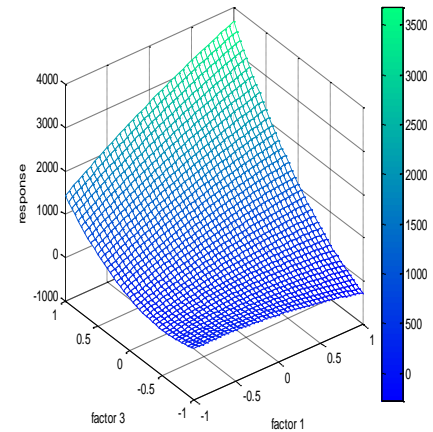
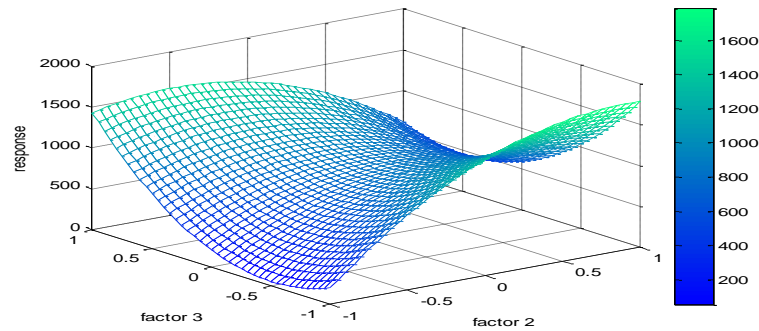
A**B****C**

Figure 19: Surface de réponse pour les effets volume/temps (A), la masse/temps (B) et volume/masse (C) sur l'activité scavenger DPPH des feuilles du *Anvillea radiata*

III.4.4. 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 antioxydante sont obtenues au sein du domaine expérimental.

Tableau 11 : Conditions optimales de l'activité scavenger DPPH par ultrason

Temps d'extraction (min)	Volume (ml)	Masse (g)	Valeur prédite (mg EAAC/g de MS)
25	60	1.5	2413.02

Conclusion

L'objectif de la présente étude est d'étudier la modalisation de l'extraction des antioxydants des feuilles du *Anvillea radiata*, en utilisant le model Box-Behnken et le dosage des majeurs constituants des composés phénoliques, ainsi que la détermination de l'activité antioxydante des extraits optimaux.

Un plan Box et Behnken, a été mis en place pour étudier l'effet de trois variables indépendantes (le temps d'extraction (min), volume d'extraction (ml) et la masse (g)) sur l'extraction des composés phénoliques totaux afin de définir un modèle mathématique permettant l'optimisation des conditions d'extraction. Une étude préliminaire a permis de définir les niveaux hauts et bas pour chaque facteur. Cette approche a permis de tirer les conclusions suivantes :

L'analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les CPT, flavonoïdes et le test d'inhibition au radical DPPH°, dans le cas d'extraction assistée par ultrason, donne des coefficients de détermination (R^2) de 0.90, 0.88 et 0.73, respectivement. De plus, les valeurs des coefficients de détermination ajusté (R^2 ajustée) sont de l'ordre de 0.93, 0.85 et 0.78, cette analyse montre que le modèle est significatif ($P < 0,005$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$).

Les résultats du plan Box-Behnken appliqué pour l'optimisation de l'influence des paramètres étudiés sur l'extraction ont montré que pour une meilleur extraction, le temps à (25 min), le volume de methanol à (60 ml), et la masse de (1.5 g) p doivent être appliqués

En termes de perspective et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'optimiser d'autres paramètres influençant l'extraction des polyphénols tels que le pH, la granulométrie des particules et la température, ..., etc.
- D'élargir l'application du model de Box- Behnken sur d'autres produits, et de favoriser son utilisation au niveau industriel .
- Une caractérisation qualitative et quantitative des CPT.
- Une purification de ces composés en faisant des essais in vivo.

Les conditions optimales d'extraction ont été trouvées;

- ✓ le temps d'extraction 25min
- ✓ Volume 60ml
- ✓ La masse 1,5g

Références bibliographique

- [1] Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- [2] Hanifi N., 1991. - Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49
- [3] Konkon, N. G., Simaga, D., Adjoungova, A. L., et al. Etude Phytochimique de *Mitragynainermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 2006, vol. 14, p. 73-80.
- [4] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- [5] Karmakar, R., Ghosh, A. K., & Gangopadhyay, H. (2011). Effect of pretreatments on physico-chemical characteristics of sugarcane juice. *Sugar Tech*, 13(1), 47-50.
- [6] Harkati B. (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae : *Scorzonera undulata*. Thèse doctorat : Chimie organique : Constantine : Université de Mentouri Constantine, 4-5
- [7] Ghourri M., Zidane L., El Yacoubi H., Rochdi A., Fadli., Douira A. (2012). Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc Saharien). *Journal of Forestry Faculty*, 12(2), 218-235.
- [8] Quézel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, C.N.R.S. Paris. 902-1087.
- [9] Harborne, J.B., T. Swain. (1969). *Perspectives in Phytochemistry*, Academic Press, London, New York.
- [10] Kaabeche M. 2003. Étude Sur La Rehabilitation De La Flore Locale Au Niveau De La Reserve D'El Mergueb (Wilaya De M'sila, Algerie). PROJET ALG/00/G35/A/1G/99. 45p

- [11] Paulian, P. (1967). Guide pour l'Etude de quelques plantes Tropicales, Ed. Gauthier – Villards, Paris
- [12] Águeda B, Parladé J, De Miguel AM and Martínez-Peña F. 2006. "Characterization and identification of field ectomycorrhizae of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*". *Mycologia*. 98 (1). P: 23–30.
- [13] Ozenda P. 1967. Flore du Sahara, Pat, 270
- [14] Guzmán B et Vargas P. 2009. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Organisms Diversity & Evolution* 9:83-99.
- [15] Maiza K, BRAC De La Perriere et Hammiche V. 1993. Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg. 169-181
- [16] Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M, Slimani N and Hamidi N. 2013. Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west Algeria. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences*. 2: 159-165.
- [17] Dendougui H, Jay M, Benayache F and Benayache S. 2006. Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). *Biochemical systematics and ecology*. 34 : 718-720.
- [18] Boudjouref M., 2011- Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 99 p.
- [19] Newman D.J., Cragg G.M., 2012 – Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* Vol. (75): 311-335.
- [20] Guignard, J.L. (1998). Abrégé de botanique. Masson (Ed). Paris, 212p.
- [21] Peeking A; Picand B; Hacene K; Lokies F; Guerin P; 1987-Oligimères procyanidolique (Endotélon) et système lymphatique. Artères et veines. Publications médicales AGCF. Vol (6) :512-513.

- [22] Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chemistry*, 99(1), 191-203
- [23] Han X., Shen T. et Lou H. (2007). Dietary polyphénols and their biological significance. *International journal of molecular science*.8:950-988.
- [24] Bastian C. (2006). Extraction, concentration et caractérisation des composés polyphénoliques du café vert. Thèse de doctorat, spécialité : chimie analytique. Haute école valaisanne). 49p.
- [25] Lahouel M. 2005. Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine
- [26] Sartori-Thiel A. (2003). Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: 177pp.
- [27] Leopoldini M., Russo N. & Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- [28] Korkina L., De Luca C. & Pastore S. (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259, 77-86.
- [29] Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933- 956.
- [30] Handa S.S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy. p 21-54.
- [31] Luque-Rodriguez J.M., Pérez-Juan P, Luque de Castro M.D. (2006) Extraction of Polyphenols from Vine Shoots of *Vitis vinifera* by Superheated Ethanol-Water Mixtures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8775-8781.
- [32] Wang, L. et Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17:300-312

- [33] Kiriamiti, K.H. (2003). Extraction de pyréthrinés par CO₂ liquide et supercritique, PhDThesis, INP Toulouse.
- [34] Benamor, B. (2008). Maitrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans les Opérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle.
- [35] Giroux, M., Girard, G., (2009). Favoriser la position d'apprentissage grâce à l'interaction superviseur-supervisé. *Pédagogie médicale* 10, 193-210.
- [36] Vivier, S., (2002). Stratégies d'optimisation par la méthode des Plans d'Expériences, et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par Eléments Finis. Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I
- [37] Halhal, Y., Hadroug, S., (2017). Optimisation par le plan d'expérience Box-Behnken de la production d'une pectinase à partir des écorces d'agrumes
- [38] KAMOUN, A., CHAABOUNI, M.M., AYEDI, H.F., (2011). Plans
- [39] Kimouche, K.(2008).«Etude de quelques plans d'expériences associées aux surfaces de réponse».Mémoire de Magister, Constantine (Algérie).
- [40] Goupy, J. (2006).«Les plans d'expériences». *Revue Modulad*, pp. 74-116.
- d'expériences traitements de surface-Méthodologie des surfaces de réponses (MSR).
- [41] N. Boizot et J-P. Charpentier. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cah. Tech. INRA. N°. special. (2006). pp. 79-82
- [42] A. A. Dehpour, M. A. Ibrahimzadeh, N. seyed Fazel et N. Seyed Mohammad. Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. Vol. 60. (2009). pp. 405-412.
- [43] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Ijic, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 2008, Vol. 111; pp 925–929.

- [44] Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J., 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry* 130, 986-993
- [45] Hussain, A. I., F. Anwar, et al. (2011). "Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils." *Pak J Bot* 43(2): 1315-13
- [46] Barros L , Carvalho A, Morais J et Ferreira I. (2010) . Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*. 120 247 254.
- [47] Yap C.F., Ho C.W., Wan Aida W.M., Chan S.W., Lee C.Y. et Leong Y.S.(2009) .optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola* L) residues. *Sains Malaysiana*. 38:511-520.
- [48] Liyana-Pathirana C. et Shahidi F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*. 93 : 47-56.

Annexes

Annexe I : Préparation de quelques réactifs

* Préparation de la solution du Carbonate de sodium à 7.5% : 7.5 g de carbonate de Na dans 100 ml d'eau distillée (ED)

Dans une fiole de 100 ml, mettre un barreau magnétique plus une petite quantité du volume d'ED (des 100 ml) puis rajouter 2 g de carbonate de Na. Mélanger pour éviter que cette dernière se cristallise, puis verser le volume restant d'ED.

* Préparation de la solution de DPPH

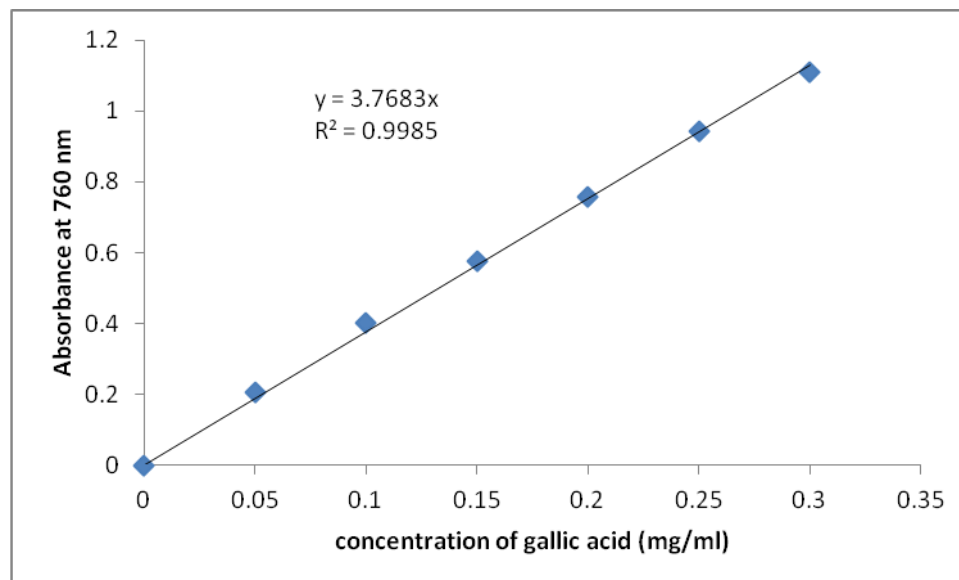
Dans une fiole de 50 ml, mettre un barreau magnétique plus 0.005g de DPPH puis ajouter 50 ml de méthanol et laisser agiter sur une plaque agitatrice à froid. Retirer le barreau et ajuster avec le méthanol à 100 ml si le volume a été diminué.

* Préparation de la solution de AlCl₃ 2%

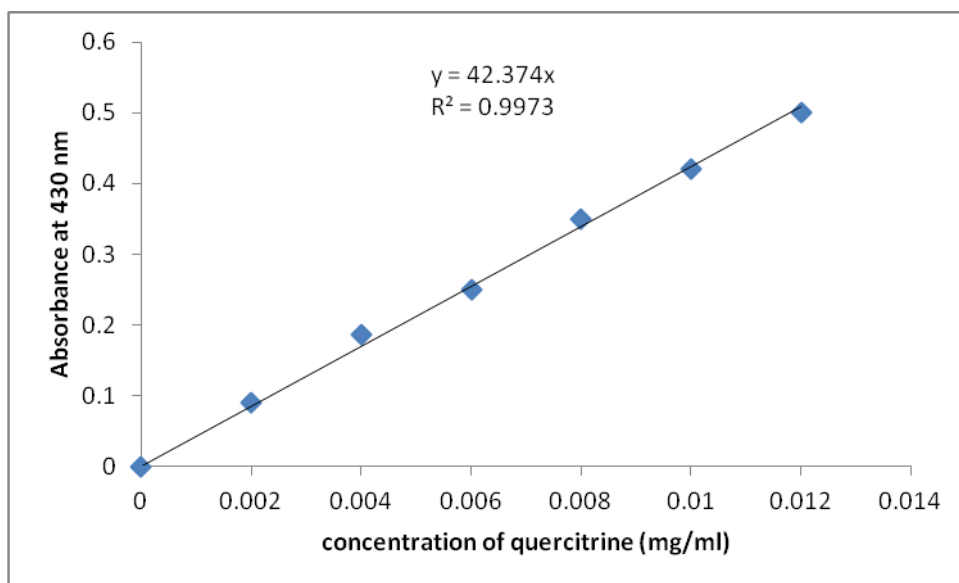
Dans une fiole de 100 ml, mettre un barreau magnétique plus 2 g de AlCl₃ puis ajouter 100 ml d'eau distillée et laisser agiter sur une plaque agitatrice à froid jusqu'à dissolution du produit . Retirer le barreau magnétique et si le volume total diminue ajuster à 100 ml avec l'ED.

Annexe II : Courbes d'étalonnages utilisées

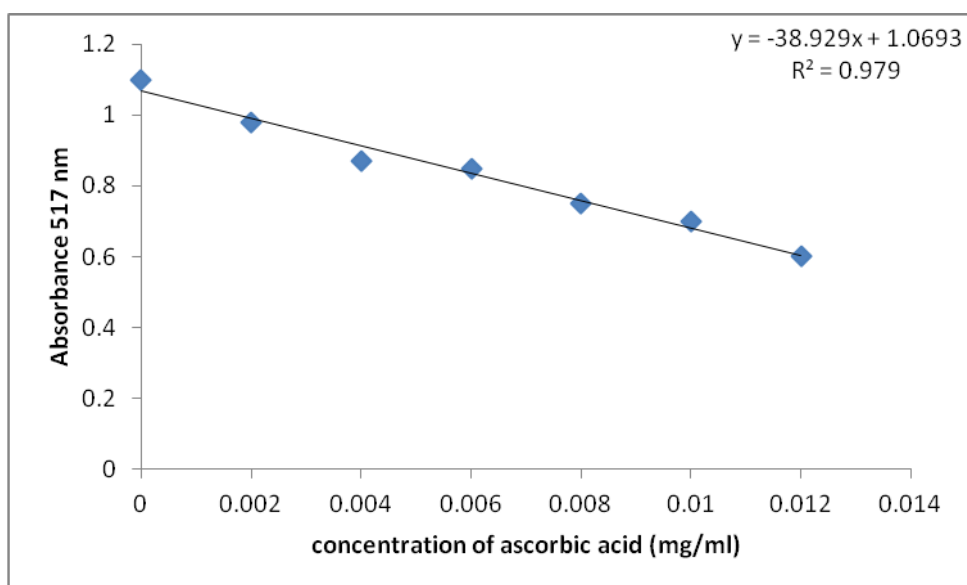
❖ Curve stander of gallic acid (phenolic compounds)

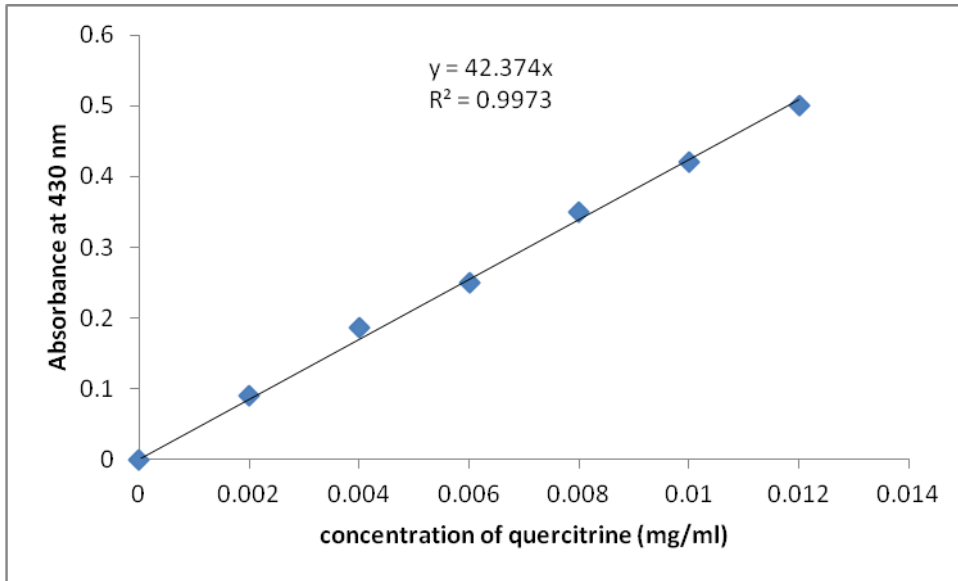


❖ **Curve stander of Quercetin (Flavonoids)**



❖ **Curve stander of DPPH**





المخلص

يهدف هذا العمل إلى دراسة وتفضيل طريقة استخراج استخلاص مضادات الأكسدة و المركبات الفينولية من مرارة شجرة النقد بواسطة الموجات فوق الصوتية ذلك من أجل تحسين ظروف استخراج هذه المواد حيث استخدمنا طريقة استجاب السطح التي طورتها خطة بوكس- بهنكن. أظهرت النتائج أن أفضل نموذج للمركبات الفينولية (العينة 1.5 غ ، المذيب ميثانول 60 مل فترة الاستخراج 25 دقيقة)، الفلافونويدات (العينة 1.5 غ ، المذيب ميثانول 60 مل فترة الاستخراج 25 دقيقة)، النشاط المضاد للأكسدة (العينة 1.5 غ ، المذيب ميثانول 60 مل فترة الاستخراج 25 دقيقة)

الكلمات المفتاحية: الاستخلاص ، التحسين ، المركبات الفينولية ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، شجرة النقد بوكس- بهنكن

Résumé

La présente étude est portée sur l'optimisation de l'extraction des antioxydants des composés phénoliques de la matière végétale des galles du *Anvillea radiata*. En utilisant la méthode de surface de réponse développée par le plan BBD. Les conditions expérimentales optimales permettant une maximisation de l'extraction de composés phénolique (matière végétale 1.5g à un volume méthanol 60 ml pendant un temps d'extraction de 25 min) ; flavonoides (matière végétale 1.5g à un volume 60 ml pendant un temps d'extraction de 25 min); activité antiradicalaire (1.5g à un volume 60 ml pendant un temps d'extraction de 25 min).

Mots clés : activité antioxydante, extraction, optimisation, feuille du *Anvillea radiata* , composés phénolique, flavonoids, antioxydante , box behnken.

Abstract

The present study focuses on the optimization of extraction of antioxidants by the determination of the phenolic compounds of the extracts of the powders of *P.atlantica* galls using the response surface method developed by the BBD plan. The optimal experimental conditions for maximizing the extraction of phenolic compounds from *P.atlantica* galls are: the mass 1.5 g with methanol solvent 60 ml for a time of 25 minutes, for the flavonoids the mass 1.5 g with methanol solvent 60 ml for a time of 25 minutes, for the antioxidant activity of DPPH the mass 1.5 g with methanol solvent 60 ml for a time of 25 minutes.

Key words: antioxidant activity, extraction, optimization, leaf of *Anvillea radiata*, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, box behnken.