

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Optimisation de l'extraction des flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse, model Box-Behnken et étude de l'activité anti-oxydante.**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> ABBAR Meriem & M<sup>elle</sup> BARACHE Fouzia**

Soutenu le : **17 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mme Kara-Kendi S.	MAA	Président
Mr Tacherfiout M.	MAA	Encadreur
Mme Abderrahim-Khamtache S.	MAA	Examineur

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promoteur M<sup>r</sup> TACHERFIOUT Mustapha, qui nous a encadré et dirigé avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordé*

*Nous adressons nos profonds remerciements à M<sup>me</sup> KARA-KENDI S. d'avoir accepté de présider le jury ;*

*Nos vifs remerciements s'adressent à M<sup>me</sup> ABDERRAHIM-KHAMTACHE S. d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci à M<sup>r</sup> BOUKHALFA Farid, qui nous a beaucoup aidé et soutenu pendant notre travail et à M<sup>me</sup> MEZAHEM Tassadit pour ses conseils.*

*Nos profonds remerciements s'adressent à M<sup>r</sup> MOUSSOUNI Abd Nour pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, . . . tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent à tous les enseignants du département de biologie physico-chimique.*

*Nous remercions également toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce modeste travail en particulier : Habiba, Akila, Saida et Naima.*

*Meriem et Fouzia*

# Dédicaces

*À l'aide de dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*À mes très chers parents (Hachemi et Tassadit), sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ;*

*À mes adorables sœurs : Nacira, Nadia et Naima ;*

*À mes très chères frères : Bachir, Mourad, Karim, Ayache, Bahi et Mouloud ;*

*À mes belles sœurs : Zohra, Siham et Lila ;*

*À mes beaux-frères : Samir et Boudjamaa ;*

*À mes nièce : Amal, Rawan, Ferial, Cyrta et Tiziri ;*

*À mes nouveaux : Abd Arahim, Abd Alhalim, Amine et Mouhamed Amine ;*

*À ma grande mère ;*

*À toute ma famille ;*

*À mes chère amies : Tiziri, Hadjer, Souad, Samia, Sabrina, Louiza, Siham, Yamina, Nora et Mounira ;*

*À mon binôme Fouzia qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille ;*

*À toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ;*

*À tout la promotion biochimie appliquée (2016-2017).*

*Meriem*

# *Dédicaces*

*À l'aide de dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*À mes très chers parents (Djamel et Fadila), sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ;*

*À mon cher mari Mahdi,*

*Pour ses encouragements, son dévouement et son appui à toutes mes entreprises ;*

*À mes adorables sœurs : Ouerdia, Katia et Lydia ;*

*À mes deux chers frères : Soula et Amara ;*

*À mes beaux-parents ;*

*À mes beaux-frères et belles sœurs ;*

*À la mémoire de mon grand-père Saadi, qui aurait été si fière de moi Aujourd'hui ;*

*À toute ma famille ;*

*À mes amies dont particulièrement Leïla, Fatima, Nora et Mounira ;*

*À mon cher binôme Meriem qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille ;*

*À toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ;*

*À tout la promotion biochimie appliquée (2016-2017).*

*Fouzia*

# *Sommaire*

---

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Liste des annexes

Introduction.....	1
-------------------	---

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Plans d'expériences

I-1- Généralités sur les plans d'expériences.....	2
I-2- Principe .....	2
I-3- Terminologie.....	3
I-3-1- Réponse.....	3
I-3-2- Facteurs.....	3
I-3-3- Espace expérimental.....	4
I-3-4- Niveau d'un facteur.....	4
I-3-5- Domaine d'étude.....	4
I-4- Optimisation par la méthodologie des surfaces de réponse.....	4
I-4-1- Plan de Box-Behnken.....	5
I-4-1-1- Définition du plan de Box-Behnken.....	5
I-4-1-2- Modèle mathématique postulé.....	5
I-4-1-3- Quelques applications des plans de Box-Behnken.....	6
I-4-2- Avantages de la méthodologie des surfaces de réponse.....	6

### Chapitre II : Généralités sur *Rhamnus alaternus*

II-1- Description botanique.....	7
II-1-1- Généralités.....	7
II-1-2- Caractéristiques morphologiques.....	7
II-1-3- Classification botanique du <i>Rhamnus alaternus</i> .....	8

II-1-4- Ecologie et répartition géographique.....	9
II-2- Usage traditionnel.....	9
II-3- Composition phytochimique de <i>R. alaternus</i> .....	9
II-4- Activités biologiques.....	11
II-4-1- Activité antioxydante.....	11
II-4-2- Activité antimutagène.....	11
II-4-3- Activité antimicrobienne.....	11
II-4-4- Activité anti-enzymatique.....	11
II-4-5- Activité anti-inflammatoire.....	12

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

III-1- Matériel végétal.....	13
III-1-1- Récolte et séchage.....	13
III-1-2- Broyage et tamisage.....	13
III-2- Méthodes .....	13
III-2-1- Optimisation de l'extraction des flavonoïdes.....	13
III-2-1-1- Optimisation des conditions de l'extraction .....	13
III-2-1-2- Extraction des flavonoïdes.....	15
III-2-2- Dosage des antioxydants.....	15
III-2-2-1- Dosage des polyphénols totaux.....	15
III-2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux.....	16
III-2-2-3- Dosage des flavones et flavonols.....	16
III-2-3- Détermination de l'activité anti-radicalaire.....	16
III-2-3-1- Neutralisation du radical DPPH <sup>•</sup> .....	16
III-2-3-2- Neutralisation du radical ABTS <sup>•+</sup> .....	17
III-2-4- Détermination de pouvoir réducteur.....	19
III-2-4-1- Réduction du chlorure ferrique.....	19
III-2-4-2- Réduction du phosphomolybdate.....	20
III-3- Analyse statistique.....	20

## Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1- Optimisation et conditions d'extraction des antioxydants.....	22
IV-1-1- Essais préliminaires.....	22
IV-1-1-1- Choix du solvant d'extraction.....	22
IV-1-1-2- Choix du temps d'extraction.....	22
IV-1-1-3- Choix du ratio solide/liquide d'extraction .....	23
IV-1-2- Plan d'expérience Box-Behenken.....	23
IV-1-2-1- Analyse des résultats.....	23
IV-1-2-2- Validation du model.....	24
IV-1-2-3- Modèle mathématique.....	28
IV-1-2-4- Solution.....	28
IV-2- Dosage des antioxydants.....	29
IV-2-1- Teneur en polyphénols totaux.....	29
IV-2-2- Teneur en flavonoïdes totaux.....	30
IV-2-3- Teneur en flavones et flavonols.....	32
IV-3- Pouvoir anti-radicalaire.....	33
IV-3-1- Pouvoir anti-radicalaire DPPH <sup>•</sup> .....	33
IV-3-2- Pouvoir anti-radicalaire ABTS <sup>•+</sup> .....	34
IV-4- Pouvoir réducteur.....	36
IV-4-1- Réduction du chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ).....	36
IV-4-2- Réduction du phosphomolybdate.....	37
Conclusion .....	39

### Références bibliographiques

### Annexes

### Résumé



## Liste des abréviations

- (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>O<sub>13</sub>** : Molybdate d'ammonium ;
- ABTS** : 2, 2-azino-bis (acide 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) ;
- ADN** : Acide désoxyribonucléique ;
- A<sub>Ech</sub>** : Absorbance d'échantillon ;
- AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium ;
- A<sub>T</sub>** : Absorbance de témoin ;
- Borne<sub>inf</sub>** : Borne inférieur ;
- Borne<sub>sup</sub>** : Borne supérieur ;
- C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>** : Acétate de sodium ;
- C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>** : Acide trichloroacétique ;
- C<sub>6</sub>N<sub>6</sub>FeK<sub>3</sub>** : Ferricyanure de potassium ;
- DO** : Densité optique ;
- DPPH** : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ;
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène ;
- Fe<sup>2+</sup>** : Ion ferreux ;
- Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique ;
- FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer ;
- FRAP** : Ferric Reducing Antioxydant Power ;
- h** : Heure ;
- H** : Proton ;
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique ;
- HCl** : Acide Chlorhydrique ;
- IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50% ;
- JMP7** : John's Macintosh Project 7 ;
- K3O-ir** : Kaempferol 3-O-β-isorhmninoside ;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de potassium ;
- MeOH** : Méthanol ;

## Liste des abréviations

**mg EAG/g de MS** : Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche ;

**mg EQ/g de MS** : Milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche ;

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Sodium de phosphate dibasique ;

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate monosodique ;

**PI** : Pourcentage d'inhibition ;

***R. alaternus*** : *Rhamnus alaternus* ;

**R<sup>2</sup> et r** : Coefficient de corrélation ;

**R3O-ir** : Rhamnocitrine 3-O-β-isorhmninoside ;

**RSM** : Méthodologie des surfaces de réponse ;

**UV** : Ultra-violet ;

**μg** : Microgramme ;

**μl** : Microlitre.

**Liste des figures**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	<i>Rhamnus alaternus</i> L : (A) feuilles (originale), (B) fleurs (originale) et (C) fruits	8
<b>2</b>	Structure de kaempferol-3-O-bisorhamminoside, rhamnocitrin 3-O-bisorhamminoside et rhamnetin-3-O-bisorhamminoside	10
<b>3</b>	Les feuilles fraiches (a), sèches (b) et poudre (c) de <i>R. alaternus</i>	13
<b>4</b>	Structure de DPPH <sup>•</sup> (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH (Où AH est un composé capable de céder un H au radical DPPH)	17
<b>5</b>	Formation du radical cationique ABTS <sup>•+</sup> à partir de l'ABTS	18
<b>6</b>	Schéma sur la réaction de test FRAP (Fe <sup>2+</sup> : Ions ferreux, Fe <sup>3+</sup> : Ions ferriques et TPTZ : ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine)	19
<b>7</b>	Plan de prédiction réelle des flavonoïdes des feuilles de <i>R. alaternus</i>	25
<b>8</b>	Surfaces de réponse pour les interactions des trois facteurs : (A) temps-ratio, (B) temps-polarité et (C) polarité-ratio	26
<b>9</b>	Teneur en polyphénols totaux des feuilles de <i>R. alaternus</i>	30
<b>10</b>	Teneur en flavonoïdes totaux des feuilles de <i>R. alaternus</i>	31
<b>11</b>	Teneur en flavones et flavonols des feuilles de <i>R. alaternus</i>	32
<b>12</b>	Histogramme représente l'activité scavenging du radical DPPH <sup>•</sup> d'extrait acétonique des feuilles de <i>R. alaternus</i>	33
<b>13</b>	Histogramme représente l'activité scavenging du radical ABTS <sup>•+</sup> d'extrait acétonique des feuilles de <i>R. alaternus</i>	35
<b>14</b>	Pouvoir réducteur (FeCl <sub>3</sub> ) des feuilles de <i>R. alaternus</i>	36
<b>15</b>	Pouvoir réducteur du phosphomolybdate des feuilles de <i>R. alaternus</i>	38

**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Les noms vernaculaires de <i>Rhamnus alaternus</i>	7
<b>II</b>	Classification systématique de <i>R. alaternus</i>	8
<b>III</b>	Variables et leurs niveaux choisis pour l'optimisation d'extraction des flavonoïdes	14
<b>IV</b>	Tableau récapitulatif des expériences du plan de Box-Behnken pour trois facteurs	14
<b>V</b>	Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes par le plan d'expérience Box-Behnken des feuilles de <i>R. alaternus</i>	24
<b>VI</b>	Estimation des coefficients de régression du modèle polynôme de second degré des feuilles de <i>R. alaternus</i> étudiées	26
<b>VII</b>	Les conditions optimales et la valeur prédite pour l'extraction des flavonoïdes des feuilles de <i>R. alaternus</i> selon le modèle de Box-Behnken	28

**Liste des annexes**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>
<b>I</b>	L'espace expérimental
<b>II</b>	Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut
<b>III</b>	Le domaine d'étude
<b>IV</b>	L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forment la surface de réponse
<b>V</b>	Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs
<b>VI</b>	Composition phytochimique de <i>R. alaternus</i>
<b>VII</b>	Protocole général d'extraction des composés phénoliques, dosages et méthodes utilisées pour l'étude du pouvoir antioxydant des feuilles de <i>R. alaternus</i>
<b>VIII</b>	Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants
<b>IX</b>	Evaluation de l'activité anti-radicalaire en fonction des standards
<b>X</b>	Evaluation de l'activité réductrice en fonction des standards
<b>XI</b>	Corrélations entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH <sup>•</sup> et les teneurs en antioxydants
<b>XII</b>	Corrélations entre le pourcentage d'inhibition du radical ABTS <sup>•+</sup> et les teneurs en antioxydants
<b>XIII</b>	Corrélations entre le pourcentage de réduction du FeCl <sub>3</sub> et les teneurs en antioxydants
<b>XIV</b>	Corrélations entre le pourcentage de réduction du phosphomolybdate et les teneurs en antioxydants
<b>XV</b>	Matériel et réactifs utilisés

# *Introduction*

---

### **Introduction**

Depuis l'antiquité, l'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est connue pour traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires (**Muthu et al., 2006**). Ces derniers possèdent des structures chimiques diversifiées et un large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante, qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Huang et al., 2005**).

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification, et l'utilisation des composés phénoliques. Beaucoup de facteurs tels que le rapport solide/liquide, la température, le temps et le solvant d'extraction...etc., peuvent influencer de manière significative l'efficacité de l'extraction. Généralement, l'optimisation des processus d'extraction est réalisée par des méthodes empiriques ou statistiques (**Ghafoor et al., 2009**). L'approche traditionnelle pour l'optimisation des processus est longue et chère. En outre, des effets possibles d'interaction entre les variables ne peuvent pas être évalués et des fausses conclusions peuvent être tirées. À la différence de la méthode empirique conventionnelle, la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) peut tenir compte de la corrélation possible parmi les variables d'essai, tout en réduisant au minimum le nombre d'expériences. En effet, c'est un outil puissant qui peut fournir un état optimal complet pour améliorer un processus d'extraction (**Silva et al., 2007**).

*Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae), est parmi les espèces sauvages du bassin méditerranéen. Elle est connue localement en tant que «Amliles». Ses feuilles ont été employées en tant que laxatif, purgatif, diurétique, antihypertensif et dépurative. Le genre *Rhamnus* est caractérisé d'un point de vue phytochimique par l'abondance de substances phénoliques, particulièrement les flavonoïdes, les anthraquinones et les tannins, et qui sont décrits par de nombreux auteurs en tant que molécules antioxydantes (**Chouitah et al., 2012 ; Ben Ammar et al., 2008**).

En effet, l'objectif de ce travail était, d'une part, d'appliquer l'approche de RSM développée par le plan de Box-Behnken pour optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes des feuilles de *Rhamnus alaternus* en utilisant trois variables : le temps d'extraction, la polarité du solvant et le ratio solide/liquide. D'autre part, évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait flavonoïdique optimisé.

# *Partie bibliographique*

---



# *Les plans d'expériences*

---

### **I-1- Généralités sur les plans d'expériences**

Un plan d'expériences est une suite d'essais organisée à l'avance de manière à déterminer en un minimum d'essais avec un maximum de précision, l'influence de multiples paramètres sur une ou plusieurs réponses. Contrairement aux expérimentations habituelles, à chaque essai, les paramètres du plan peuvent varier simultanément. Ils sont de plus en plus utilisés dans l'industrie et dans les laboratoires de recherche (**Tinsson, 2010**).

Les plans d'expériences sont composés d'un groupe de techniques mathématiques et statistiques, qui peuvent être employées pour définir les rapports entre la réponse et les variables indépendantes (**Baş et Boyaci, 2007 ; Saraphirom et Reungsang, 2010**). Les premiers scientifiques à avoir posé le problème de l'organisation des essais sont des agronomes. Ils avaient en effet beaucoup de paramètres à étudier, et n'avaient pas la possibilité de multiplier le nombre d'expériences. De plus, la durée des expériences constituait une contrainte supplémentaire forte (**Faucher, 2006**). En 1925, Fisher a proposé pour la première fois une méthode avec laquelle on étudie plusieurs facteurs à la fois. Cette méthode a été développée par des statisticiens et des mathématiciens pour définir des tables d'expériences, permettant de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer, sans diminuer la pertinence de la campagne d'essais (**Faucher, 2006**).

### **I-2- Principe**

Les techniques de plan d'expériences permettent de répondre aux exigences de l'expérimentateur. En effet, son principe consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs (variables discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci permet d'une part, une forte diminution du nombre d'expériences à réaliser (tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés), et d'autre part, une détection des interactions entre les facteurs et la détermination du réglage (dit optimal de ces facteurs par rapport à une réponse) (**Goupy, 2006**). Il existe actuellement un nombre important de plans. Chacun, par ses propriétés, permet de résoudre un certain nombre de problèmes particuliers. Cependant, ils peuvent être divisés en deux grandes catégories (**Faucher, 2006**).

- ✓ Les plans qui permettent d'étudier (estimer et comparer) les effets des paramètres ;
- ✓ Les plans qui permettent de régler les paramètres afin d'atteindre un optimum.

L'expérimentateur, quel que soit son domaine d'étude, est toujours confronté au problème difficile de l'organisation optimale de ses essais. Il cherche à obtenir les bonnes informations dans les meilleurs délais et pour le moindre coût pour résoudre son problème. La méthode des plans d'expériences se révèle plus efficace que les démarches habituelles de conduite des essais, c'est-à-dire, qu'elle permet d'arriver aux mêmes résultats avec un nombre d'essais moindre tout en assurant à l'expérimentateur plus de sûreté et de précision sur les résultats attendus (**Tinsson, 2010**).

### **I-3- Terminologie**

De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens existant entre 2 types de variables.

#### **I-3-1- Réponse**

Elle représente la grandeur physique mesurée à chaque expérience réalisée, elle est le plus souvent quantitative (taux des flavonoïdes, taux des sucres...etc.), mais elle peut également être qualitative (gout, couleur...etc.) (**Kathleen et al., 2004**).

#### **I-3-2- Facteurs**

Est une notion qui désigne la grandeur physique modifiable par l'expérimentateur, sensée influencer sur les variations de la réponse. On distingue plusieurs types de facteurs :

- ✓ **Les facteurs continus** : ils peuvent adopter toutes les valeurs numériques réelles d'un intervalle [ $\text{borne}_{\text{inf}}$  –  $\text{borne}_{\text{sup}}$ ]. Par exemple ; la pression, la longueur, la concentration, le temps d'agitation, la température...etc. (**Goupy, 2006**) ;
- ✓ **Les facteurs discrets** : ils ne peuvent prendre que des valeurs particulières qui ne sont pas forcément numériques. On peut représenter un facteur discret par une lettre ou un nom, par exemple, on peut s'intéresser aux couleurs d'un produit : bleu, rouge, jaune...etc. (**Goupy, 2006**) ;
- ✓ **Les facteurs ordonnables** : il s'agit des facteurs discrets que l'on peut mettre dans un ordre logique (premier, deuxième et troisième, ou grand, moyen et petit...etc.) (**Goupy et Creighton, 2006**) ;
- ✓ **Les facteurs booléens** : sont des facteurs discrets qui ne peuvent prendre que deux valeurs : ouvert ou fermé, blanc ou noir, haut ou bas...etc. (**Goupy et Creighton, 2006**).

### **I-3-3- Espace expérimental**

C'est un espace à deux dimensions, il facilite les représentations graphiques. Un facteur continu peut être représenté par un axe gradué et orienté. S'il y a un second facteur continu, il est représenté lui aussi par la même manière. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier, on obtient ainsi un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (**Annexe I**). Ce dernier comprend tous les points du plan «facteur 1 × facteur 2» et chacun d'eux représente une expérience. S'il y a un troisième facteur, on le représente aussi par un axe orienté et gradué, et on le positionne perpendiculairement aux deux premiers (**Goupy, 2006**).

### **I-3-4- Niveau d'un facteur**

C'est la délimitation du domaine de variation d'un facteur donné. En général, la variation de chaque facteur est délimitée par deux niveaux : supérieur (+1) et inférieur (-1) (**Annexe II**) (**Silou et al., 2004**).

### **I-3-5- Domaine d'étude**

Le regroupement des domaines des facteurs définit le «domaine d'étude». Ce dernier est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais ; qui est défini par les niveaux supérieurs et les niveaux inférieurs de tous les facteurs (**Annexe III**) (**Goupy, 2006**).

## **I-4- Optimisation par la méthodologie des surfaces de réponse**

L'optimisation se rapporte à améliorer l'exécution d'un système, d'un processus, ou d'un produit afin d'obtenir la réponse maximale. L'optimisation de limite a été utilisée généralement en chimie analytique afin de découvrir les conditions d'application de procédés qui donnent la meilleure réponse (**Bezerra et al., 2008**). Après la détermination de la forme graphique et analytique de notre réponse, il est primordial d'aller chercher les conditions expérimentales donnant un meilleur résultat. Cette étape nécessite préalablement une connaissance assez profonde du phénomène étudié (**Aslan et Cebeci, 2007**).

La RSM, est un ensemble de techniques mathématiques qui se base sur la conception expérimentale pour déterminer la portée des variables d'entrée indépendantes. Cette méthode permet grâce à des modèles mathématiques empiriques, de déterminer une relation d'approximation entre les réponses de sortie et les variables d'entrée pour

optimiser les paramètres du procédé afin d'atteindre les réponses souhaitables (**Annexe IV**) (**Ragonese et al., 2002**).

Box et Wilson sont les premiers à introduire la théorie de la RSM en 1951 (**Pierre, 2008**), et qui devient par la suite la plus utilisée pour l'optimisation des processus. Il existe plusieurs types de plans, les plus connus et les plus utilisés sont les plans composites centrés, les plans de Box-Behnken, les plans de doelhert et les plans hybrides (**Bezerra et al., 2008**).

#### I-4-1- Plan de Box-Behnken

##### I-4-1-1- Définition

Box-Behnken est un type de plan de RSM, employé pour examiner le rapport entre une ou plusieurs variables de réponse et un ensemble de paramètres expérimentaux quantitatifs. L'application des conceptions de Box-Behnken a été enregistrée dans l'optimisation des processus de technologie alimentaire, des études microbiologiques et des travaux du développement pharmaceutique de formulation (**Ragonese et al., 2002**). Box et Behnken ont suggéré comment choisir les points à partir de l'arrangement factoriel à trois niveaux, ce qui permet une estimation efficace des coefficients de premier et de second ordre du modèle mathématique. Tous les niveaux de facteur doivent être ajustés seulement à trois niveaux (- 1, 0, +1) avec des intervalles équidistants entre ces niveaux (**Bezerra et al., 2008**). Le nombre d'expériences (N) exigé pour le développement du Box-Behnken est défini comme suit :  $N = 2k + 2k + C_0$ , (où k est le nombre de facteur et  $C_0$  est le nombre de points centraux). Dans le cas de trois facteurs, ce plan est représenté sous forme d'un cube à 12 arêtes qui représentent 12 essais sur chacun avec trois essais au centre (**Annexe V**) (**Ferreira et al., 2007**).

##### I-4-1-2- Modèle mathématique postulé

Le modèle mathématique utilisé par le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, est un modèle du second degré qui relie la réponse aux facteurs (**Yetilmezsoy et al., 2009**) :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \dots + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon$$

Où :

- $Y$  : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée ;
- $X_i$  : représente le niveau attribué au facteur  $i$  par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur ;
- $\beta_0, \beta_i, \beta_{ij}, \beta_{ii}$  : sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences ;
- $\varepsilon$  : l'erreur (**Goupy, 2006 ; Zhang et al., 2007**).

Dans le cas de model de Box-Behnken à trois facteurs, il existe 15 points expérimentaux fournissant chacun une équation, dont dix équations servent à calculer le coefficient de corrélation et cinq pour le résidu. L'existence des points répétés au centre du domaine d'étude, servent à calculer l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement par le logiciel (**Goupy, 2006 ; Yetilmezsoy et al., 2009**).

#### **I-4-1-3- Quelques applications des plans de Box-Behnken**

- Optimisation des fermenteurs, exemple : optimisation de la production de biohydrogène à partir de sirop de shorgho (**Saraphirom et Reungsang, 2010**) ;
- Optimisation des méthodes chromatographiques, exemple : optimisation de l'extraction par chromatographie en phase liquide des flavonoïdes à partir du *Pueraria lobata* (**Wang et al., 2008**).

#### **I-4-2- Avantages de la méthodologie des surfaces de réponse**

- RSM offre un grand nombre d'informations avec un nombre restreint d'expériences. En effet, les méthodes classiques sont longues et un grand nombre d'expériences sont nécessaires pour expliquer le comportement d'un système ;
- L'équation de modèle clarifie facilement les effets d'interactions des paramètres indépendants sur la réponse ;
- RSM est un outil nécessaire pour l'optimisation des processus chimiques et biochimiques (**Baş et Boyaci ; 2007**).

*Généralités sur Rhamnus  
alaternus*

---

## II-1- Description botanique

### II-1-1- Généralités

*Rhamnus alaternus* est une espèce végétale qui appartient à la famille des Rhamnacées. C'est une famille endémique d'environ 50 genres et 900 espèces, de catégorie angiospermes dite plantes à fleurs, et concernent des plantes herbacées, arbustes et arbres. (Richardson et al., 2000). Les plantes de cette famille ont fait l'objet de nombreuses indications thérapeutiques en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne (Mahmoudi et al., 2013). En Algérie, il existe 9 espèces végétales appartenant à 3 genres qui sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1963). *R. alaternus* possède plusieurs noms vernaculaires qui sont indiqués dans le tableau I.

**Tableau I :** Les noms vernaculaires de *Rhamnus alaternus*.

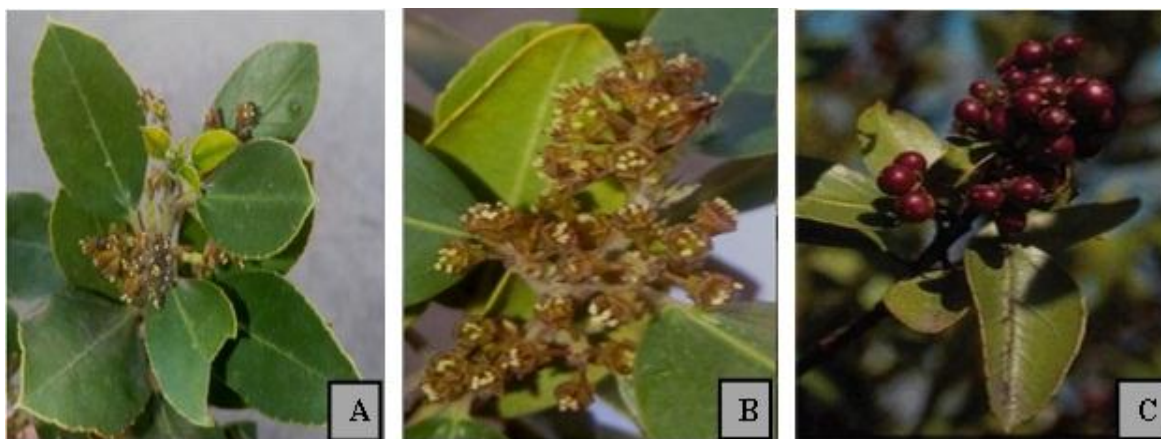
Régions	Noms vernaculaires
Noms communs	Nerprun, Boyrge épine, épine de cerf (Rameau et al., 2008).
Noms terguis et kabyles	Ajroudj, khalis n'imidekh, Amliles (Debeaux, 1894).
Noms arabes	Mliles, Mlila, Soufaïr, Ouchbat el Safir (Debeaux, 1894), sfayra (Abou-chaar et Shamlia, 1980), ou bien Oud El-khir (Ben Ammar et al., 2011).
Nom anglais	Buckthorn (Gubb, 1913).
Noms français	Nerprun méditerranéen, Alterne (Izhaki et al., 2002).
Nom allemand	Kreülzdorn (Gubb, 1913).
Noms espagnol	Aladierna, Cosco Unia, Sanguino d'Andalucia (Gubb, 1913).
Noms italien	Alaterno, Legno Puzzo (Gubb, 1913).

### II-1-2- Caractéristiques morphologiques

*R. alaternus* est un arbuste dioïque très répondeu dans le bassin méditerranéen. Il peut atteindre 5 m de hauteur, il est pourvu de rameaux alternes, non épineux. Les feuilles sont alternes et à bords lisses, coriaces, persistantes, luisantes, souvent dentées (Gubb, 1913), elles sont ovales ou lancéolées, elles restent sur l'arbre pendant deux années environ (Figure 01) (Miralles et al., 2011; Mathieu, 1860). Ses fleurs sont petites; de 3 à 4 mm de diamètre à couleur jaune regroupées en petites grappes. Elles fleurissent aux mois de mars



et avril et produisent des fruits charnus ayant une taille de 4,9 à 9,9 mm de largeur et 4,5 à 8,1 mm de longueur. Elles ont une couleur d'abord rouge, puis noire à maturité, avec 2 ou 3 sillons, et représentent ainsi une source importante d'eau et d'éléments nutritifs pour des oiseaux et de petits mammifères (El-Aou-Auad et al., 2015). Chaque fruit de *R. alaternus* est composé de 2 à 5 graines chacune incluse dans un endocarpe. Elles sont principalement dispersées par les oiseaux frugivores (Bas et al., 2009 ; Boussahel et al., 2015).



**Figure 01 :** *Rhamnus alaternus* L : (A) feuilles (originale), (B) fleurs (originale) et (C) fruits (Longo et al., 2005).

**II-1-3- Classification botanique de *R. alaternus***

La classification de la plante est résumée dans le tableau II.

**Tableau II :** Classification systématique de *R. alaternus* (Quezel et Santa, 1963).

Domaine	Aucaryota-eucaryote
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rhosidae
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhmanus alaternus</i>

#### **II-1-4- Ecologie et répartition géographique**

*R. alaternus* est une plante héliophile distribuée dans tout le bassin méditerranéen ; principalement en Afrique du nord (Algérie, Tunisie, Maroc), et sur le littoral de l'Europe méridionale et se développe spontanément sur les coteaux calcaires à une altitude comprise entre 0 à 1000 mètres et les roches nues. Il peut également se développer sur les marges des forêts et îles. Il est bien adapté à la température, au rayonnement solaire élevé et au déficit de pression et de vapeur (**Boussahel et al., 2015 ; Varone et Gratani, 2009**).

#### **II-2- Usage traditionnel**

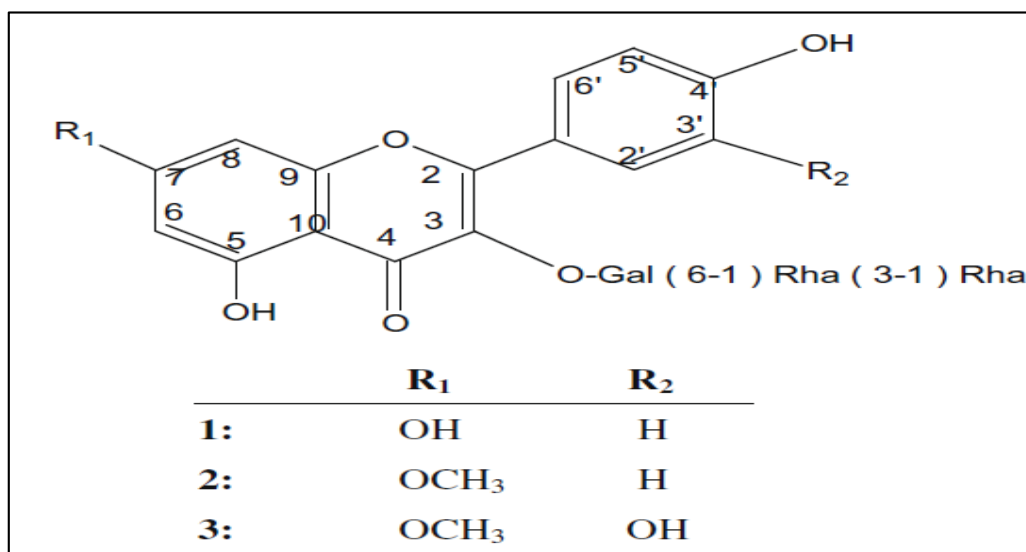
Le nerprun méditerranéen était l'objet de nombreuses indications thérapeutiques dans la médecine traditionnelle dans le bassin méditerranéen (**Benchiha et al., 2015**). Il est employé en tant que digestif, diurétique, hypotensif et utilisé en shampooing pour fortifier les cheveux et éliminer les pellicules (**Bhourri et al., 2012**).

Les feuilles de *R. alaternus* ont été utilisées comme laxatifs, purgatifs et hypotensive (**Chouitah et al., 2012**). Elles sont aussi utilisées dans le traitement de la peau, des douleurs articulaires, contre l'inflammation de la bouche et d'aphtes, et contre l'anémie, la jaunisse «ictère» et autres maladies graves d'hémoglobine. L'écorce, quant à elle est employée dans les pays de l'Afrique du Nord contre certaines affections dermatologiques et hépatiques (**Ben Ammar et al., 2007**). Elle est également utilisée dans le traitement des douleurs dentaires, des problèmes de côlon et d'intestins, le traitement des brûlures et soins oculaire (**Ben Ammar et al., 2008**). Cependant, les baies de *R. alaternus* ont une action purgative, d'une saveur âpre, employés en médecine vétérinaire. Elles sont utilisées contre les maladies des voies respiratoires, la purification du sang et par les femmes enceintes contre un risque d'anémie (**Gubb, 1913**).

#### **II-3- Composition phytochimique de *R. alaternus***

Les études phytochimiques sur les extraits de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus* ont révélé la présence de plusieurs composés phénoliques (**Ben Ammar et al., 2009**) : les Anthraquinones telles que l'emodin, chrysophanol, physcione et alaternine, les coumarines, les tanins (**Ben Ammar et al., 2007**), et principalement les flavonoïdes (**Wei et al., 1992**) (**Annexe VI**).

*R. alaternus* fait partie des espèces riches en flavonoïdes, elle contient de la quercétine, apigénine, le kaempferol, kaempferol 3-O-bisorhamminoside, rhamnocitrin-3-O-bisorhamminoside et rhamnetin-3-O-bisorhamminoside (**Figure 02**) (**Benchiha et al., 2015 ; Ben Ammar et al., 2009**).



**Figure 02 :** Structure de kaempferol 3-O-bisorhamminoside, rhamnocitrin-3-O-bisorhamminoside et rhamnetin-3-O-bisorhamminoside (**Ben Ammar et al., 2009**).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés, avec un glucide. Ils sont d'une grande variété structurale. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Dudley et al., 1989**).

Selon **Croteau et al. (2000)**, les métabolites secondaires se classent en trois groupes chez les plantes :

- Les polyphénols : tannins, lignines, flavonoïdes et acides phénoliques ;
- Alcaloïdes ;
- Terpène : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sésquiterpènes (C15), diterpènes (C20), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (peut aller jusqu'à C1000).

**II-4- Activités biologiques****II-4-1- Activité antioxydante**

Les composés phénoliques peuvent agir en tant que des antioxydants, en raison de leur capacité à donner l'hydrogène ou des électrons pour empêcher la formation des radicaux libres et en améliorant le système endogène antioxydant. Les extraits organiques de *R. alaternus* présentent une forte activité antioxydante, en inhibant l'activité de la xanthine oxydase et en réduisant la peroxydation lipidique dans une variété de cellules humaine (les mastocytes et les tissus de cerveau) grâce à leur richesse en flavonoïdes, qui sont de bons chélateurs de métaux (**Ben Ammar et al., 2009 ; Ben Ammar et al., 2005**).

**II-4-2- Activité antimutagène**

L'effet oxydant causé par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), provoque l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires, qui peuvent inclure des dommages d'ADN, des protéines et l'oxydation des enzymes. L'extrait organique de *R. alaternus* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagènes (Aflatoxine B1) probablement dû à son abondance en flavonoïdes et en tannins (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2007**).

**II-4-3- Activité antimicrobienne**

L'extrait méthanolique de *R. alaternus* possède une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries Gram<sup>+</sup> représentées par, *Staphylococcus aureus*, et Gram<sup>-</sup> représentées par *Escherichia coli* et sur une levure, *Candida albicans* (**Mashhadian et Rakhshandeh, 2005**). De plus, l'huile essentielle des feuilles de *R. alaternus* provoque des dommages au niveau des membranes bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*), car lorsqu'il traverse la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, il perturbe la structure de leurs différentes couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides (**Chouitah et al., 2012**).

**II-4-4- Activité anti-enzymatique**

La médecine moderne autorise l'utilisation des flavonoïdes dans le traitement de plusieurs maladies, en raison de leur capacité à empêcher des enzymes spécifiques, y compris les hydrolases, l'oxydoréductase, l'ADN synthétases, les ARN polymérases, la

lipoxygénase, le glutathion S-transférase et un certain nombre d'enzymes digestives tel que l' $\alpha$ -amylase, la trypsine et la lipase (Stocker et al., 2004).

Les travaux de **Stocker et al. (2004)**, ont démontré que les flavonoïdes des extraits de *R. alaternus* possèdent une activité inhibitrice du carboxyl estérase. Les iso-enzymes de cette dernière sont connues comme des estérases de sérine, qui sont largement distribuées dans les tissus animaux. Elles sont essentielles dans le catabolisme de nombreux xénobiotiques tel que les carboxylesters, des thio-esters et des amides aromatiques. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive.

#### **II-4-4- Activité anti-inflammatoire**

**Ben Ammar et ses collaborateurs. (2005)**, ont montré que les extraits de *R. alaternus* ont un potentiel d'activité anti-inflammatoire, liée à la richesse de la plante en composées phénoliques, principalement les tannins et les anthraquinones telles que l'émodyne. Cette propriété est due à leurs pouvoirs de neutraliser les radicaux libres.

D'après la littérature scientifique, les extraits des feuilles de cette plante sont considérés comme une bonne source des composés bioactifs, possédant un pouvoir antigénotoxique (**Ben Ammar et al., 2008**), et un pouvoir antihépatotoxique important (**Benchiha et al., 2015**).

# *Partie expérimentale*

---

# *Matériel et méthodes*

---

### III-1- Matériel végétal

#### III-1-1- Récolte et séchage

Le matériel végétal qui a été utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de *R. alaternus*, qui ont été récoltées au mois de décembre 2016 dans la région de Tifra, daïra de Sidi Aich (Bejaia). Une fois récoltées, les feuilles fraîches de *R. alaternus* ont été nettoyées afin d'éliminer toutes traces de poussières, puis elles ont été séchées à l'air libre, à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, les feuilles ont été transférées à l'étuve à 40 °C pendant 48h pour affiner le séchage et obtenir un meilleur broyage.

#### III-1-2- Broyage et tamisage

Après séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine. Cette dernière est ensuite tamisée en utilisant un tamis de 250 µm de diamètres pour obtenir une poudre homogène (**Figure 03**). La poudre obtenue est ensuite conservée dans des récipients en plastiques bien fermés et stockés dans un endroit sec à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à utilisation.



**Figure 03** : Les feuilles fraîches (a), sèches (b) et poudre (c) de *R. alaternus* (originale).

### III-2- Méthodes

#### III-2-1- Optimisation de l'extraction des flavonoïdes

##### III-2-1-1- Optimisation des conditions d'extraction

Le plan d'expérience qui a été utilisé dans cette étude est divisé en deux parties. Premièrement, le choix des paramètres d'optimisation d'extraction. En variant une variable indépendante à la fois et en maintenant les autres constantes. Deuxièmement, l'optimisation de l'extraction en fonction de la RSM (**Chan et al., 2009**).



Une conception de Box-Behnken a été utilisée pour étudier la réponse Y. Trois variables indépendantes à trois niveaux (-1, 0, +1) ont été choisies dans cette étude pour optimiser l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de *R. alaternus* (**Tableau III**) (**Hismath et al., 2011**). Ces trois variables sont les suivantes : le temps d'extraction (X1, heures), la polarité du solvant (X2, %) et le ratio (X3, p/v).

**Tableau III** : Variables et leurs niveaux choisis pour l'optimisation d'extraction des flavonoïdes.

<b>X<sub>1</sub> Temps (heures)</b>	<b>X<sub>2</sub> Polarité (% (v/v))</b>	<b>X<sub>3</sub> Ratio (p/v)</b>
(-1) 6	(-1) 40	(-1) 1/15
(0) 12	(0) 70	(0) 1/10
(+1) 18	(+1) 100	(+1) 1/5

Selon le plan choisi de Box-Behnken, 15 tests ont été réalisés, dont trois tests au centre (0, 0, 0) qui permettent l'évaluation de l'erreur (**Tableaux IV**). Tous les tests ont été effectués dans un ordre randomisé (réparti de manière aléatoire) pour réduire au minimum l'effet de la variabilité inattendue dans l'observation (**Liu et al., 2010**).

**Tableaux IV** : Tableau récapitulatif des expériences du plan de Box-Behnken pour trois facteurs (**Goupy, 2006**).

<b>n ° d'essai</b>	<b>Facteur 1</b>	<b>Facteurs 2</b>	<b>Facteurs 3</b>
<b>01</b>	-1	-1	0
<b>02</b>	+1	-1	0
<b>03</b>	-1	+1	0
<b>04</b>	+1	+1	0
<b>05</b>	-1	0	-1
<b>06</b>	-1	0	+1
<b>07</b>	+1	0	-1
<b>08</b>	+1	0	+1
<b>09</b>	0	-1	-1
<b>10</b>	0	+1	-1
<b>11</b>	0	-1	+1
<b>12</b>	0	+1	+1
<b>13</b>	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0

### **III-2-1-2- Extraction des flavonoïdes**

Dans notre étude, l'extraction des flavonoïdes a été réalisée par macération dans l'acétone, qui est utilisé comme solvant d'extraction selon la méthode décrite par **Heinonen et al. (1998)**, et **Wong et al. (2015)**, avec quelques modifications. Une prise d'essai de la poudre des feuilles de *R. alaternus* a été macérée dans un volume d'acétone (ratio p/v : 1/15, 1/10 et 1/5), à différentes polarités (40, 70 et 100%). Ce mélange a été ensuite laissé sous agitation magnétique à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant différents temps (6, 12 et 18h) (**Tableau III**). Après macération, le mélange a été ensuite centrifugé à une vitesse de 5600 tour/minute pendant 20 min, puis filtré sur papier wattman. Le surnageant récupéré a été utilisé à chaque fois pour doser les flavonoïdes, afin de valider le model de Box-Behnken cité précédemment.

**Remarque :** le dosage des antioxydants et l'évaluation de l'activité antioxydante ont été réalisés avec l'extrait optimisé par la RSM (**Annexe VII**).

### **III-2-2- Dosage des antioxydants**

#### **III-2-2-1- Dosage des polyphénols totaux**

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Hatami et al. (2014)**, avec quelques modifications. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présente dans l'échantillon (**Lapornik et al., 2005**).

Un volume de 250  $\mu$ l de l'extrait a été mélangé avec 1,25 ml du réactif de Folin-ciocalteu (0.1N dans de l'eau distillée), après 5 min d'incubation, 1 ml de solution de carbonate de sodium (6%) a été ajouté. Le mélange est vortexé, puis incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 90 min. L'absorbance a été mesurée à 755 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc préparé dans les mêmes conditions sauf que l'extrait est remplacé par l'acétone. La concentration des polyphénols totaux est calculée, en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard, préparée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/gramme de matière sèche (mg EAG/g de MS).

### **III-2-2-2- Dosage des flavonoïdes totaux**

La méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) décrite par **Ordenez et al. (2006)**, a été employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait acétonique de *R. alaternus*.

Cette méthode est fondée sur l'oxydation des flavonoïdes par  $\text{AlCl}_3$ , qui forme un complexe jaune très stable avec les groupements hydroxyles (OH) des phénols et qui est quantifié à une longueur d'onde de 430 nm (**Ordenez et al., 2006**). Un volume de 1 ml d'extrait est mélangé avec 1 ml de solution d' $\text{AlCl}_3$  à 2%. Le mélange est vortexé et l'absorbance est mesurée à 430 nm après 45 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Une courbe d'étalonnage établie avec la quercitine dans les mêmes conditions est utilisée pour calculer les concentrations en flavonoïdes totaux. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercitine/gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS).

### **III-2-2-3- Dosage des flavones et flavonols**

La teneur en flavones et flavonols a été déterminée suivant la méthode décrite par **Kosalec et al. (2004)**. Dans un tube à essai, un volume de 250  $\mu\text{l}$  d'extrait est ajouté à 1,4 ml d'eau distillé, 750  $\mu\text{l}$  d'éthanol, 50  $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium (1M) et 50  $\mu\text{l}$  de solution de chlorure d'aluminium (10%). Après agitations, le mélange réactionnel est incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 415 nm.

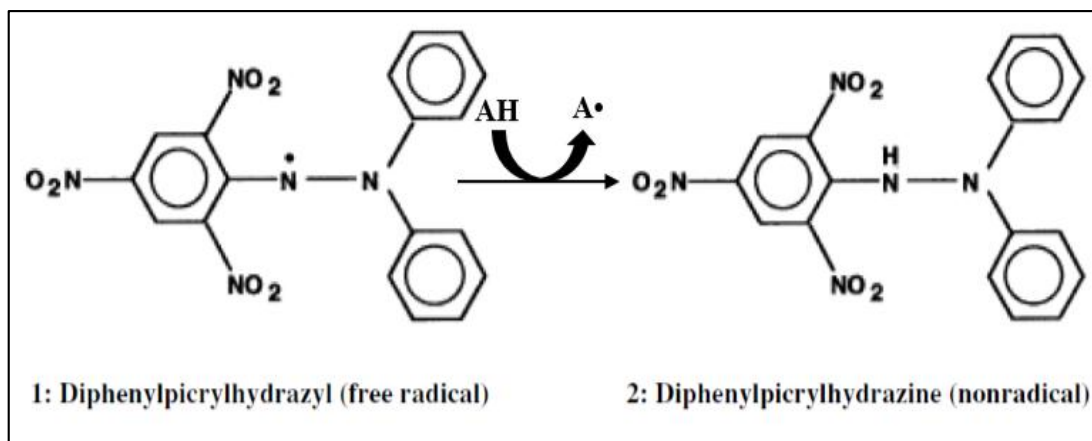
La concentration des flavones et flavonols contenue dans l'extrait des feuilles de *R. alaternus*, a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions que l'extrait en utilisant la quercétine. Les résultats sont exprimés en mg EQ/g de MS.

### **III-2-3- Détermination de l'activité anti-radicalaire**

#### **III-2-3-1- Neutralisation du radical DPPH $\cdot$**

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre et stable, de couleur violette qui devient jaune-vert quand il est réduit par un donneur de proton (H) (**Figure 04**), dont l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (**Molyneux, 2004**). L'évaluation de

l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH<sup>•</sup> a été déterminée selon la méthode d'Athamena *et al.* (2010), avec quelques modifications.



**Figure 04 :** Structure de DPPH<sup>•</sup> (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH (Où AH est un composé capable de céder un H au radical DPPH) (Molyneux, 2004).

Un volume de 2,45 ml d'extrait acétonique à différentes concentrations a été ajouté à 50 µl de la solution méthanolique de DPPH (5 mM). Après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 517 nm. La quercétine a été utilisée comme standard et le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI \%} = ((A_T - A_{\text{Ech}}) / A_T) \times 100$$

D'où :

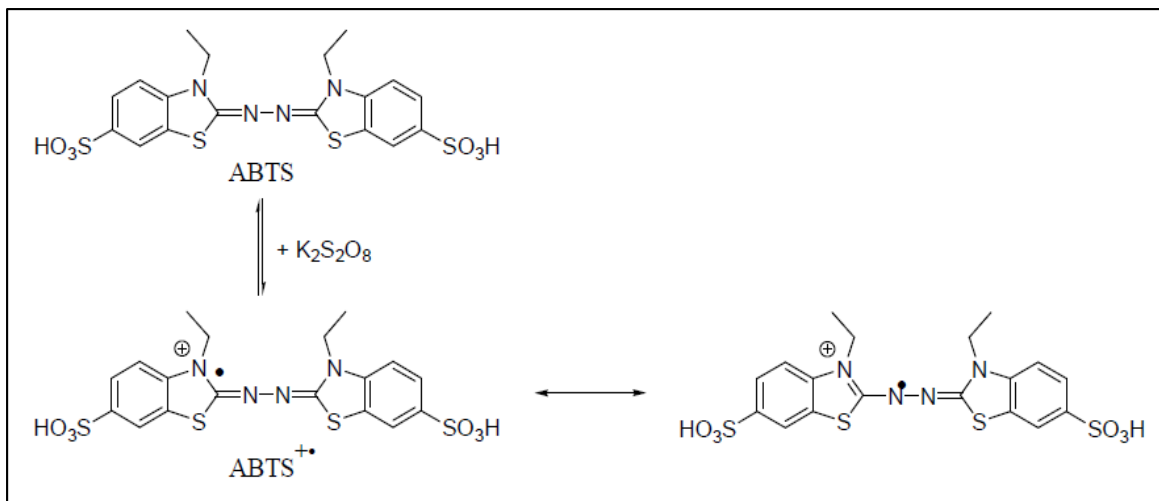
- $A_T$  : Absorbance de témoin (2,45 ml d'acétone + 50 µl DPPH) ;

- $A_{\text{Ech}}$  : Absorbance de l'échantillon (2,45 ml d'extrait + 50 µl DPPH).

### III-2-3-2- Neutralisation du radical ABTS<sup>•+</sup>

La méthode utilisant le radical ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)), est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination du pouvoir anti-radicalaire des antioxydants. Elle est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu vert en le transformant en ABTS-H<sup>+</sup> incolore (Figure 05). L'ABTS<sup>•+</sup> est un radical stable non trouvé dans le corps humain (Alam *et al.*,

2013). L'activité scavenging du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  a été mesurée en utilisant le protocole de Re *et al.* (1999), avec quelques modifications.



**Figure 05 :** Formation du radical cationique  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  à partir de l'ABTS (Sarr *et al.*, 2015).

Le radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  a été préparé en réagissant 7 mM d'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium et en incubant à température ambiante dans l'obscurité pendant 16 heures. La solution d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$  a été diluée ensuite avec l'eau distillée afin d'obtenir une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm. 1,9 ml de la solution d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$  est additionnée à 0,1 ml de l'extrait acétonique à différentes concentrations et vortexé. Le mélange réactionnel obtenu est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 6 min, puis, l'absorbance a été immédiatement mesurée à 734 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI \%} = ((A_T - A_{\text{Ech}}) / A_T) \times 100$$

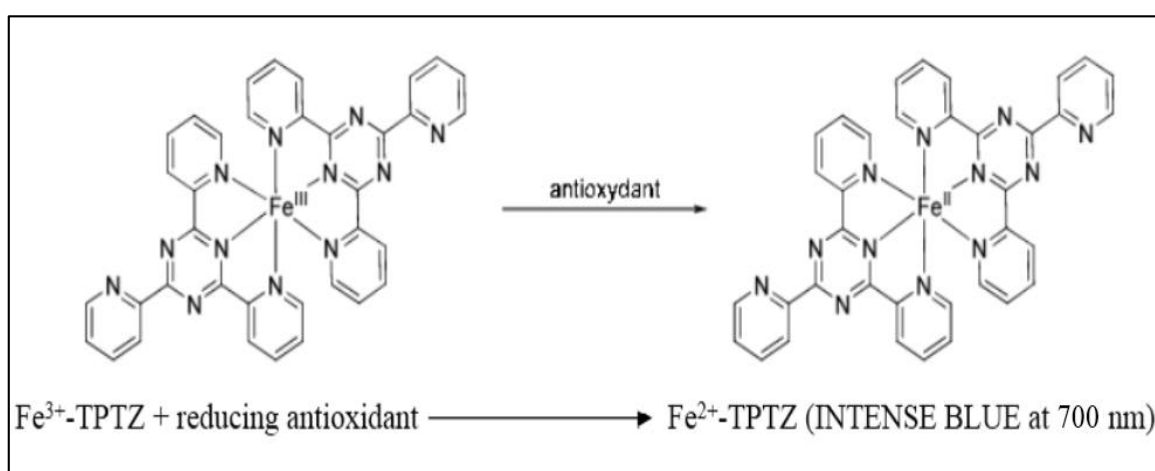
D'où :

- $A_T$  : Absorbance du témoin (1,9 ml d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$  + 0,1 ml d'acétone) ;
- $A_{\text{Ech}}$  : Absorbance de l'extrait (1,9 ml d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$  + 0,1 ml d'extrait).

### III-2-4- Détermination de pouvoir réducteur

#### III-2-4-1- Réduction du chlorure ferrique

Le pouvoir réducteur de l'extrait acétonique a été évalué en utilisant la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Lim et al., 2007). Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants (Figure 06). En revanche, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité optique de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm (Ou et al., 2001).



**Figure 06** : Schéma sur la réaction de test FRAP ( $\text{Fe}^{2+}$  : Ions ferreux,  $\text{Fe}^{3+}$  : Ions ferriques et TPTZ : ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) (Prior et al., 2005).

0,5 ml d'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1,25 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min, ensuite, 1,25 ml d'acide trichloroacétique (10%) sont ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. 1,25 ml de surnageant est mélangé avec 1,25 ml d'eau distillée et 0,25 ml de chlorure ferrique (0,1%). Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. La quercitine a été utilisée comme standard.

Le pouvoir réducteur est estimé en pourcentage de réduction selon l'équation suivante :

$$\text{PI \%} = ((A_{\text{Ech}} - A_{\text{T}}) / A_{\text{Ech}}) \times 100$$

Avec :

- $A_{\text{T}}$  : Absorbance de témoin (sans l'extrait) ;
- $A_{\text{Ech}}$  : Absorbance de l'extrait.

### III-2-4-2- Réduction du phosphomolybdate

Cette méthode spectroscopique est utilisée pour la détermination quantitative de la capacité antioxydante, par la formation d'un complexe du phosphomolybdène. Le dosage est basé sur la réduction de  $\text{Mo}^{+6}$  en  $\text{Mo}^{+5}$  avec la formation d'un complexe phosphate/ $\text{Mo}^{+5}$  de couleur verte en pH acide (Alam et al., 2013). L'évaluation a été réalisée par la méthode décrite par Ramalakshmi et al. (2008).

Un volume de 0,2 ml d'extrait à différentes concentrations a été ajouté à 2 ml de réactif de molybdate (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de potassium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Après agitation à l'aide d'un vortex, les mélanges ont été incubés dans un bain marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. L'acide gallique a été utilisé comme standard.

Le pourcentage de pouvoir réducteur du phosphomolybdate est calculé par la relation suivante :

$$\text{PI \%} = ((A_{\text{Ech}} - A_{\text{T}}) / A_{\text{Ech}}) \times 100$$

Avec :

- $A_{\text{T}}$  : Absorbance de témoin (sans l'extrait) ;
- $A_{\text{Ech}}$  : Absorbance de l'extrait.

### III-3- Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart-type en utilisant Microsoft Excel 2013. La détermination des IC50 (concentration inhibitrice à 50%) a été réalisée en utilisant le logiciel Origin 9.0.

Les résultats expérimentaux du plan d'expérience de Box-Behnken sont traités par le logiciel JMP7. Toutes les données ont été effectuées en triple, et les résultats expérimentaux obtenus ont été exprimés en tant que moyenne. Les données ont été analysées par analyse de la variance, et les valeurs moyennes ont été considérées sensiblement différentes quand  $p < 0,05$ .



## *Résultats et discussion*

---

#### **IV-1- Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes**

L'objectif de cette étude était d'optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus*, par la méthodologie des surfaces de réponse. Trois paramètres ont été étudiés : le ratio solide/liquide, la polarité du solvant et le temps d'extraction.

##### **IV-1-1- Essais préliminaires**

###### **IV-1-1-1- Choix du solvant d'extraction**

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique et de la polarité des solvants utilisés. Pour cela, il est très difficile d'élaborer un procédé d'extraction approprié à tous les composés phénoliques d'une plante. Les solvants organiques les plus utilisés dans l'extraction des composés phénoliques sont en particulier l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le propanol et l'acétate d'éthyle. Ces derniers sont le plus souvent additionnés avec des proportions différentes d'eau pour créer un milieu plus polaire qui facilitent l'extraction des composés les plus polaires (Naczk et Shahidi, 2006 ; Al-Farsi et al., 2005).

Selon les résultats de plusieurs études (Hismath et al., 2011 ; Uma et al., 2010 ; Chan et al., 2009 ; Chirinos et al., 2007), l'acétone est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, en particulier, les tannins condensés et les flavonoïdes. Plus le poids moléculaire du solvant est haut, plus la polarité est faible, ce qui permet à d'autres substances de poids moléculaire à peu près identique d'être facilement extraites (Musa et al., 2011).

L'acétone est le solvant le moins polaire, comparé au méthanol, l'eau et l'éthanol, ainsi il est plus efficace pour la dégradation des parois cellulaires qui ont des caractères non polaire, en favorisant l'obtention d'un taux élevé en composés phénoliques (Uma et al., 2010). Dans cette présente étude, l'acétone a été utilisée comme solvant d'extraction avec différentes polarités, dans le but d'évaluer l'effet de cette dernière sur le taux d'extraction des flavonoïdes.

###### **IV-1-1-2- Choix du temps d'extraction**

Le temps d'extraction est l'un des paramètres qui influence sur l'extraction des composés phénoliques. L'augmentation du temps de contact du solvant avec des solides

peut améliorer la diffusion des composés du solide vers le solvant, ce qui permet d'avoir une meilleure extraction (Ghafoor *et al.*, 2009).

#### **IV-1-1-3- Choix de ratio (solide/liquide) d'extraction**

D'après Silva *et al.* (2007), le rapport solide/liquide possède un impact significatif sur l'extraction des composés phénoliques. En effet, une diminution de ce rapport influence positivement sur le rendement d'extraction, quel que soit le solvant utilisé. Cela peut être expliqué par le phénomène de transfert de masse ; plus ce rapport est inférieur, plus les forces d'entraînement dans le solide sont grandes, ce qui engendre une diffusion importante. Le rapport solide/liquide modifie aussi la solubilité, la constante d'équilibre, et augmente ainsi le rendement d'extraction (Cheok *et al.*, 2012).

#### **IV-1-2- Plan d'expérience Box-Behnken**

##### **IV-1-2-1- Analyse des résultats**

Généralement l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques est influencée par multiples paramètres, tels que la température, le temps d'extraction, le rapport solide/liquide, la nature et la polarité du solvant...etc. (Liyana-Pathirana *et Shahidi*, 2005).

Dans cette étude, l'effet de différents facteurs sur la réponse a été réalisé en suivant le procédé de conception d'analyse du RSM. Les effets principaux des trois facteurs et leurs interactions, ont été étudiés afin d'optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus*. Les facteurs choisis sont :

- Le temps d'extraction (X1) (6, 12 et 18h) ;
- La polarité du solvant (X1) (40, 70 et 100 %) ;
- Le ratio solide/liquide (X3) (1/5, 1/10 et 1/15 p/v).

Les résultats (Tableau V), montrent que le taux d'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de *R. alaternus* varie de 1,9124 à 12,0216 mg EQ/g de MS. Tous les résultats de cette étude ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage réalisée en utilisant la quercitine comme flavonoïde standard (Annexe VIII) (Figure 1). L'équation de la courbe d'étalonnage était  $y = 0,1015x + 0,0955$ , avec un  $R^2 = 0,987$ .

Les résultats expérimentaux étaient très proches de résultats prédits par le logiciel (**Tableau V**). Cela indique qu'il y avait un degré élevé d'ajustement entre les valeurs observées dans l'expérience (valeurs réelles) et les valeurs prédites par le modèle de régression.

**Tableau V** : Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes par le plan d'expérience Box-Behnken des feuilles de *R. alaternus*.

n ° d'essai	Modèle	Temps (h)	Polarité (%)	Ratio (p/v)	Valeurs réelles TF (mg d'EQ/g)	Valeurs prédites TF (mg d'EQ/g)
1	-0+	6	70	1/5	3,6728	4,3533
2	--0	6	100	1/10	6,2015	6,1210
3	-0-	6	70	1/15	11,3728	10,9998
4	000	12	70	1/10	5,5333	5,5549
5	0--	12	40	1/15	7,6682	8,3800
6	0+-	12	100	1/15	3,3139	3,8071
7	+0+	18	70	1/5	1,9124	2,4369
8	0++	12	100	1/5	2,9057	2,2660
9	000	12	70	1/10	5,7456	5,5549
10	+0-	18	70	1/15	4,5051	3,6731
11	--0	6	40	1/10	12,0216	11,7946
12	+00	18	100	1/10	2,259	2,4860
13	000	12	70	1/10	5,3859	5,5549
14	0-+	12	40	1/5	2,6037	2,0384
15	+-0	18	40	1/10	3,4414	3,5219

#### IV-1-2-2- Validation du model

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique sert à lier la fonction de réponse et les données expérimentales. Afin d'avoir une bonne réponse, plusieurs paramètres doivent être vérifiés, tels que, la linéarité, l'effet quadratique des variables indépendantes, leur interaction et le coefficient de régression (**Chan et al., 2009**).

## a) Coefficient de corrélation

La forme mathématique du modèle a été jugée par le coefficient de corrélation ( $R^2$ ), qui est une mesure du degré d'ajustement, défini comme un rapport de variation expliquée par le modèle étudié (Wang *et al.*, 2008). Plus la valeur de  $R^2$  est proche de 1, plus le modèle adapte mieux les données réelles (Chan *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, la valeur de  $R^2$  pour le modèle de régression du taux des flavonoïdes était de 0,98 (Figure 07). Ceci suggère que seulement 2% des variations sont non expliquées par le modèle. En outre, la valeur de  $R^2_{\text{ajusté}}$  est de 0,9757, ce dernier est très proche de la valeur de  $R^2$ , ce qui confirme la haute significativité de notre modèle. D'après Hismath *et al.* (2011), le  $R^2_{\text{ajusté}}$  est la valeur corrigée de  $R^2$  après l'élimination des limites inutiles par le modèle. S'il y avait beaucoup de limites non significatives incluses dans le modèle, le  $R^2_{\text{ajusté}}$  serait remarquablement plus petit que le  $R^2$ .

De plus, l'analyse de la variance montre que les résultats du modèle sont très significatifs, puisque  $P= 0,0016$  ( $P < 0,05$ ), ce qui confirme la fiabilité du modèle (Figure 07).

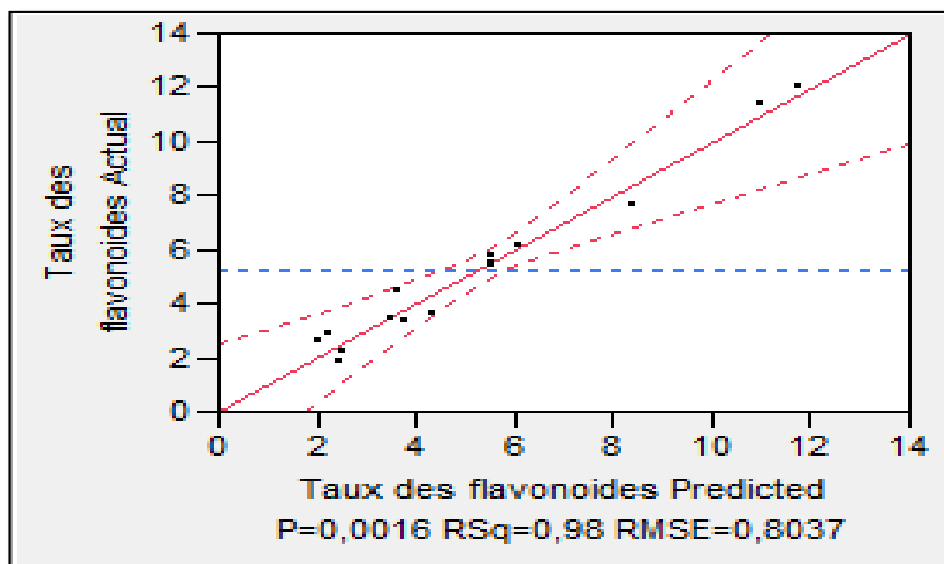


Figure 07 : Plan de prédiction réelle des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus*.

### b) Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse du modèle de régression des taux des flavonoïdes, consiste à analyser l'impact des facteurs (X1, X2 et X3) à  $P < 0,05$ , afin de déterminer leur ordre d'efficacité (leur influence) sur l'extraction des flavonoïdes (Chan et al., 2009). Les  $P$ -value ont été employées comme outil pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique les forces d'interaction entre les paramètres (Tableau VI). Plus la  $P$ -value est petite, plus le facteur correspondant est plus significatif (Liu et al., 2010).

#### b-1) Effet linéaire

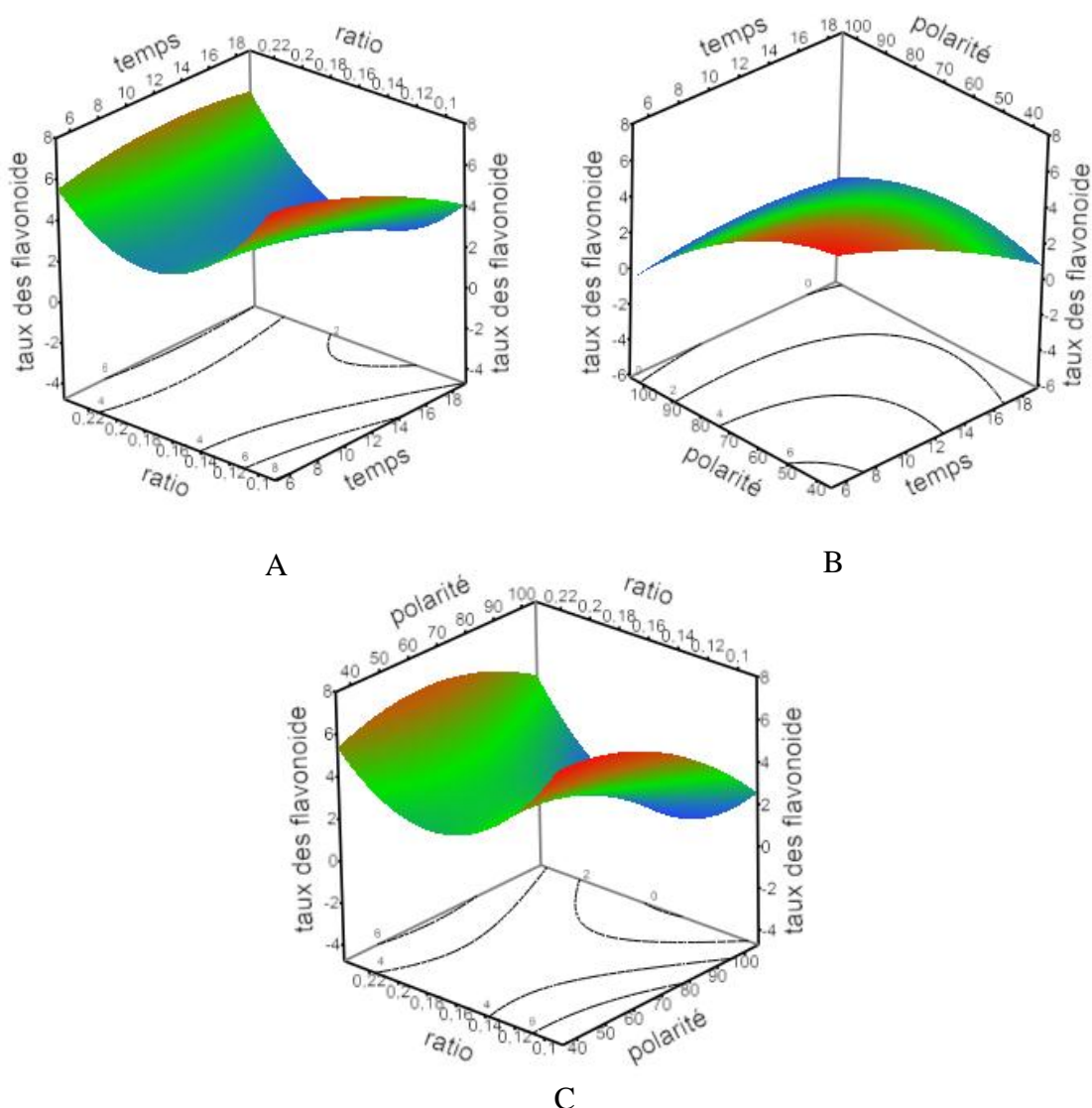
L'analyse statistique des données montre que deux facteurs ont influencé de manière significative sur le rendement d'extraction des flavonoïdes. Ces facteurs sont le temps d'extraction (X1) avec une probabilité de  $P = 0,003$  et un coefficient de l'ordre de  $-1,839779$ , ainsi que le ratio (X3) avec une probabilité de  $P = 0,0437$  et un coefficient de l'ordre de  $-107,441$ . Cependant, la polarité de solvant ne possède aucun effet significatif sur l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus* ( $P > 0,05$ ).

**Tableau VI :** Estimation des coefficients de régression du modèle polynômiale de second degré des feuilles de *R. alaternus* étudiées.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
Constante	32,84698	4,552987	7,21	0,0008*
<b>Linéarité</b>				
X <sub>1</sub> (temps)	-1,839779	0,341331	-5,39	0,0030*
X <sub>2</sub> (polarité)	-0,129376	0,074325	-1,74	0,1422
X <sub>3</sub> (ratio)	-107,441	40,05561	-2,68	0,0437*
<b>Interaction</b>				
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0064412	0,002232	2,89	0,0344*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,3645409	0,943994	3,16	0,0161*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,5970835	0,188799	2,00	0,0250*
<b>Quadratique</b>				
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	0,0231784	0,011618	2,00	0,1026
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-0,000454	0,000465	-0,98	0,3736
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	-15,573	129,719	-0,12	0,9091

**b-2) Effet d'interaction**

L'analyse des résultats montre que toutes les interactions possèdent une influence significative ( $P < 0,05$ ) sur l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus*. L'interaction X1X3 (temps-ratio) a présenté le plus grand effet sur l'extraction, avec une probabilité de 0,0161 et un coefficient de l'ordre de 3,365, suivi par X2X3 (polarité-ratio) avec une probabilité de 0,0250 et un coefficient de l'ordre de 0,597. Enfin, l'interaction X1X2 (temps-polarité) a montré le plus faible effet avec un  $P = 0,0344$  et un coefficient de l'ordre de 0,006 (**Figure 08**). En effet, l'effet d'interaction des différents facteurs a été rapporté par plusieurs auteurs (**Chan et al., 2009 ; Silva et al., 2007**).



**Figure 08** : Surfaces de réponse pour les interactions des trois facteurs : (A) temps-ratio, (B) temps-polarité et (C) polarité-ratio.

**b-3) Effet quadratique**

Les résultats obtenus, indiquent que les effets quadratiques  $X_1^2$  (temps-temps),  $X_2^2$  (polarité-polarité) et  $X_3^2$  (ratio-ratio) sont non significatifs sur la teneur en flavonoïdes extraite des feuilles de *R. alaternus* avec une probabilité de  $P > 0,05$ .

**IV-1-2-3- Modèle mathématique**

D'après les résultats obtenus précédemment, le meilleur modèle mathématique postulé pour l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de *R. alaternus*, est un modèle de second degré qui permet d'écrire la réponse sous la forme suivante :

$$Y = 32,84698 - 1,839779 X_1 - 107,441 X_3 + 0,0064412 X_1X_2 + 3,3645409 X_1X_3 + 0,5970835 X_2X_3$$

Ce modèle a été volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse précédente. Cela permet de calculer plus facilement la teneur en flavonoïdes en utilisant cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (Tinsson, 2010). A partir de ce modèle, le calcul de la réponse est possible, il suffit d'attribuer les valeurs de  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  pour obtenir la teneur en flavonoïdes.

**IV-1-2-4- Solution**

Afin de vérifier les possibilités prédictives du modèle, une vérification expérimentale des conditions optimales et des comparaisons entre les résultats prévus et les valeurs pratiques ont été établies en utilisant le logiciel JMP7. Les conditions optimales de cette étude sont représentées dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Les conditions optimales et la valeur prédite pour l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus* selon le modèle de Box-Behnken.

<b>Variables</b>	<b>Valeurs critiques</b>
X1 : Temps [6-18] heures	18,041559
X2 : Polarité [40-100] %	79,539769
X3 : Ratio [1/5-1/15] p/v	0,1321842
Valeur prédite des flavonoïdes (mg EQ/g de MS)	3,0845962



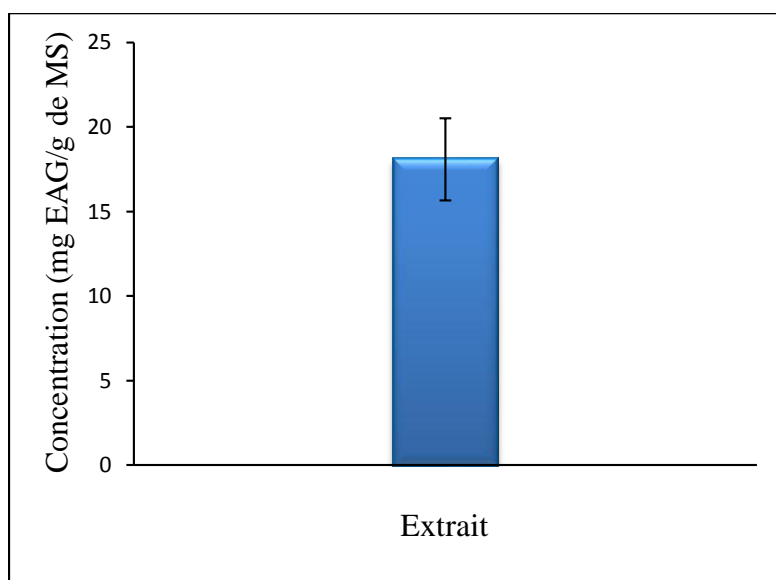
Il est assez clair d'après les résultats obtenus, que le temps d'extraction a un rôle critique dans l'extraction des flavonoïdes, suivi respectivement par le ratio et la polarité. Généralement, on constate que le temps qui s'étend de 18-24h a une efficacité importante sur l'extraction des composés phénoliques (**Ghafoor et al., 2009**). En plus, le ratio et la polarité du solvant d'extraction sont des variables importantes dans l'optimisation d'extraction, afin de réduire au minimum le coût énergétique du processus.

Les conditions optimales d'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus* obtenues par le présent modèle étaient comme suit : une polarité de l'acétone de 79,54% (v/v), un ratio (solide/liquide) de 1/7,57 (0,132 g/ml), et un temps d'extraction de 18,04 heures. Dans ces conditions, le modèle a prévu une réponse maximale de 3,085 mg EQ/g de MS.

## **IV-2- Dosage des antioxydants**

### **IV-2-1- Polyphénols totaux**

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées, grâce à leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Le dosage de ces composés a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (**Cai et al., 2004**). Dans cette étude, la coloration bleue de la solution, reflète la présence du complexe phosphotungstique-phosphomolybdique produit lors de l'interaction entre les composés phénoliques de l'extrait et le réactif de Foline-Ciocalteu (**Hatami et al., 2014**). La quantification du taux des polyphénols totaux présents dans l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* est estimé à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe VIII**) (**Figure 3**), établie à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique, exprimée en mg EAG/g de MS, tout en appliquant la formule suivante :  $y = 0,059x - 0,0059$  sachant que  $R^2 = 0,9852$ . Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 09.



**Figure 09 :** Teneur en polyphénols totaux des feuilles de *R. alaternus*.

La teneur en polyphénols totaux est de l'ordre de  $18,076 \pm 2,43$  mg EAG/g de MS. Ce résultat est proche de celui rapporté par **Moussi et al. (2015)**, ( $17,13 \pm 0,09$  mg EAG/g de MS) dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus*. En effet, la quantité des polyphénols totaux peut varier selon un certain nombre de facteurs : L'origine géographique, la période de la récolte, l'organe végétal utilisé, le degré de maturation de la plante, les conditions climatiques (température, le type de sols et la lumière) (**Falleh et al., 2008**), ainsi que, la méthode d'extraction et la nature du solvant utilisé (**Hayouni et al., 2007 ; Sultana et al., 2007**).

Toutefois, les résultats du dosage des composés phénoliques n'indiquent pas les valeurs exactes des teneurs en polyphénols, puisque malgré sa grande sensibilité, la méthode de Folin-Ciocalteu peut présenter des problèmes d'interférence. En effet, ce réactif peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane) et les sucres réducteurs comme le glucose (**Boizot et Charpentier, 2006**).

#### **IV-2-2- Teneur en flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium. L'addition de ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 430 nm (**Alilou et al., 2014**). L'intensité de la coloration varie en fonction de la concentration des flavonoïdes de l'extrait. L'aluminium

perd deux électrons pour s'unir à deux oxygènes des flavonoïdes (Ribéreau-Gayon, 1968).

La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg EQ/g de MS, en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe VIII) (Figure 2), réalisée dans les mêmes conditions et qui suit une équation de type :  $y = 0,015x - 0,018$  avec un  $R^2 = 0,984$ . Les résultats sont représentés sur l'histogramme de la figure 10.

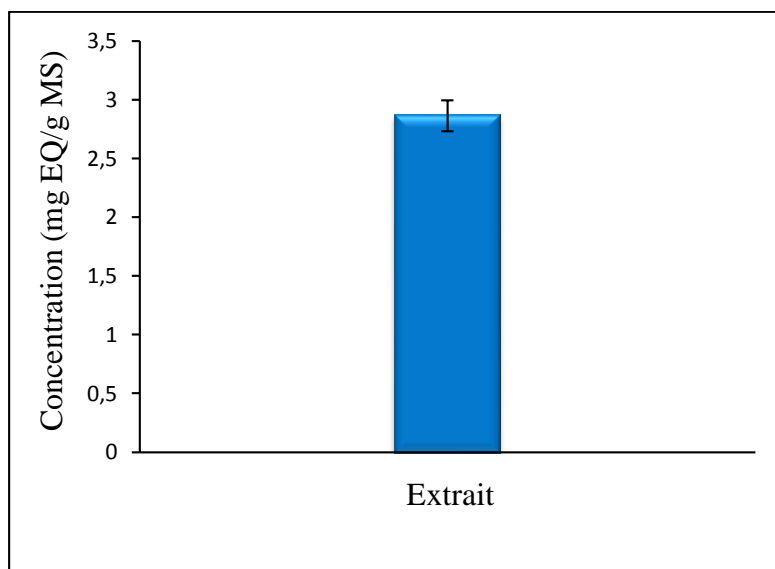


Figure 10 : Teneur en flavonoïdes totaux des feuilles de *R. alaternus*.

D'après le résultat, on constate que l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* présente une teneur en flavonoïdes de l'ordre de  $2,863 \pm 0,133$  mg EQ/g de MS. Cette teneur est très proche de celle de l'intervalle de prévision du plan d'expérience de Box-Behnken estimé à 3,08 mg EQ/g de MS. Ce résultat obtenu est nettement supérieur à celui rapporté par Ben Ammar et al. (2007), ( $0,283 \pm 0,0094$  mg EQ/g de MS) dans l'extrait méthanolique des feuilles de la même espèce de Tunisie, mais légèrement inférieur à celui trouvé par Moussi et al. (2015), ( $6,63 \pm 0,63$  mg EQ/g de MS) dans l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus*.

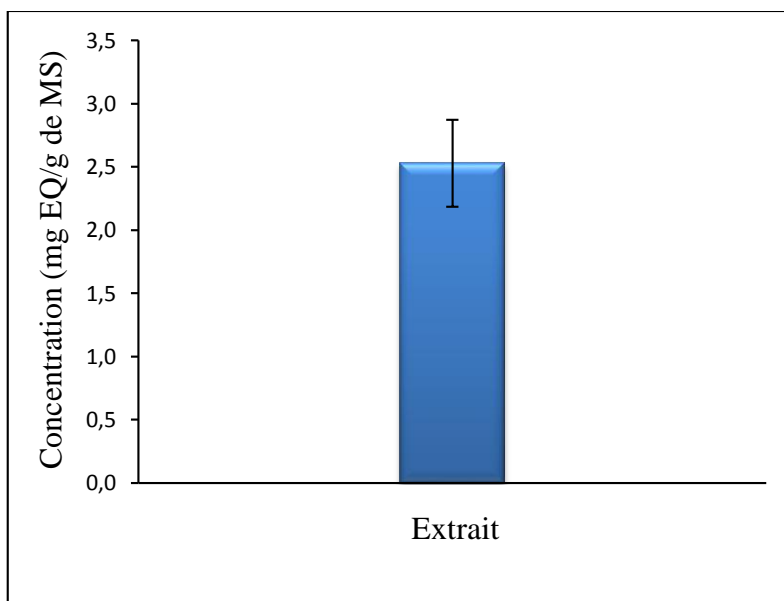
D'après la littérature, la quantité des flavonoïdes des extraits varie d'une plante à l'autre, cela est due probablement à leur décomposition par la haute température (Gheffour et al., 2015), mais dans notre cas, l'échantillon a été extrait à une température ambiante. D'autres raisons peuvent être signalées, comme la solubilité des flavonoïdes dans les solvants d'extraction, leur distribution durant le développement de la plante, ainsi

qu'aux conditions de conservation ou d'environnement (température élevée, exposition solaire, sécheresse...etc.) (Falleh et al., 2008 ; Lapornik, 2005).

**IV-2-3- Teneur en flavones et flavonols**

La quantification des flavones et flavonols a été effectuée par une méthode basée sur le même principe que celle des flavonoïdes.

Les résultats du dosage des flavones et flavonols obtenus, sont exprimés en mg EQ/g de MS, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (Annexe VIII) (Figure 4), en utilisant différentes concentrations de quercétine ( $y= 0,0336x - 0,0674$  avec un  $R^2= 0,9753$ ). Le résultat est représenté sur la figure 11.



**Figure 11 :** Teneur en flavones et flavonols des feuilles de *R. alaternus*.

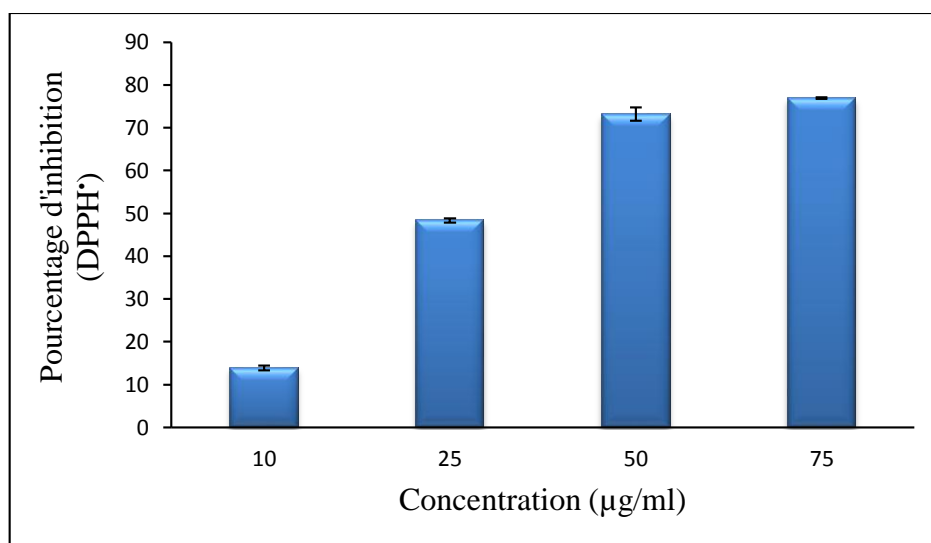
D'après le résultat de la présente étude, la teneur en flavones et flavonols de l'extrait étudié est de l'ordre de  $2,53 \pm 0,34$  mg EQ/g de MS, ce qui représente 95% de la totalité des flavonoïdes cité précédemment. Aucun résultat du dosage des flavones et flavonols n'a été rapporté par d'autres auteurs sur la même plante pour pouvoir comparer nos résultats.

### IV-3- Pouvoir anti-radicalaire

#### IV-3-1- Pouvoir anti-radicalaire DPPH'

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité anti-radicalaire dont la méthode utilisant le radical DPPH'. C'est une méthode simple, rapide et largement utilisée (Ben Ammar *et al.*, 2009).

L'activité de l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* et de la quercétine utilisée comme standard vis-à-vis du radical DPPH' a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre, en suivant sa réduction qui s'accompagne par la transition de la couleur violette (DPPH') en couleur jaune (DPPH-H) qui est mesurable à 517 nm (Chew *et al.*, 2009). Les pourcentages d'inhibitions de l'extrait sont représentés dans la figure 12.



**Figure 12 :** Histogramme représente l'activité scavenging du radical DPPH' d'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus*.

Selon les résultats de la présente étude, on constate que le pourcentage de réduction augmente en fonction de la concentration d'extrait, où la concentration la plus élevée (75 µg/ml) a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de  $76,91 \pm 0,18\%$ . Par contre, la quercétine a montré un pourcentage d'inhibition de  $73,05 \pm 1,17\%$  à une concentration de 10 µg/ml (Annexe IX) (Figure 1).

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) a été calculée pour l'extrait et le standard. Plus la valeur d'IC50 est faible plus la capacité réductrice est forte (Falleh *et al.*, 2008). Selon les résultats trouvés, l'extrait acétonique est doté d'un pouvoir antioxydant puissant,

avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $25,92 \pm 0,11$  µg/ml. Tandis que, celui de la quercétine est de  $6,96 \pm 0,18$  µg/ml, ce qui représente une capacité inhibitrice très puissante. On remarque que l'IC<sub>50</sub> de l'extrait acétonique trouvé dans cette étude est compris entre ceux rapporté par **Ben Ammar et al. (2008)**, (IC<sub>50</sub>= 18,84 µg/ml de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de Tunisie) et **Moussi et al. (2015)**, (IC<sub>50</sub>=  $66,83 \pm 3,88$  µg/ml de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. alaternus* de la région d'Adekar de la wilaya de Bejaia).

La présence des composés phénoliques (flavonoïdes, polyphénols totaux...etc.) est probablement responsable de l'activité antioxydante de l'extrait, car il a été démontré que les molécules antioxydantes réduisent et décolorent le DPPH<sup>•</sup> en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Gheffour et al., 2015**). Cette réduction est proportionnelle à la quantité d'antioxydant présent dans le mélange réactionnel (**Ben Ammar et al., 2008**).

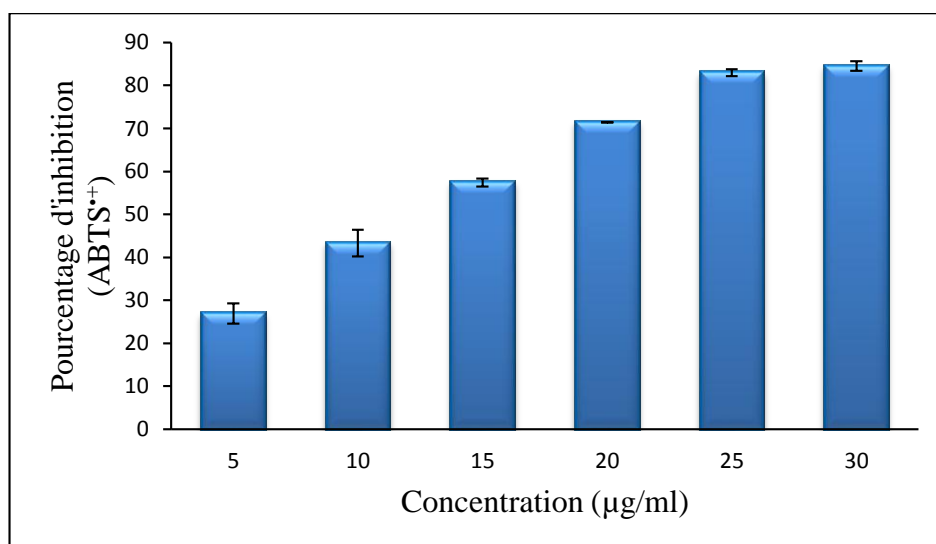
Une bonne corrélation est retrouvée entre le pourcentage d'inhibition de DPPH<sup>•</sup> et le pourcentage de réduction du phosphomolybdate ( $r = 1$ ) (**Annexe XIII**).

#### **IV-4-2- Pouvoir anti-radicalaire ABTS<sup>•+</sup>**

L'ABTS est une substance qui ne possède pas des radicaux libres au départ. Après son interaction avec le persulfate de potassium, des radicaux libres se forment par arrachement d'un électron à un atome d'azote d'ABTS<sup>•</sup>, suivi par l'apparition d'une couleur bleue intense (**Re et al., 1999**). Lors du contact entre le radical ABTS<sup>•+</sup> et les antioxydants de l'extrait (donneurs d'électrons), l'atome d'azote concernée piège un H<sup>+</sup>, conduisant à l'ABTS<sup>+</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution. Cette décoloration est suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm. La diminution d'absorbance de la solution d'ABTS est caractéristique de la diminution du nombre de radicaux libres (**Erel, 2004**).

Les pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de différentes concentrations de l'extrait acétonique sont représentés dans la figure 13.

Les résultats (**Figure 13**), révèlent que l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* présente une importante activité inhibitrice vis-à-vis le radicale ABTS<sup>•+</sup> de  $84,48 \pm 1,12\%$  pour une concentration maximale de 30 µg/ml. Alors que l'acide ascorbique utilisé comme standard montre un pourcentage d'inhibition de  $77,87 \pm 4,78\%$  à une concentration de 8 µg/ml.



**Figure 13 :** Histogramme représente l'activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> d'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus*.

Une étude menée par **Bhourri et al. (2011)**, montre que les feuilles de *R. alaternus* sont très riches en composés phénoliques, tel que le kaempferol 3-O-β-isorhamninoside (K3O-ir) et le rhamnocitrin 3-O-β-isorhamninoside (R3O-ir), qui sont capables de réduire le radical ABTS<sup>•+</sup>. En effet, leurs pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 97% et 72% respectivement à une concentration de 0,2 mg/ml. Ces résultats sont hautement supérieurs à ceux obtenus dans notre étude. De plus, l'efficacité de l'extrait est aussi révélée par la valeur de l'IC<sub>50</sub> qui est de l'ordre de 11,74 ± 0,11 µg/ml, équivalant à 3,83 ± 0,03 µg/ml d'acide ascorbique. Elle est largement inférieure à celles trouvées par **Bhourri et al. (2011)**, qui sont approximativement de 0,12 mg/ml pour K3O-ir et 0,15 mg/ml pour R3O-ir.

**Siddhuraju et Becker. (2007)**, ont rapporté que les composés phénoliques de poids moléculaire élevé (tannins), ont plus de capacité à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> et que l'efficacité dépend du poids moléculaire, du nombre d'anneaux aromatiques et de la nature de substitution de groupement hydroxyle, plutôt que les groupes fonctionnels spécifiques.

Les pouvoirs inhibiteurs obtenus avec le radical DPPH<sup>•</sup>, étaient généralement plus faibles que ceux mesurés avec le radical ABTS<sup>•+</sup>. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus*, est riche en substances qui présentent des bandes d'absorption à la même longueur d'onde que le radical DPPH<sup>•</sup> ; ce qui engendre une augmentation de la densité optique et une diminution du pouvoir inhibiteur (**Sarr et al., 2015**).

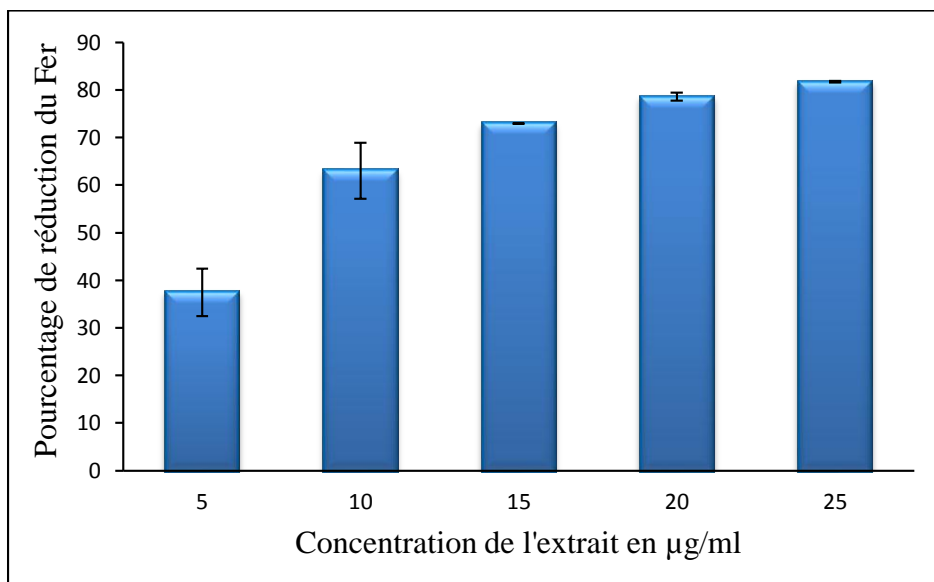
Les résultats statistiques indiquent la présence d'une bonne corrélation linéaire entre le pouvoir anti-radicalaire ABTS<sup>•+</sup> et les teneurs en polyphénols totaux, en flavones et flavonols, ainsi que le pourcentage de réduction du FeCl<sub>3</sub> avec des coefficients de corrélation de l'ordre de 0,998, 0,809 et 1 respectivement (**Annexe XIV**).

**IV-3- Pouvoir réducteur**

**IV-3-1- Réduction du chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)**

Le pouvoir réducteur de l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* a été évalué en utilisant la méthode de FRAP, cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible, qui est basée sur la capacité de l'extrait à réduire le Fe<sup>+3</sup> en Fe<sup>+2</sup>, en déterminant ainsi la capacité de ce composé à donner des électrons qui peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante (**Ghaisas et al., 2008**).

Dans ce travail la quercitine a été utilisée comme antioxydant de référence en parallèle avec l'extrait (**Annexe X**) (**Figure 1**). Les valeurs présentées dans la figure 14, montrent le pouvoir réducteur de l'extrait à différentes concentrations.



**Figure 14 :** Pouvoir réducteur (FeCl<sub>3</sub>) des feuilles de *R. alaternus*.

D'après les résultats illustrés dans l'histogramme ci-dessus, on constate que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. L'extrait présente un pourcentage d'activité réductrice vis-à-vis le FeCl<sub>3</sub> de 81,68% ± 0,17% pour une concentration maximale de 25 µg/ml. Alors que celle de standard (quercitine) qui



est de l'ordre de  $76,57\% \pm 1,29\%$  pour une concentration maximale de  $10 \mu\text{g/ml}$ . Le pouvoir réducteur de la quercitine à 50% est de l'ordre de  $2,54 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ , et celui de l'extrait est de l'ordre de  $7,15 \pm 1,07 \mu\text{g/ml}$ , ce qui confirme que l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* présente une très forte activité réductrice du fer.

Le pouvoir réducteur des feuilles de *R. alaternus* est probablement dû à la présence des groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007).

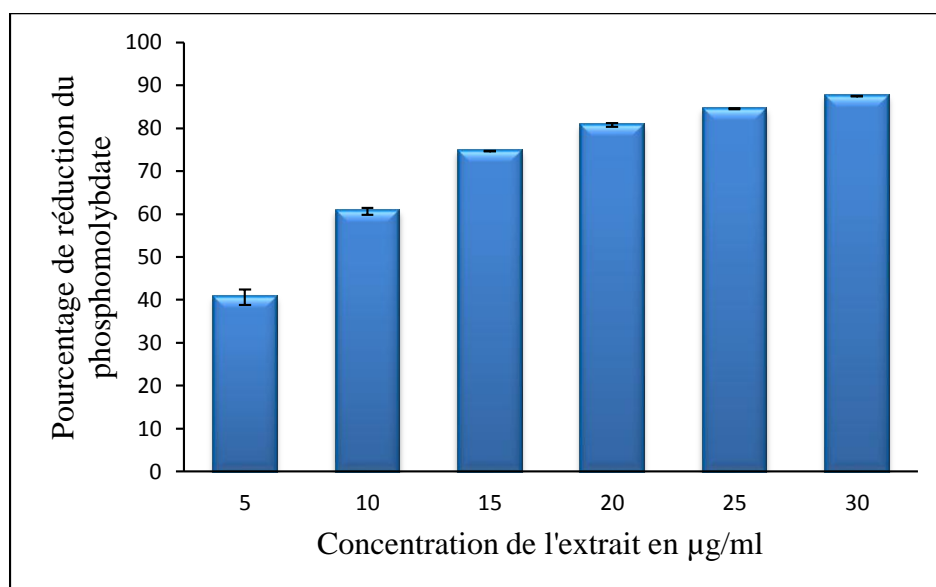
Les résultats obtenus, montrent l'existence d'une bonne corrélation entre le pourcentage de réduction de  $\text{FeCl}_3$  et les polyphénols, flavones et flavonols avec des coefficients de corrélation ( $r$ ) de l'ordre de 0,998 et 0,809 respectivement. Il présente ainsi une parfaite corrélation avec l'ABTS<sup>•+</sup> ( $r = 1$ ) (Annexe XI).

#### **IV-3-2- Réduction du phosphomolybdate**

Ce test est un essai direct, qu'on emploie principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Cette analyse est basée sur la réduction de  $\text{Mo}^{6+}$  en  $\text{Mo}^{5+}$  en présence d'extrait, suivi par la formation d'un complexe phosphate/ $\text{Mo}^{5+}$  en donnant une coloration verte détectable à une longueur d'onde de 695 nm (Bougatef et al., 2009).

Les résultats de la capacité antioxydante de l'extrait acétonique des feuilles de *R. alaternus* sont représentés dans la figure 15. L'acide gallique a été utilisé comme standard de référence (Annexe X) (Figure 2).

Les résultats illustrés dans la figure 15, montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait est dose-dépendant, c'est-à-dire que la capacité de réduction du phosphomolybdate est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'échantillon. Il présente une importante activité réductrice de molybdate de l'ordre de  $87,46 \pm 0,06\%$  pour une concentration maximale de  $30 \mu\text{g/ml}$ , comparativement à celle de standard qui est de l'ordre de  $52,03 \pm 0,52$  pour une concentration maximale de  $9 \mu\text{g/ml}$  (Annexe X) (Figure 2). La concentration inhibitrice de l'extrait à 50%, est de l'ordre de  $7 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ , ce dernier est significativement proche de celle de l'acide gallique qui est de  $8,838 \pm 0,132 \mu\text{g/ml}$ . D'après ces résultats, nous remarquons que le pouvoir réducteur de l'extrait est très efficace pour la réduction du phosphomolybdate.



**Figure 15 :** Pouvoir réducteur du phosphomolybdate des feuilles de *R. alaternus*.

L'étude statistique, montre l'existence d'une corrélation significative entre le pourcentage de réduction du phosphomolybdate et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH' avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 1 (**Annexe XII**).

# *Conclusion*

---

## **Conclusion**

La méthodologie des surfaces de réponse, a été utilisée avec succès pour optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus*. Le coefficient de corrélation et les p-value ont indiqué que le temps et le ratio ( $p < 0,05$ ) sont les facteurs les plus significatifs affectant l'extraction des flavonoïdes, suivis par la polarité d'extraction.

Les conditions expérimentales optimales qui maximisent l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *R. alaternus* sont : le solvant acétonique à une polarité de 79,54 % (v/v) avec un rapport solide/liquide de 0,13 g/ml pendant un temps d'extraction de 18,04h. Dans ces conditions, le taux des flavonoïdes d'extrait optimisé est de l'ordre de  $2,86 \pm 0,13$  mg EQ/g de MS, qui est en accord avec la valeur prévue par le modèle (3,08 mg EQ/g de MS).

Les analyses qualitatives effectuées par spectrophotomètre, ont montré que l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus*, est relativement riche en polyphénols totaux avec une teneur de  $18,08 \pm 2,43$  mg EAG/g de MS. De même le dosage des flavonoïdes a révélé la richesse de cette plante en ces composés, essentiellement en flavones et flavonols qui est de l'ordre de  $2,53 \pm 0,34$  mg EQ/g de MS.

L'activité anti-radicalaires, vis-à-vis le DPPH et l'ABTS, montre des  $IC_{50}$  de  $25,92 \pm 0,11$  et  $11,74 \pm 0,11$   $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Cependant, le pouvoir réducteur déterminé par la méthode de FRAP et du phosphomolybdate révèle des  $IC_{50}$  de l'ordre de  $7,16 \pm 1,07$  et  $7 \pm 0,12$   $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Ces résultats montrent que l'extrait possède une très bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des puissants agents antioxydants.

Au terme de ce travail, il serait intéressant de compléter cette étude, en testant et en optimisant d'autres paramètres influençant sur l'extraction des flavonoïdes tels que la température, la granulométrie, le pH,...etc., élargir l'application du model de Box-Behnken sur d'autres parties de cette plante.

De plus, notre pays possède une biodiversité immense, dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées en optimisant leur extraction.

# *Références bibliographiques*

---

**Références bibliographiques**

**-A-**

- **Abou-chaar, C.I. et Shamlan, S.N.** (1980). A chromatographic study of the anthraquinones of *Rhamnus alaternus* LI Extraction, isolation and identification of the aglycones. *Quarterly Journal of crude drug research*, 18 (1): 49-55.
- **Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M.** (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21 (2): 143-152.
- **Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F.** (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (19): 7592-7599.
- **Alilou, H., Bencharki, B., Hassani, L.I., Barka, N.** (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraveolenssubsp. odoros*. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10 (3): 316-328.
- **Aslan, N. et Cebeci, Y.** (2007). Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 86 (1): 90-97.
- **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S.** (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, 11 (1): 69-81.

**-B-**

- **Baş, D. et Boyacı, İ.H.** (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78 (3): 836-845.
- **Bas, J.M., Oliveras, J., Gómez C.** (2009). Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35 (3): 380-384.
- **Ben Ammar, R., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L.** (2008). Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus L.* *Chemico-Biological Interactions*, 174 (1): 1-10.
- **Ben Ammar, R., Bhourri, W., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Naffeti, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K.** (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116 (1): 258-264.
- **Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K.** (2007).

Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57 (3): 453-460.

- **Ben Ammar, R., Neffati, A., Skandrani, I., Sghaier, M.B., Bhouri, W., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L.** (2011). Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). *Natural product research*, 25 (11): 1047-1058.

- **Ben Ammar, R., Kilani, S., Abdelwahed, A., Haydar, N., Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K.** (2005). In vitro Mutagenicity, Antimutagenicity and Free Radical Scavenging Activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (3): 439-445.

- **Benchiha, W., Mahroug, S., Aoued, L., Bouterfas, K.** (2015). Antihepatotoxic activity of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) leaves extracts. *Phytothérapie*, 15 (1): 1-6.

- **Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A.** (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5): 965-977.

- **Bhouri, W., Boubaker, J., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L.** (2012). Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 80: 57-62.

- **Bhouri, W., Sghaier, M.B., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Ghedira, L.C.** (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- $\beta$ -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- $\beta$ -isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (5): 1167-1173.

- **Boizot, N. et Charpentier, J.P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*. 79-82.

- **Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M.** (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114 (4): 1198-1205.

- **Boussahel, S., Speciale, A., Dahamna, S., Amar, Y., Bonaccorsi, I., Cacciola, F., Cimino, F., Donato, P., Ferlazzo, G., Harzallah, D., Cristani, M.** (2015). Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacognosy magazine*, 11 (1): 102-109.

-C-

- **Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H.** (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74 (17): 2157-2184.

- **Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Mustapha, W.A.W., Ho, C.W.** (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16 (2): 203-213.
- **Cheok, C.Y., Chin, N.L., Yusof, Y.A., Talib, R.A., Law, C.L.** (2012). Optimization of total phenolic content extracted from *Garcinia mangostana* Linn. hull using response surface methodology versus artificial neural network. *Industrial Crops and Products*, 40: 247-253.
- **Chew, Y.L., Goh, J.K., Lim, Y.Y.** (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, 116 (1): 13-18.
- **Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y.** (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55 (2): 217-225.
- **Chouitah, O., Meddah, B., Aoues, A.** (2012). Analysis of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Rhamnus alaternus*. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2 (5): 302-306.
- **Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24: 1250-1319.

**-D-**

- **Debeaux, J.O.** (1894). Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Ed. P. Klincksieck, Paris : 81-82.
- **Dudley, H.W., Martin, J.S., Peter, R.H., Shirley, K.R.** (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *Journal of Natural Products*, 52 (6): 1189-1208.

**-E-**

- **EL Aou-Ouad, H., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Flexas J., Medrano H., Gulías, J.** (2015). Trade-offs between seedling growth, plant respiration and water-use efficiency in two Mediterranean shrubs *Rhamnus alaternus* and *Rhamnus ludovicisalvatoris*. *PHOTOSYNTHETICA*, 53 (4): 537-546.
- **Erel, O.** (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37 (4): 277-285.

**-F-**

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (5): 372-379.



- **Faucher, J.** (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de doctorat, *Institut National Polytechnique de Toulouse*. 23-25 et 40.
- **Ferreira, S.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandao, G.C., da Silva E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., Dos Santos, W.N.L.** (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597 (2): 179-186.

-G-

- **Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H.** (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11): 4988-4994.
- **Ghaisas, M.M., Navghare, V.V., Takawale, A.R., Zope, V.S., Deshpande, A.D.** (2008). In-vitro antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. *Pharmacologyonline*, 3: 296-305.
- **Gheffour, K., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z.** (2015). Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13: 288-294.
- **Goupy, J.** (2006). Plans d'expériences. Ed. Techniques Ingénieur, Paris. 74-116.
- **Goupy, J. et Creighton, L.** (2006). Introduction aux plans d'expériences. 3<sup>ème</sup> édition. Ed. Dunod, Paris. 3-14.
- **Gubb, A.S.** (1913). La flore algérienne, naturelle et acquise. Ed. A. Jourdan, Alger. 16.

-H-

- **Hatami, T., Emami, S.A., Miraghaee, S.S., Mojarreb, M.** (2014). Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (2): 551-558.
- **Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M.** (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105 (3): 1126-1134.
- **Heinonen, M.I., Meyer, A.S., Frankel, E.N.** (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *J. Agric. Food Chemistry*, 46: 4107-4112.
- **Hismath, I., Wan Aida, W.M., Ho, C.W.** (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18 (3): 931-939.
- **Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

**-I-**

- **Izhaki, I., Tsahar, E., Paluy, I., Friedman, J.** (2002). Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156 (2): 217-223.

**-K-**

- **Kathleen, M.C., Natalia, Y.K., Jeff, R.** (2004). Response Surface Methodology. *CASOS Technical Report*, 4: 1-25.

- **Kelly, E.H., Anthony, R.T., Dennis, J.B.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.

- **Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Vladimir-Knezevic, S.** (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *ACTA PHARMACEUTICA-ZAGREB-*, 54 (1): 65-72.

**-L-**

- **Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G.** (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71 (2): 214-222.

- **Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J.** (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103: 1003-1008.

- **Liu, Q.M., Yang, X.M., Zhang, L., Majetich, G.** (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (23): 2503-2511.

- **Liyana-Pathirana, C. et Shahidi, F.** (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*, 93 (1): 47-56.

- **Longo, L., Vasapollo, G., Rescio, L.** (2005). Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (5): 1723-1727.

**-M-**

- **Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N.** (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9): 35.

- **Mashhadian, N.V, et Rakhshandeh, H.** (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Rhamnus alaternus* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak J Med Sci*, 21: 47-52.

- **Mathieu, A.** (1860). Flore forestière; description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. Suivies d'une méthode analytique pour en déterminer les principales espèces. Ed. Ancienne maison Grimblot et cie, N. Grosjean, successeur, Nancy. 52-53.

- **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.** (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological reviews*, 52 (4): 673-751.
- **Miralles, J., Martínez-Sánchez, J.J., Franco, J.A., Bañón, S.** (2011). *Rhamnus alaternus* growth under four simulated shade environments: Morphological, anatomical and physiological responses. *Scientia Horticulturae*, 127 (4): 562-570.
- **Molyneux, P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.
- **Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L.B., Dahmoune, F., Madani, K., Chibane, M.** (2015). HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial Crops and Products*, 74: 858-866.
- **Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V.** (2011). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods*, 4 (1): 100-107.
- **Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S.** (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine*, 2 (1): 43.

-N-

- **Naczki, M. et Shahidi, F.** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41 (5): 1523-1542.

-O-

- **Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A.** (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, 97 (3): 452-458.
- **Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L.** (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (10): 4619-4626.

-P-

- **Pierre, D.** (2008). Le plan d'expérience évolué. *Revue Modulad*, 38 : 13-36.
- **Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10): 4290-4302.

-Q-

- **Quezel, P.S. et Santa, S.** (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris. 617-620.

-R-

- **Ragonese, R., Macka, M., Hughes, J., Petocz, P.** (2002). The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 27 (6): 995-1007.
- **Ramalakhmi, K., Kubra, I.R., Rao, L.J.M.** (2008). Antioxidant potential of low-rade coffee beans. *Food Research International*, 41(1): 96-103.
- **Rameau, J. C., Mansion, D., Dumé, G., Gauberville, C., Bardat, J., Bruno, E., Keller, R.** (2008). Flore Forestière Française, guide écologique illustré, 3 région méditerranéenne. Ed. Ministère de l'agriculture et de la pêche, Paris (France): 2426.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26 (9): 1231-1237.
- **Ribéreau-Gayon P.** (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris. 254.
- **Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C., Bowman, D., Chase, M.W.** (2000). A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA squences. *American journal of botany*, 87 (9): 1309-1324.

-S-

- **Saraphirom, P. et Reungsang, A.** (2010). Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International journal of hydrogen Energy*, 35: 13435-13444.
- **Sarr, S.O., Fall, A.D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., Ndiaye, B., Diop, Y.M.** (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9 (3): 1263-1269.
- **Siddhuraju, P. et Becker, K.** (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101 (1): 10-19.
- **Silou, T., Malanda, M., Loubaki, L.** (2004). Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2<sup>3</sup>. *Journal of food engineering*, 65 (2): 219-223.
- **Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y.** (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55 (3): 381-387.
- **Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., Moulin, A.** (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86 (12): 919-925.

- **Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R.** (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104 (3): 1106-1114.

-T-

- **Tinsson, W.** (2010). Plan d'expérience : In Plans d'expérience : constructions et analyses statistiques. *Springer Science & Business Media*, Berlin Heidelberg. 67: 3-37.

-U-

- **Uma, D.B., Ho, C.W., Wan Aida, W.M.** (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39 (1): 119-128.

-V-

- **Varone, L. et Gratani, L.** (2009). Leaf expansion in *Rhamnus alaternus* L. by leaf morphological, anatomical and physiological analysis. *Trees*, 23: 1255-1262.

-W-

- **Wang, L., Yang, B., Du X., Yi, C.** (2008). Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry*, 108: 737-741.

- **Wei, B.L., Lin, C.N., Won, S.J.** (1992). Nakahalene and cytotoxic principles of formosan *Rhamnus* species. *Journal of natural products*, 55 (7): 967-969.

- **Wong, K.Y., Vikram, P., Chiruvella, K.K., Mohammed, A.** (2015). Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria sps* (Rubiaceae). *Journal of King Saud University-Science*, 27 (4): 302-311.

-Y-

- **Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei, R.J.** (2009). Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box-Behnken experimental design. *Journal of Hazardous Materials*, 171 (1): 551-562.

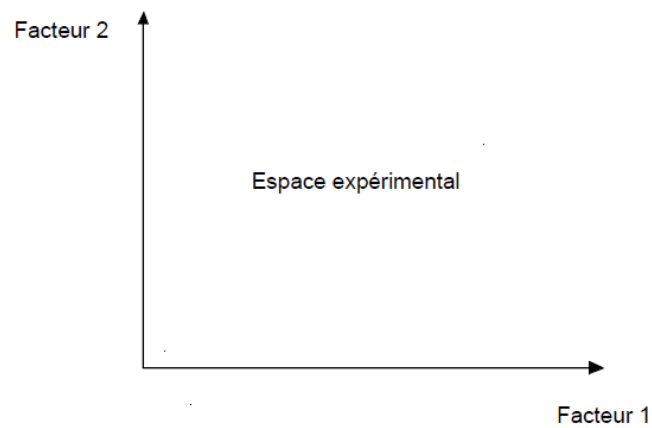
-Z-

- **Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z.H., Yang, H.Z.** (2007). Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57 (1): 17-24.

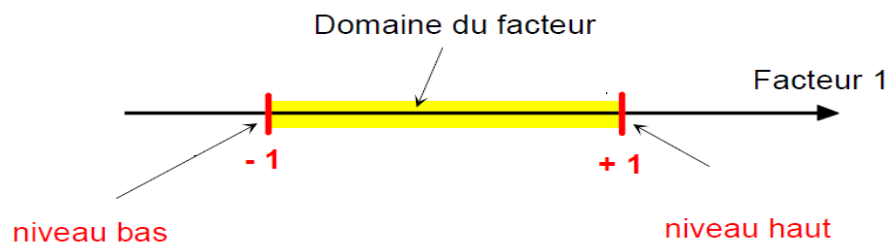
# *Annexes*

---

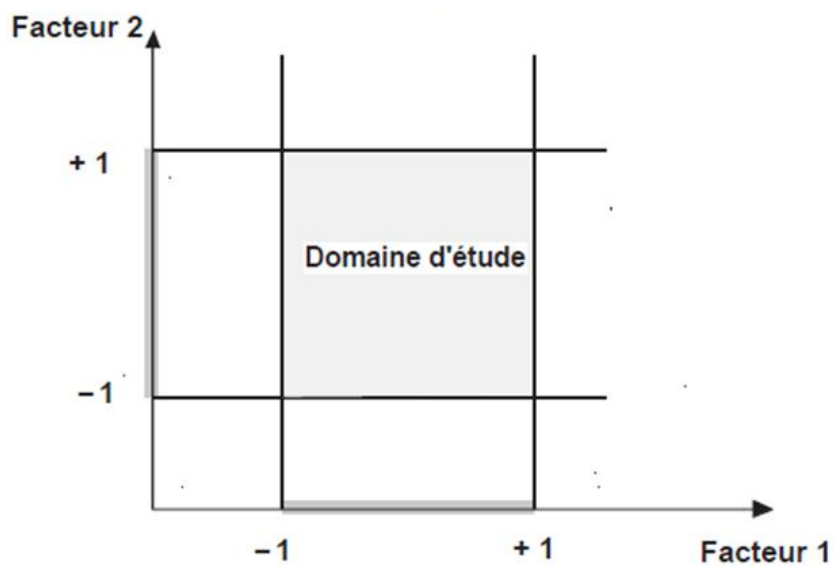
**Annexe I :** L'espace expérimental (Goupy, 2006).



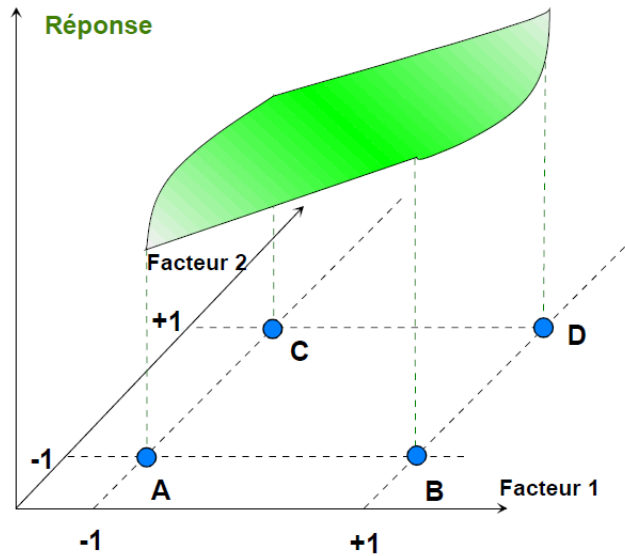
**Annexe II :** Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut (Goupy, 2006).



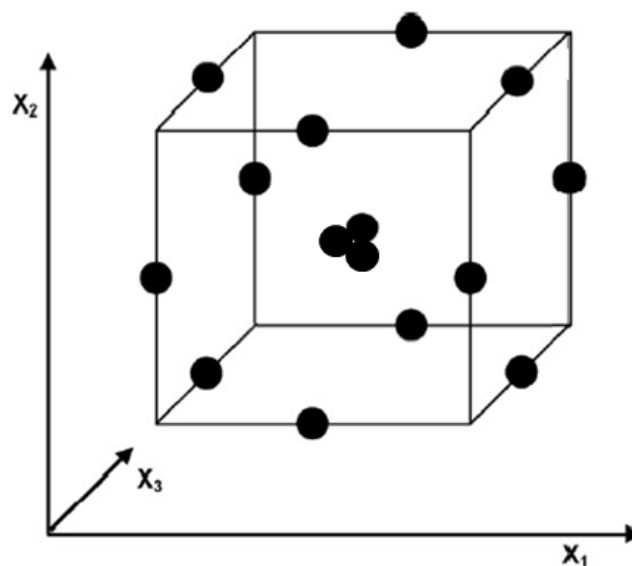
**Annexe III :** Le domaine d'étude (Goupy, 2006).



**Annexe IV :** L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forment la surface de réponse (**Goupy, 2006**).

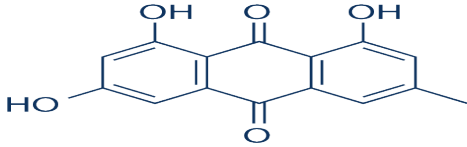
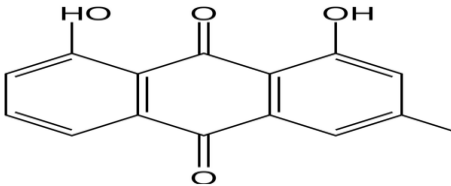
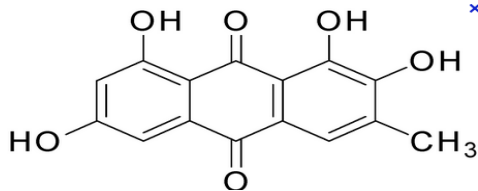
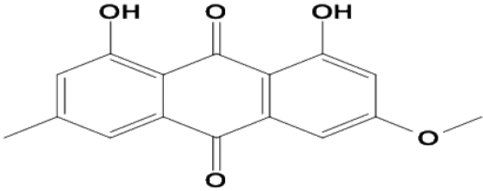
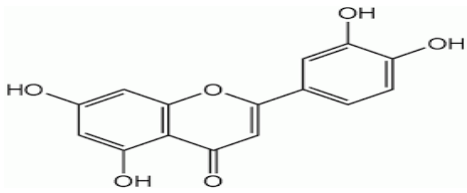
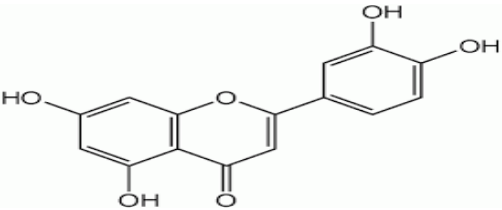


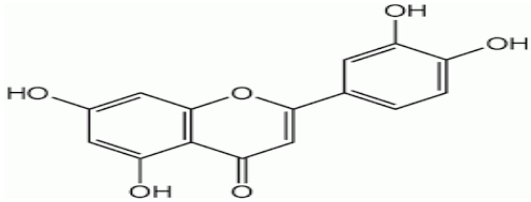
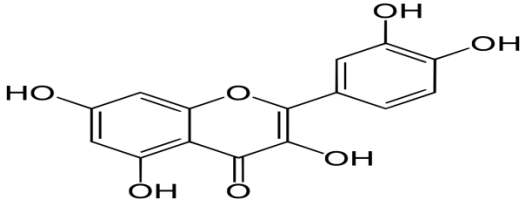
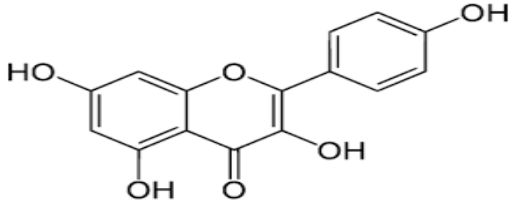
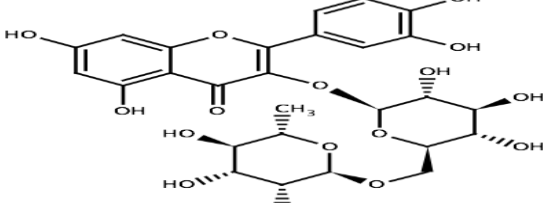
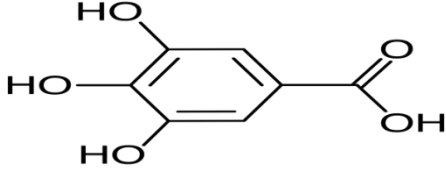
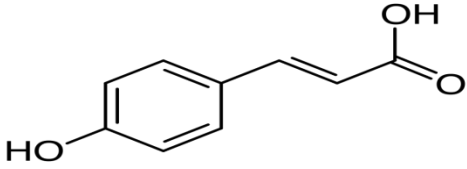
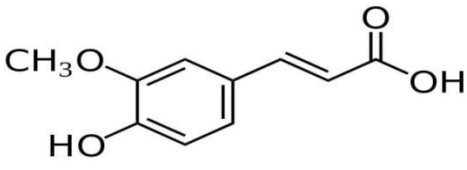
**Annexe V :** Illustration du plan de Box-Behnken pour trois facteurs (**Ferreira et al ; 2007**).



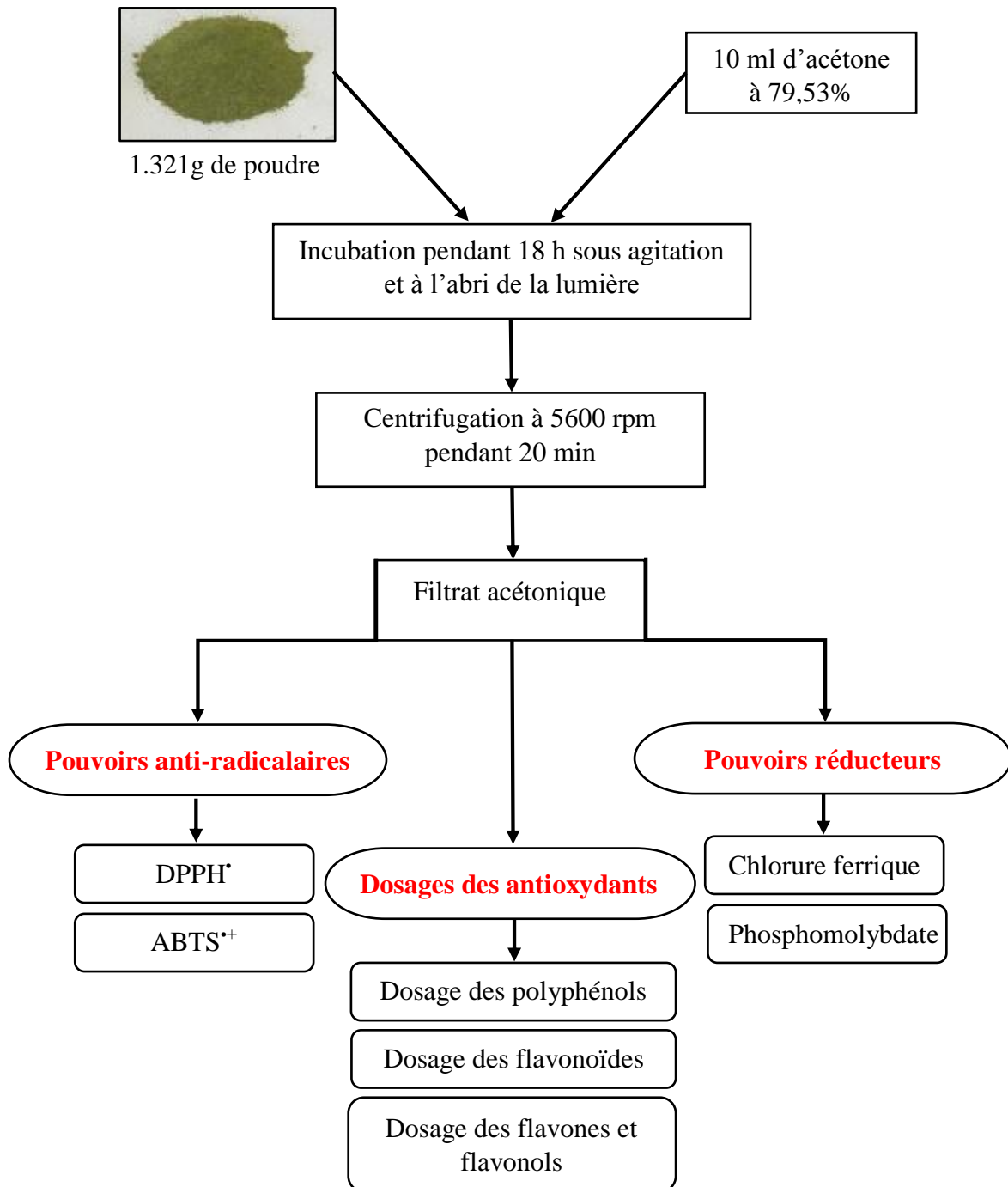


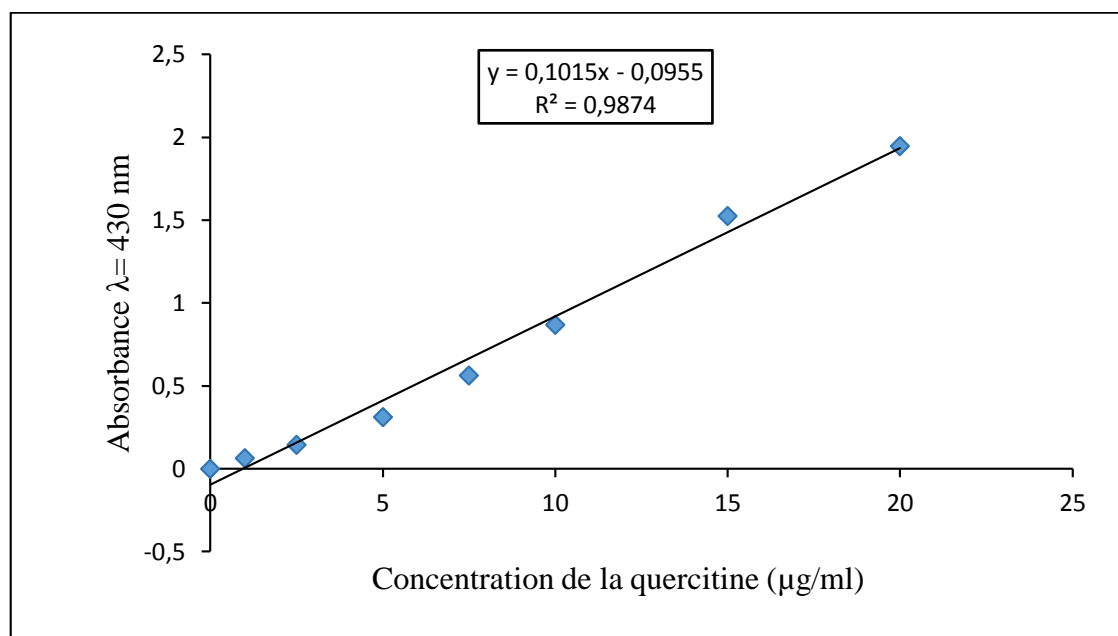
**Annexe VI:** Composition phytochimique de *R. alaternus* (Kelly et al., 2002 ; Mahmoudi et al., 2012 ; Middleton et al., 2000 ; Wei et al., 1994).

Classe	Composé	Structure
<b>Anthraquinones</b>	Emodin	
	Chrysophanol	
	Alaternin	
	Physcion	
<b>Flavones</b>	Luteolin	
	Apigenin	

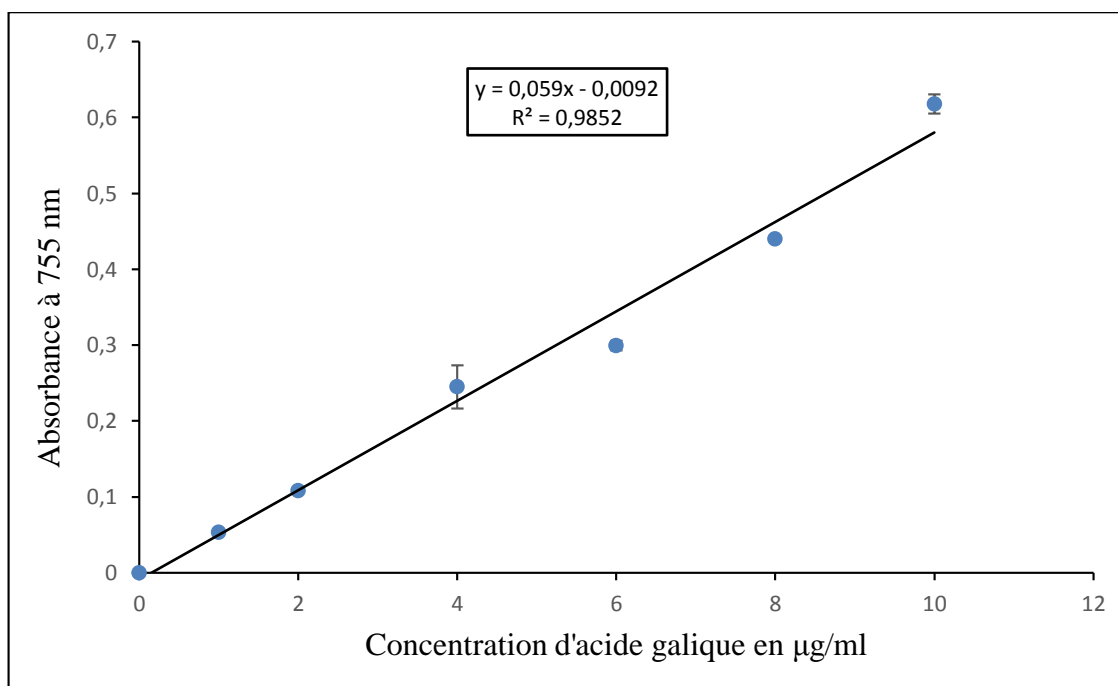
	Rhamnétin	
Flavonol	Quercétine	
	Kaempferol	
	Rutine	
Acides phénoliques	Acide gallique	
Acides hydroxycinnamique	Acide p- Coumarique	
	Acide férulique	

**Annexe VII** : Protocole général d'extraction des composés phénoliques, dosages et méthodes utilisées pour l'étude du pouvoir antioxydant des feuilles de *R. alaternus*.

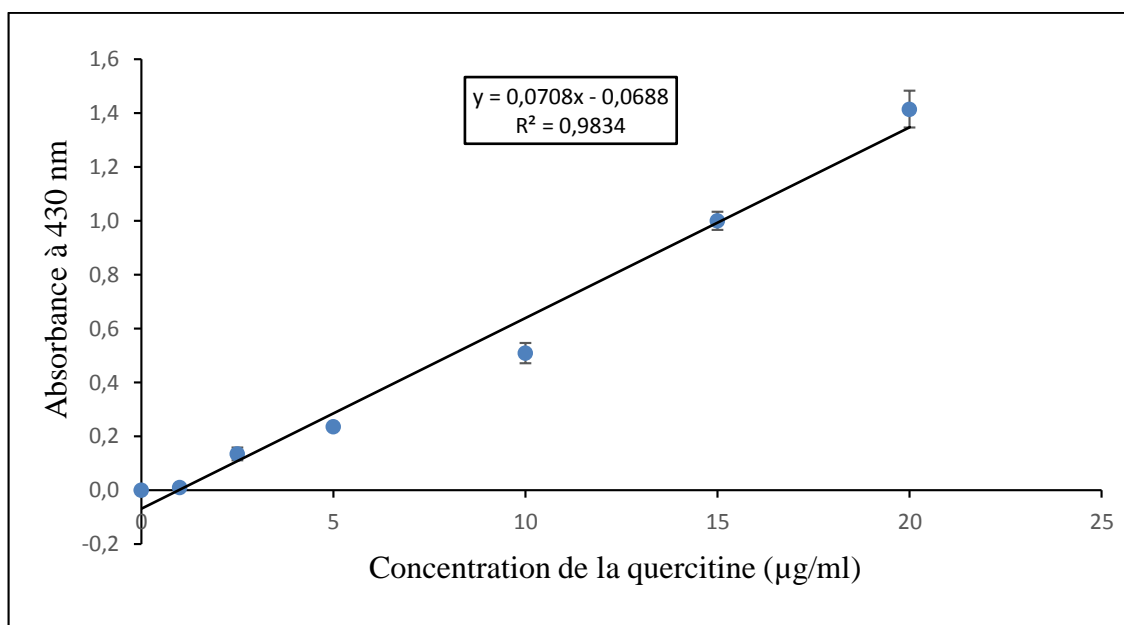


**Annexe VIII** : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants.

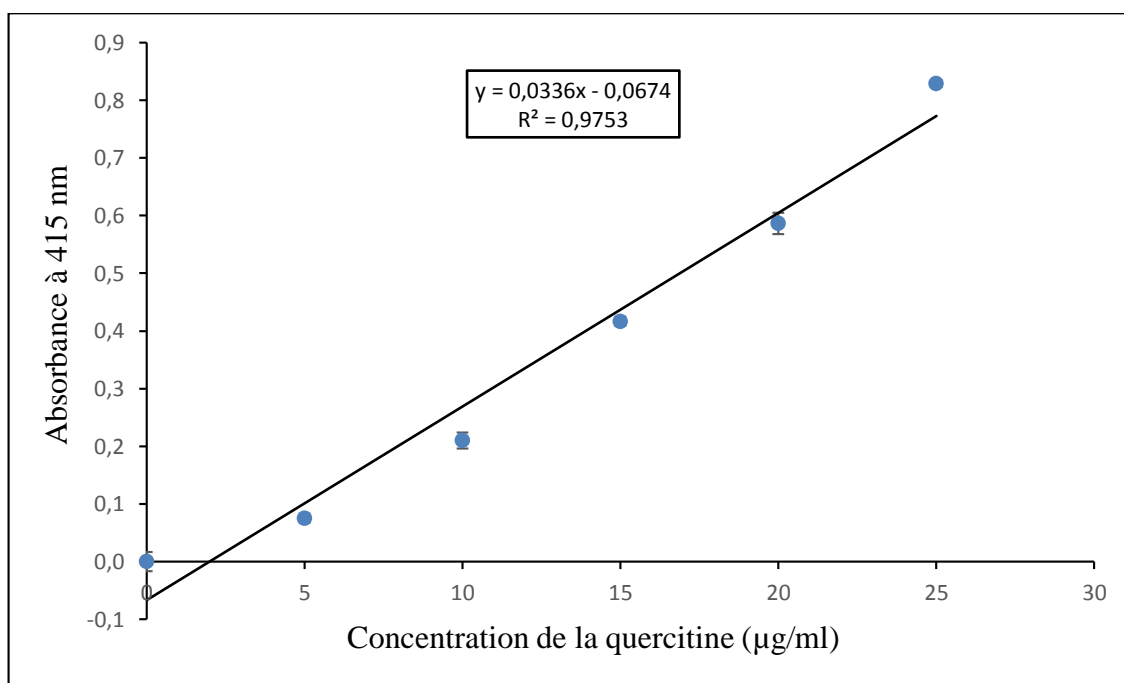
**Figure 1** : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercitine (model de Box-Behnken).



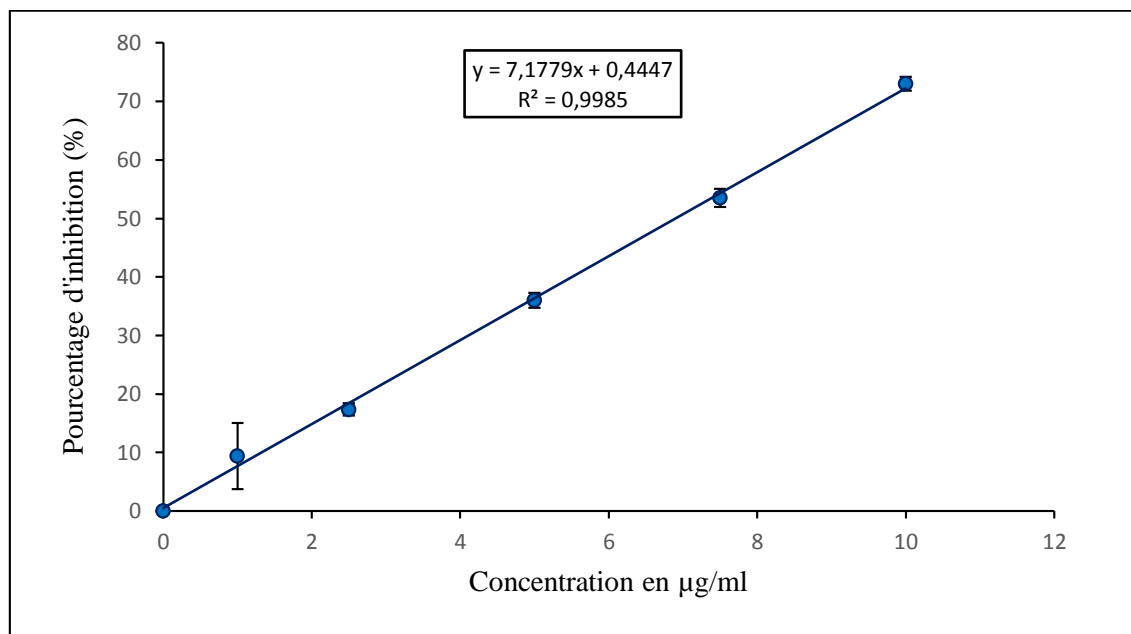
**Figure 2** : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des polyphénols en utilisant l'acide gallique.



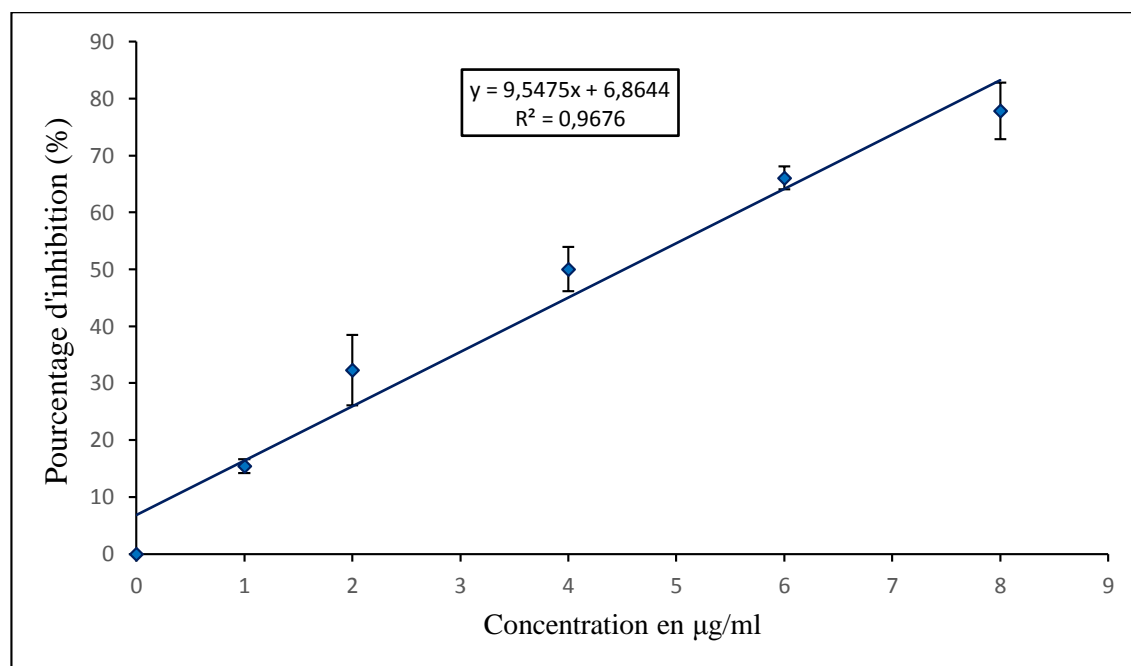
**Figure 3 :** Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercitine (dosage des antioxydants).



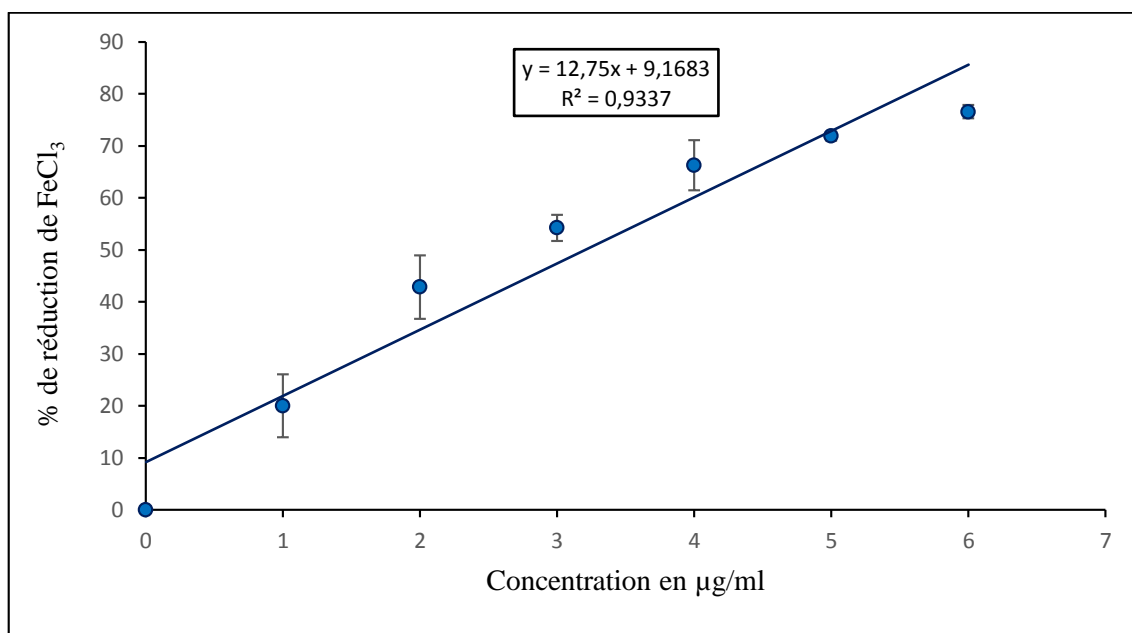
**Figure 4 :** Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des flavones et flavonols en utilisant la quercitine.

**Annexe IX :** Evaluation de l'activité anti-radicalaire en fonction des standards.

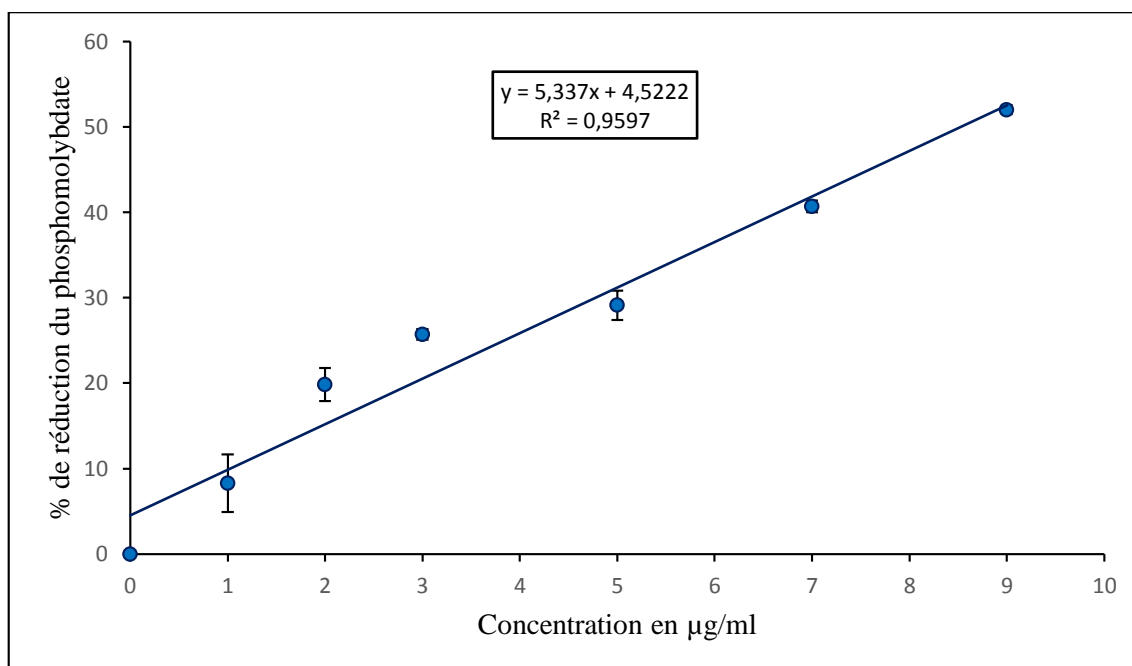
**Figure 1 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup> en fonction de la concentration en quercitine.



**Figure 2 :** Pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> en fonction de la concentration en acide ascorbique.

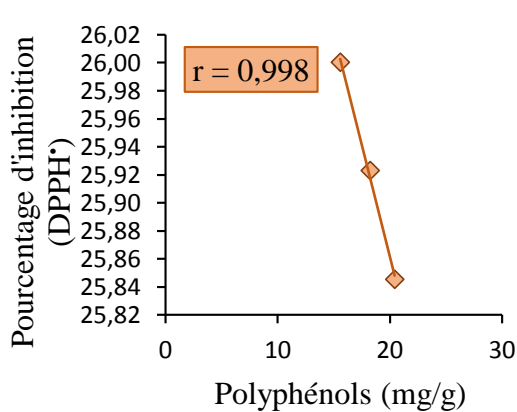
**Annexe X :** Evaluation de l'activité réductrice en fonction des standards.

**Figure 1 :** Pourcentage de réduction de  $\text{FeCl}_3$  en fonction de la concentration en quercitine.

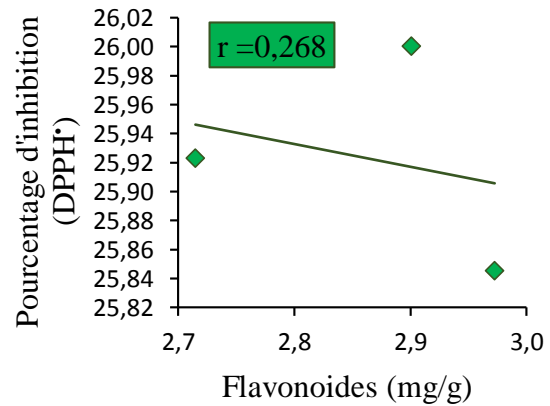


**Figure 2 :** Pourcentage de réduction du phosphomolybdate en fonction de la concentration en acide gallique.

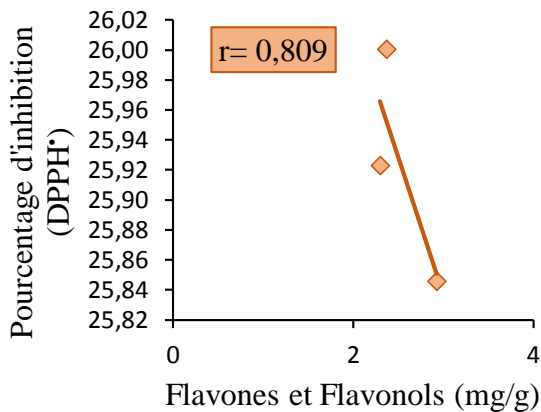
**Annexe XI : Corrélations entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH' et les teneurs en antioxydants.**



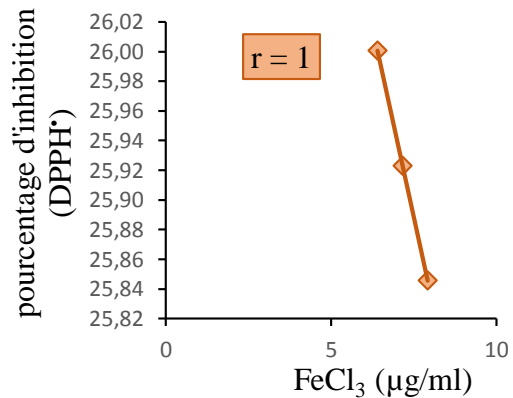
1- Avec les polyphénols.



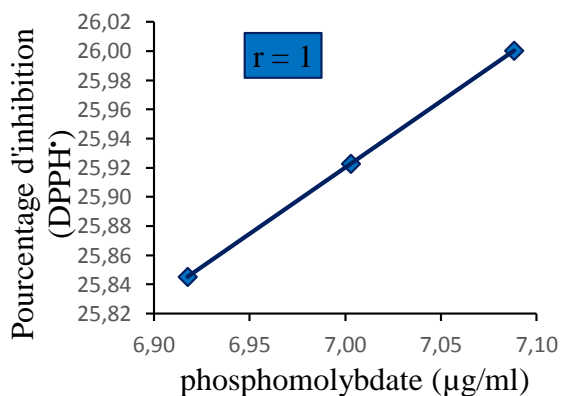
2- Avec les flavonoïdes.



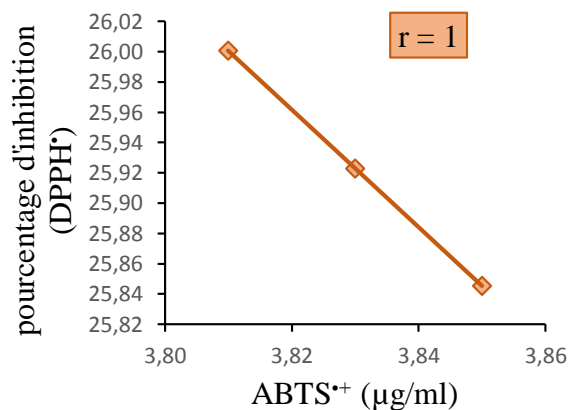
3- Avec les flavones et flavonols.



4- Avec le pouvoir réducteur en FeCl<sub>3</sub>.



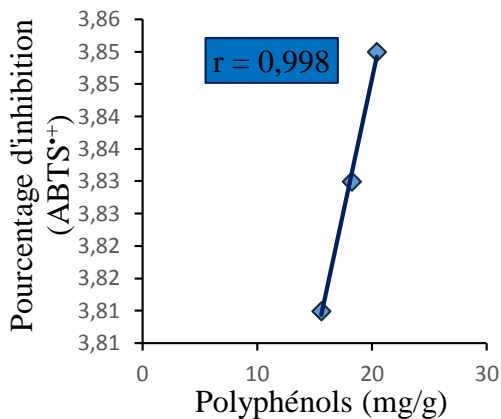
5- Avec le pouvoir réducteur en Phosphomolybdate.



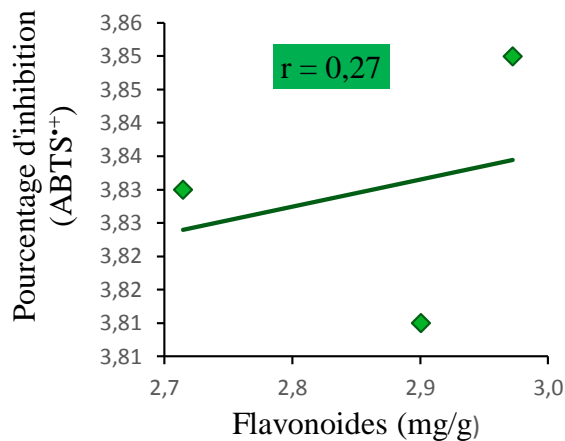
6- Avec le radical ABTS<sup>•+</sup>.



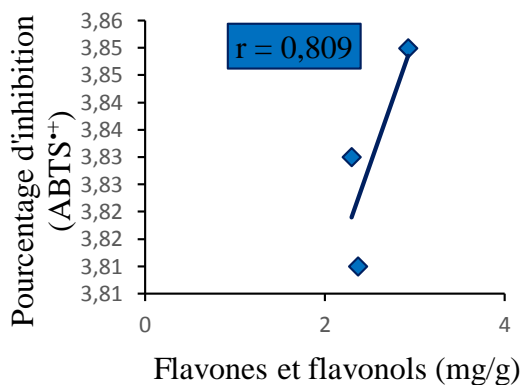
**Annexe XII :** Corrélations entre le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> et les teneurs en antioxydants.



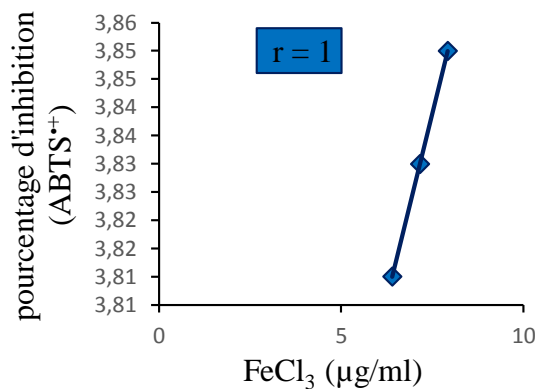
1- Avec les polyphénols.



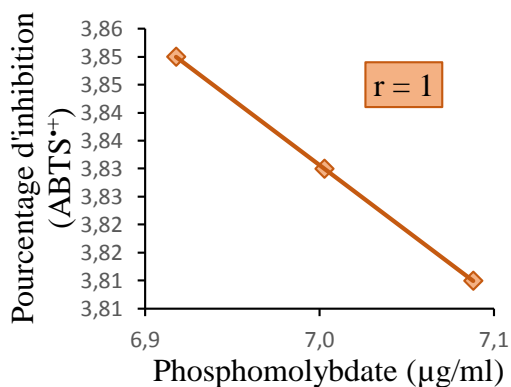
2- Avec les flavonoïdes.



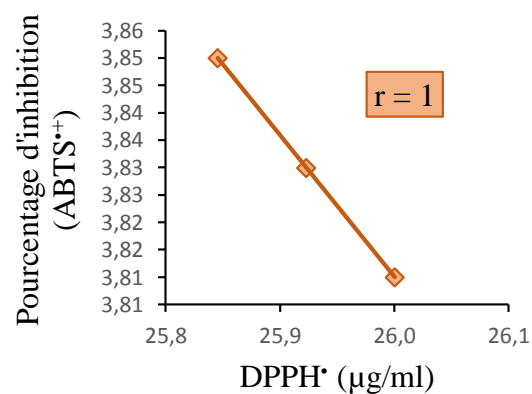
3- Avec les flavones et flavonols.



4- Avec le pouvoir réducteur en FeCl<sub>3</sub>.

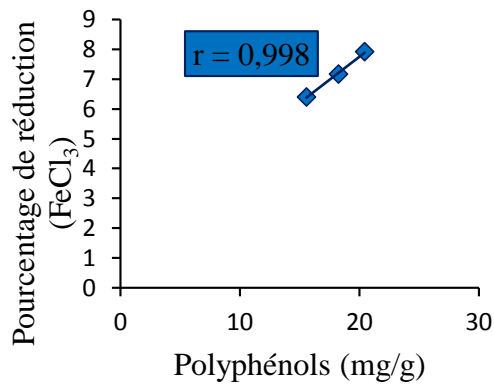


5- Avec le pouvoir réducteur en Phosphomolybdate.

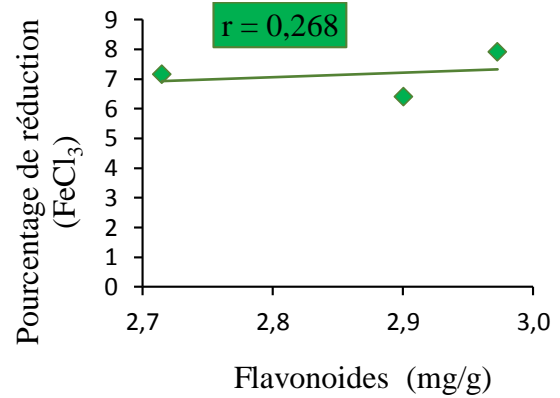


6- Avec le radical DPPH<sup>•</sup>.

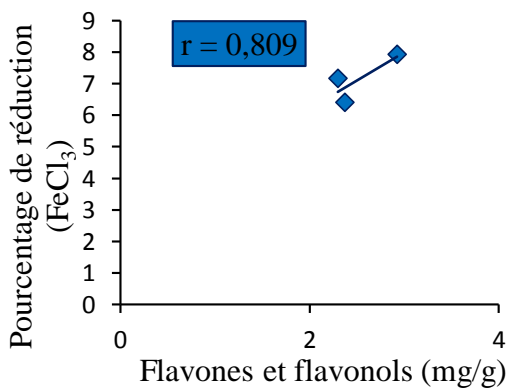
**Annexe XIII :** Corrélations entre le pourcentage de réduction du FeCl<sub>3</sub> et les teneurs en antioxydants.



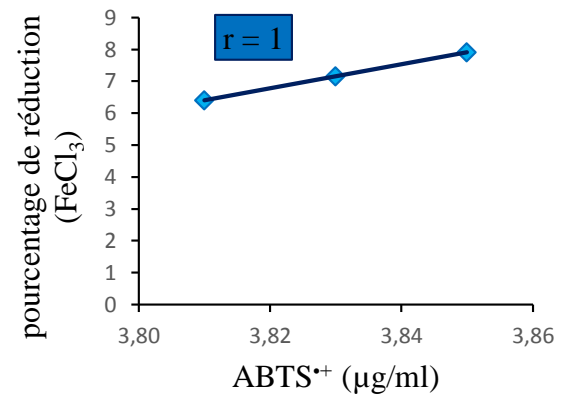
1- Avec les Polyphénols.



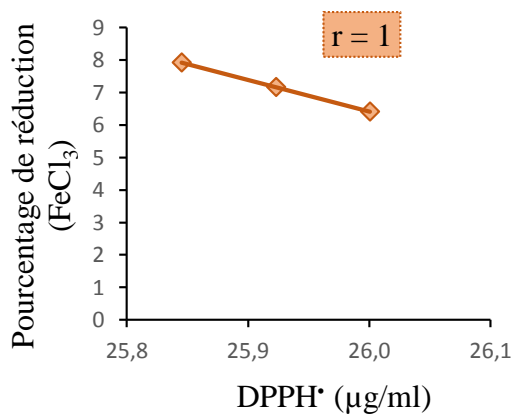
2- Avec les Flavonoïdes.



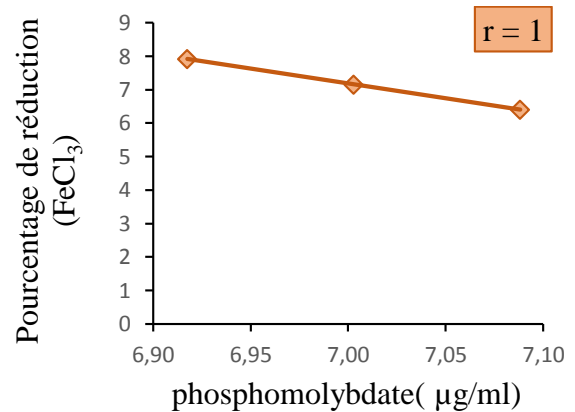
3- Avec les flavones et flavonols.



4- Avec le radical ABTS<sup>+</sup>.

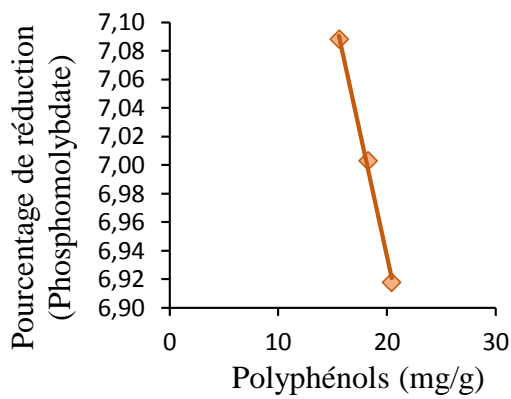


5- Avec le radical DPPH·.

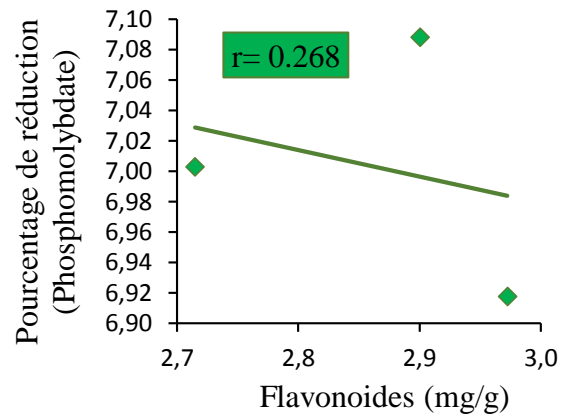


6- Avec le pouvoir réducteur en Phosphomolybdate.

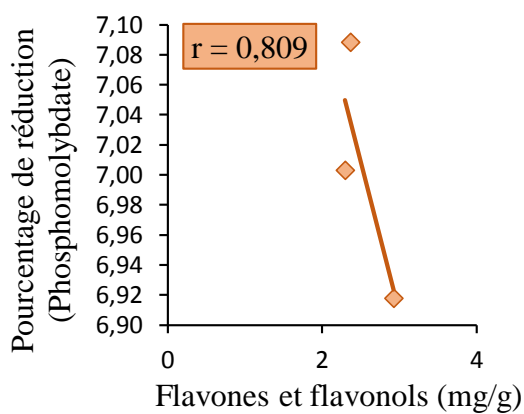
**Annexe XIV :** Corrélations entre le pourcentage de réduction du phosphomolybdate et les teneurs en antioxydants.



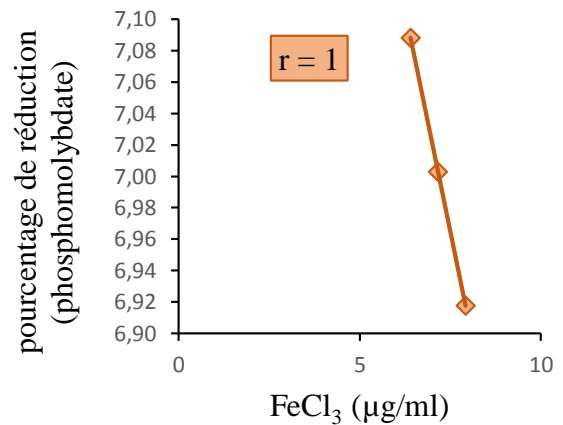
1- Avec les polyphénols.



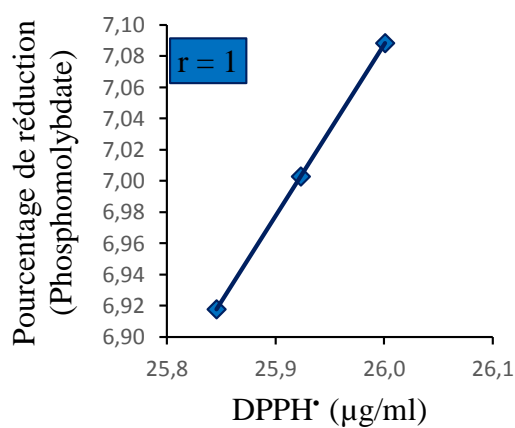
2- Avec les flavonoïdes.



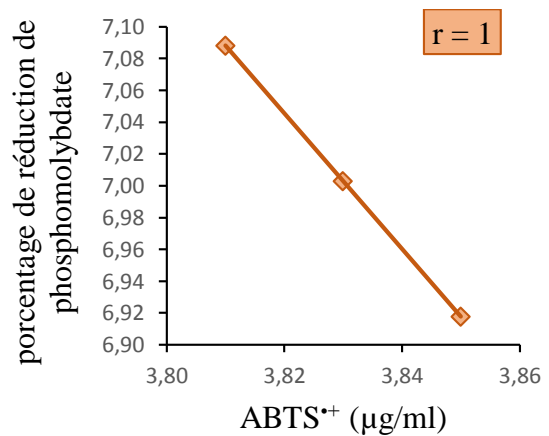
3- Avec les flavones et flavonols.



4- Avec le pouvoir réducteur en FeCl<sub>3</sub>.



5- Avec le radical DPPH·.



6- Avec le radical ABTS<sup>·+</sup>.

## Annexe XV : Matériel et réactifs utilisés.

Matériel	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bain marie (Raypa)</li> <li>- Balance de précision (Adventurer)</li> <li>- Barro magnétique</li> <li>- Bécher</li> <li>- Centrifugeuse (Sigma)</li> <li>- Eprouvette graduée</li> <li>- Etuve ventilée (WTC binder)</li> <li>- Papier filtre</li> <li>- Papier aluminium</li> <li>- Papier absorbant</li> <li>- Entonnoir</li> <li>- Parafilm</li> <li>- Micropipette</li> <li>- Micro-spatule</li> <li>- Pipette pasteur</li> <li>- Pissette</li> <li>- Eprouvette</li> <li>- Tamiseur (Retsch)</li> <li>- Spatule</li> <li>- Broyeur électrique (Retsh)</li> <li>- Receptions en plastique</li> <li>- Portoir à tube</li> <li>- pH mètre (BOECO Germany BT-675)</li> <li>- Plaque magnétique</li> <li>- Spectrophotomètre UV-VIS (Rayleigh Vis-723G)</li> <li>- Tubes à essais</li> <li>- Tubes coniques</li> <li>- Vortex (VELP Scientifica)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ABTS (<math>C_{18}H_{18}N_4O_6S_4</math>)</li> <li>- Acétate de sodium (<math>C_2H_3NaO_2</math>)</li> <li>- Acétone pure (<math>C_3H_6O</math>)</li> <li>- Acide ascorbique (<math>C_6H_8O_6</math>)</li> <li>- Acide gallique (<math>C_7H_6O_5</math>)</li> <li>- Acide sulfurique (<math>H_2SO_4</math>)</li> <li>- Acide trichloroacétique (<math>C_2HCl_3O_2</math>)</li> <li>- Carbonate de sodium (<math>Na_2CO_3</math>)</li> <li>- Chlorure d'aluminium (<math>AlCl_3</math>)</li> <li>- Chlorure ferrique (<math>FeCl_3</math>)</li> <li>- Dihydrogénophosphate de sodium (<math>NaH_2PO_4</math>)</li> <li>- DPPH (<math>C_{18}H_{12}N_5O_6</math>)</li> <li>- Ethanol (<math>C_2H_6O</math>)</li> <li>- Ferricyannure de potassium (<math>K_3Fe(CN)_6</math>)</li> <li>- Folin-Ciocalteu</li> <li>- Hydrogénophosphate de sodium (<math>Na_2HPO_4</math>)</li> <li>- Méthanol (<math>CH_3OH</math>)</li> <li>- Molybdate d'ammonium (<math>(NH_4)_6Mo_7O_{24}</math>)</li> <li>- Persulfate de potassium (<math>K_2S_2O_8</math>)</li> <li>- Phosphate de potassium (<math>KH_2PO_4</math>)</li> <li>- Quercétine (<math>C_{15}H_{10}O_7</math>)</li> </ul>



## Résumé

Dans cette étude, les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *Rhamnus alaternus*, ont été déterminées par la méthodologie des surfaces de réponse (RSM). Le modèle de Box-Behnken a été employé pour étudier les effets de trois variables indépendantes, à savoir la polarité de solvant (% v/v), le ratio solide/liquide (mg/ml) et le temps d'extraction (h) sur la réponse. L'analyse de régression a prouvé que 98% de la variation a été expliqué par ce modèle. Les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes sont : la polarité de l'acétone de 79.54 %, le temps d'extraction de 18.04 h et le rapport solide/liquide de 0.132 mg/ml. Dans ces conditions optimisées, le rendement maximum expérimental de flavonoïde est de 2.86 mg EQ/g de MS, qui est en accord étroit avec la valeur prévue, ce qui indique la convenance de modèle et le succès de RSM dans l'optimisation des conditions d'extraction.

Le contenu total des polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols d'extrait acétonique optimisé des feuilles de *R. alaternus*, a été déterminé à partir des courbes d'étalonnage, tandis que, l'activité antioxydante a été évaluée par quatre méthodes in vitro, à savoir la réduction de fer et phoshomolybdate, ainsi que le piégeage de radical libre DPPH et ABTS.

**Mots clés :** RSM, Box-Behnken, *Rhamnus alaternus*, flavonoïdes totaux, activité antioxydante.

## Abstract

In this study, the optimal conditions for the extraction of flavonoids from *Rhamnus alaternus* leaves, were determined using response surface methodology (RSM). A Box-Behnken design was used to investigate the effects of three independent variables, namely polarity solvent (% v/v), solid/liquid ratio (mg/ml) and extraction time (h) on the response. Regression analysis showed that 98% of the variation was explained by the model. The optimum conditions for extraction of flavonoids were found to be at acetone concentration 79.54%, extraction time 18.04 h and the ratio of liquid/solid 0.132 mg/ml. Under these optimized conditions, the experimental maximum yield of flavonoids was 2.86 mg QE/g DW, which was in close agreement with predicted values, thus indicating the suitability of the models and the success of RSM in optimizing the extraction conditions.

The total contents of polyphenols, flavonoïdes, flavones and flavonols of acetone extract optimized of the sheets of *R. alaternus*, were determined from calibration curves. While, the antioxydant activity was evaluated by four in vitro methods, namely the reduction power and phoshomolybdate, as well as the trapping of free radical DPPH and ABTS.

**Keywords :** RSM, Box-Behnken, *Rhamnus alaternus*, total flavonoïdes, antioxydant activity.

## ملخص

في هذه الدراسة، تم تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات من أوراق *Rhamnus alaternus* باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM). تم استخدام نظام بوكس-بانكن لدراسة آثار ثلاثة متغيرات مستقلة على الاستجابة، وهي مذيب قطبية (% v/v)، نسبة صلب/سائل (ملغ/مل) و وقت الاستخلاص (سا). وأظهر تحليل الانحدار أن 98% من التباين تم شرحه من قبل النموذج، وأظهرت الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات أن يكون تركيز الأسيتون 79.54%، وقت الاستخراج 18.04 ساعة ونسبة صلب/سائل 0.132 ملغ / مل. في ظل هذه الظروف المثلى، كان أقصى عائد تجريبي من الفلافونويدات 2.86 ملغ الموافق للكيرسيتين/غ من المادة الجافة، الذي كان في اتفاق وثيق مع القيم المتوقعة، مما يدل على مدى ملاءمة النموذج ونجاح RSM في تحسين ظروف الاستخلاص.

قدر المحتوى الكلي لعديدات الفينول، الفلافونويدات، الفلافونولات والفلافونيات من مستخلص الأسيتون الأمثل من أوراق *R. alaternus* من منحنيات المعايير، في حين تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة من خلال أربعة طرق في المختبر، وهي قوة الحد من الحديد و فوسفومولبيدات، و أيضا حصر الجذور الحرة باستخدام DPPH و ABTS.

**كلمات مفتاحية:** RSM، نموذج بوكس-بانكن، *Rhamnus alaternus*، الفلافونويدات الكلية، نشاط مضاد للأوكسدة.