

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences biologiques
Option : Pharmacotoxicologie



Réf :

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

Thème

**Etude de l'effet de quelques paramètres
d'extraction sur la teneur en composés phénoliques
et l'activité antioxydante d'une plante de la
pharmacopée saharienne.**

Présenté par :
SADOUDI Hani et MEKHNACH Yasmine

Soutenu le : 14 Juillet 2022

Devant le jury composé de :

Mme ABDERRAHIM S.	MCB	Présidente
Mme AMIRH.	MCA	Promotrice
Mr. BRIBI N.	MCA	Examinateur

Année universitaire : 2021 / 2022

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail ;

Au premier lieu à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans ma vie et pour leur amour, sacrifice, soutien durant toute ma vie.

A ma chère sœur Anaïs et frère Mehdi.

A la mémoire de mon grand-père qui m'a encouragé d'y aller loin dans mes études.

A ma grande mère qui est toujours à mes côtés.

A toute ma grande famille.

A tous mes amis qui m'ont aidé d'une façon ou d'autres.

A toute la promotion de pharmacotoxicologie 2021-2022

Hani

Je dédie ce travail

A mes très chers et affectueux parents qui sont la lumière de ma vie, qui sont toujours présents pour m'encourager et toujours prêts à me soutenir et je prie dieu le tout Puissant de me les garder.

A mes chers grands-parents qui ne cesse pas de prier pour moi, que Dieu les protège et les garde pour nous.

A ma chère sœur Nesrine.

A mes chers frères Yanis, Salim et Amayas.

A mes chers oncles Abdelkrim, Farid, Aïmed, Hacene, Ahcene et leurs conjoints.

A mes chères tantes Fatiha et Saida.

A tous mes cousins et cousines.

Une dédicace spéciale à mon binôme et toute sa famille.

A mes amis qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Mes dédicaces s'adressent aussi à tous mes enseignants.

A toute la promotion de pharmacotoxicologie 2021-2022

Yasmine

Remerciements

On remercie le bon dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la volonté de faire et de finir ce travail.

Toute nos estimes et nos respectueuses gratitude vont à notre promotrice Mme AMIR H, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé, nous a permis de réaliser ce mémoire.

On exprime nos reconnaissances à Mme ABDERRAHIM qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Nos chaleureux remerciements vont également à Mr BRIBI qui nous a fait l'honneur d'examiner le travail.

Nos plus sincères remerciements à l'ingénieure de laboratoire biochimie pour son aide, faciliter nos travaux et pour sa gentillesse au quotidien.

Un grand merci pour le binôme Zidat et Boukrara qu'elles nous ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Toute nos gratitudes a tous les enseignants de sciences de la nature et de la vie, surtout ceux qui ont contribué à notre formation.

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature.
TCP	Teneur en Composés Phénoliques.
TF	Teneur en Flavonoïde.
DPPH	1,1-Diphényle-2-picryl Hydrazyle.
ANOVA	Analyse of variance.
EAG	Equivalent Acide Gallique.
EQ	Equivalent quercetine.
EAU	Extraction Assistée par Ultrasons.
EAM	Extraction Assistée par Macération.
P	Probabilité.
JMP	John's Machimtosh Project.
RMSE	Root Mean Squar Error.
BBD	Box-Behnken Design.

Liste des Figures

Numéro	Titre	Pages
Figure 01	Photographie de <i>Matricaria pubescens</i> .	02
Figure 02	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.	05
Figure 03	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.	05
Figure 04	Squelette de base des flavonoïdes.	05
Figure 05	Structure chimique d'un tanin condensé et d'un tanin hydrolysable.	07
Figure 06	Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en CPT avec extractions assistée par l'ultrasons.	18
Figure 07	Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en FV avec extractions assistée par l'ultrasons.	22
Figure 08	Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité anti oxydante avec extractions assistée par l'ultrasons.	25
Figure 09	Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en CPT avec extractions assistée par macération.	30
Figure 10	Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en FV avec extractions assistée par macération.	33
Figure 11	Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité anti oxydante avec extractions assistée par macération.	36
Figure 12	Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode ultrasons.	38
Figure 13	Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode de macération.	38

Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Pages
Tableau I	Classification taxonomique de <i>Matricaria pubescens</i> .	03
Tableau II	Principales classes des flavonoïdes.	06
Tableau III	Principaux logiciels de plans d'expériences.	10
Tableau IV	Résumé des paramètres testés lors de l'étude préliminaire et les conditions d'extraction optimales sélectionnées.	11
Tableau V	Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons.	12
Tableau VI	Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par macération.	12
Tableau VII	Valeurs expérimentales et prédites des TCP, TF et de l'activité DPPH de <i>Matricaria pubescens</i> obtenus avec la technique d'extraction par ultrasons, du plan Box-Behnken.	16
Tableau VIII	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	17
Tableau IX	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.	20
Tableau X	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré	21
Tableau XI	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes.	23
Tableau XII	Coefficients de régression estimée du modèle polynomial de second degré.	24
Tableau XIII	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante.	26
Tableau XIV	Valeurs expérimentales et prédites des TCP, TF et de l'activité DPPH de <i>Matricaria pubescens</i> obtenus avec la technique EAM, du plan Box-Behnken.	27
Tableau XV	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	29
Tableau XVI	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.	31
Tableau XVII	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	32
Tableau XVIII	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes.	34

Tableau XIX	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	35
Tableau XX	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante.	37
Tableau XXI	Conditions optimales et résultats prédites et expérimentaux des teneurs en TCP, TF et DPPH obtenus par extractions assistée par macération et par ultrasons.	39

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la plante.....	02
I.1. Présentation de la plante.....	02
I.1.1. Description botanique	02
I.1.2. Nom vernaculaire	02
I.1.3. Classification systématique.....	02
I.1.4. Origine et répartition	03
I.1.5. Propriétés thérapeutique et médicinale	03
I.1.6. Composition chimique	04
I.2. Composés phénoliques	
I.2.1. Généralités	04
I.2.2. Structure et classification des composés phénoliques	04
I.2.3. Propriété antioxydante des composés phénoliques	07
I.2.4. Méthodes d'extraction des polyphénols	07
I.2.4.1. Extraction par macération	08
I.2.4.2. Extraction par ultrasons.....	08
II. Méthodologie des plans d'expériences.....	09
II.1. Définition	09
II.2. Types de plans d'expériences	09
II.3. Principaux avantages des plans d'expériences	10
II.4. Logiciels de plans d'expériences	10

Partie Pratique

I. Matériel et méthodes.....	11
I.1. Préparation du matériel végétal	11
I.2. Optimisation des conditions et de la technique d'extraction des composés phénoliques..	11

I.2.1. Etude préliminaire.....	11
I.2.2.Application du plan d'expérience.....	12
I.3. Détermination de la teneur en antioxydants	13
I.3.1. Dosage des composés phénoliques	13
I.3.2. Dosage des flavonoïdes	13
I.4. Activité « scavenger » du radical DPPH	14
I.5. Etude statistique	14
II. Résultats et discussion.....	15
II.1. Application du plan d'expérience	15
II.2.Extraction assistée par ultrasons	15
II.3.Extraction par macération	26
II.4. Condition optimales	37
Conclusion	40
Références bibliographiques.....	42
Annexes	
Résumé	



INTRODUCTION

Introduction

Il ya des années, les plantes médicinales ont déclenché un grand intérêt dans le domaine thérapeutique. En effet, les substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées du fait de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits, notamment dans le domaine de la nutrition, de la pharmacie et de la cosmétique (**Herzi, 2013**).

Les scientifiques d'aujourd'hui conduisent le développement d'une nouvelle génération de substances antioxydants et antibactériennes d'origine végétale pour remplacer celles issues de la synthèse. De même, de nombreuses industries reviennent à incorporer ces molécules aux propriétés biologiques intéressantes dans leurs formulations (**Taviano et al., 2013**). Cependant, les techniques traditionnelles d'extraction de ces substances naturelles à partir des plantes nécessitent d'importantes adaptations afin de réduire les risques pour la santé, la sécurité et l'environnement (**Herzi, 2013**).

Matricaria pubescens est une plante médicinale de la famille des Astéracées très utilisée en médecine traditionnelle en Algérie et notamment par les populations du Sahara central (**Maiza et al., 1993**).

En effet, de nombreuses études à travers le monde se sont orientées vers l'évaluation de produits naturels biologiquement actifs afin d'établir des règles scientifiques pour leur utilisation. Dans ce contexte, la présente étude a été consacrée à évaluer le pouvoir antioxydant des composés phénoliques de la plante médicinale *Matricaria pubescens*, après leur extraction en appliquant deux méthodes d'extraction (macération et ultrasons) à l'aide d'un plan d'expérience qui peut aider à l'industrialisation du produit ainsi qu'à la résolution de problèmes complexes d'optimisation.

Dans cette étude trois axes sont abordés :

- Le premier consiste en une synthèse bibliographique de la plante *Matricaria pubescens* et méthodologie des plans d'expériences.
- Le deuxième porte sur le matériel et les méthodes utilisés pour l'extraction et les différents dosages des composés phénoliques et des flavonoïdes et l'évaluation de l'activité anti radicalaire (le DPPH).
- Enfin dans le troisième axe, les résultats obtenus seront présentés et discutés en fonction des données disponibles ce qui permettra de dégager une conclusion et d'envisager des perspectives.



SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur *Matricaria pubescens*

I.1.Présentation de la plante

I.1.1.Description botanique

Matricaria pubescens est une petite plante annuelle de 10 à 20cm de haut, atteignant rarement 40cm, avec de nombreuses tiges prostrées. Les tiges fines et vertes foncées sont très peu ramifiées. Les feuilles profondément disséquées, chacune se termine par une pointe blanche, légèrement charnues de 10 à 20mm de long. Ses fleurs tubulaires jaunes sont regroupées sur une tête en forme de disque hémisphérique. Le capitule mesure environ 5 à 8mm de diamètre et est attaché à l'extrémité de la tige (**Ouezel et al., 1963**). Les fruits sont des akènes et ont de petits pappus membraneux pour favoriser la dispersion (**Figure 01**).L'ensemble de la plante dégage un parfum très agréable, la floraison à lieu à tout moment, au printemps ou après la pluie (**Ozenda, 2004**).



Figure01 : Photographie de *Matricaria pubescens* (**Makhloufi et al., 2012**).

I.1.2. Noms vernaculaires

La dénomination de *Matricaria pubescens* diffère d'une région à l'autre ; à El Goléa et Ouargla elle est appelée Guertoufa, à Tassili Ainasnis et à Béchar elle est appelée par contre Ouazouaza ou Guertoufa Khadra (**Maiza et al ., 1993**).

I.1.3. Classification systématique

La classification systématique de la plante est détaillée dans le tableau ci-dessus :

Tableau I : Classification taxonomique de *Matricaria pubescens* (Judd et al., 2002 ; Ozenda, 2004):

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Sous classe	Composita
Ordre	Astérales
Famille	Astéracées
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèces	<i>Pubescens</i>

I.1.4. Origine et répartition

Selon les normes de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature), la plante *Matricaria pubescens* est endémique d'Afrique du nord.

Au niveau local (Sahara Algérien), cette plante est commune au Sahara septentrional correspondant aux régions de Biskra, Figuig, El oued, Touggourt, Béchar, Ghardaia, El golea, Ouargla, Beni Abbès, et au Sahara central qui comprend les régions de Adrar, Tamanrasset, Djanet, Timimoun, In salah (Ozenda, 1991).

I.1.5. Propriétés thérapeutique et médicinale

Cette plante est largement utilisée par nos ancêtres comme traitement de beaucoup de maladies et avec des méthodes très variées. Elle est utilisée pour soulager le rhume et les problèmes digestifs (Ould El Hadj et al., 2003). Elle est également pratiquée dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire, analgésiques, antiseptiques et présentent une activité antibactérienne, antifongique contre quelques espèces de bactéries et champignons pathogènes à l'homme (Markouk, 1992). *Matricaria pubescens* est utilisée dans les otites, les infections oculaires et les inflammations des plaies démangeaisons... (Hammiche et Maiza, 2006).

De plus, la *Matricaria* est exploitée dans l'alimentation pour donner un saveur aux préparations des soupes, thés... Cette plante peut être utilisée complètement ou partiellement sous différentes formes à savoir macération, infusion, décoction et inhalation (Djellouli et al., 2013).

I.1.6. Composition chimique

Les recherches phytochimiques sur *Matricaria pubescens* ont permis de mettre en évidence la présence de : tanins, flavonoïdes (flavonoïdes aglycones et flavonoïdes glycolyses), alcaloïdes, saponines, terpènes, stéroïdes (**Djellouliet al., 2013**).

I.2. Composés phénoliques

I.2.1. Généralités

Les polyphénols sont la plus grande famille de molécules largement répandue dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires qui se présentent dans toutes les parties de la plante (**Beta et al., 2005**). Ils sont des molécules très diverses, composées d'un ou de plusieurs cycles benzéniques aux quels est lié un ou plusieurs groupements hydroxyles, libres ou engagés (**Benard, 2009**). Ces composés phénoliques peuvent être conjugués, avec un ou plusieurs résidus glucidiques, ou être liés à d'autres composés chimiques tels que des acides carboxyliques, des amines, des lipides ou à d'autres phénols (**Robards et al., 1999 ; Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

I.2.2. Structure et classification des composés phénoliques

Plus de 8000 structures phénoliques, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire, dont les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins ont été identifiés (**Vercauteren et al., 1998 ; Lugasi et al., 2003; Rahman et al., 2006**).

Les principales classes de composés phénoliques sont les acides phénoliques (les dérivés des acides benzoïques et acides cinnamiques), les coumarines, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés (**Naczk et Shahidi, 2004**).

I.2.2.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (**Figure 02**) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (**Figure 03**) (**Bruneton, 2008**).

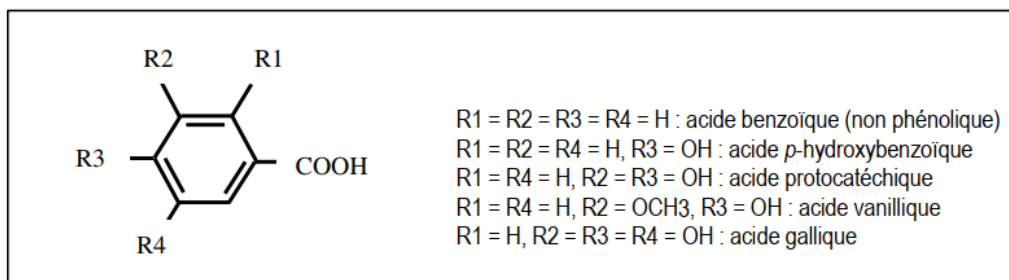


Figure 02 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Bruneton, 2008).

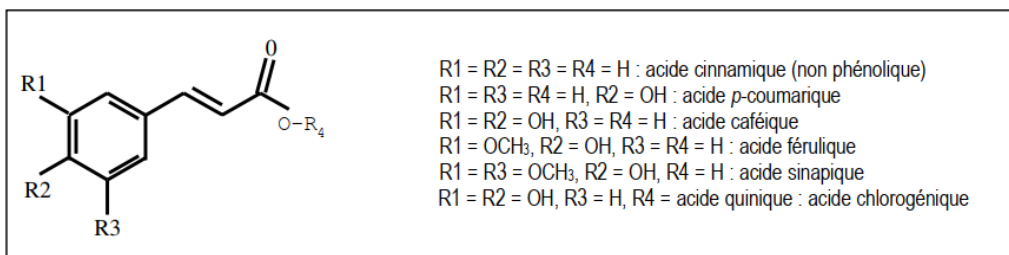


Figure 03 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Han *et al.*, 2007 ; Chira *et al.*, 2008).

I.2.2.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes regroupe une très large gamme de composés naturels. Les flavonoïdes ont une source biosynthétique commune et par conséquent, ils ont tous le même squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, deux cycles C₆ (A et B) reliés par une chaîne C₃ (Bruneton, 1999 ; Gebhardt *et al.*, 2005) (Figure 04).

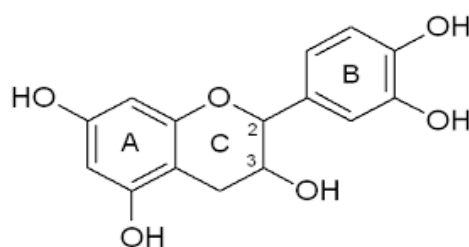
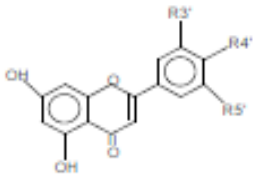
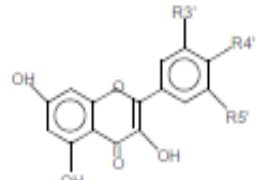
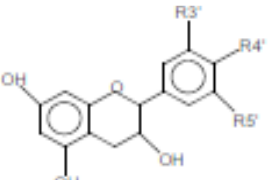
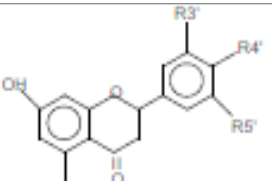
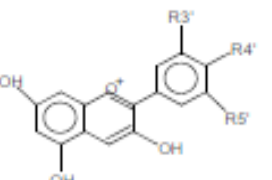
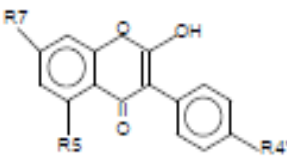


Figure 04 : Squelette de base des flavonoïdes (Crozier, 2003).

Les flavonoïdes sont classés selon plusieurs critères : présence ou non d'une double liaison en position 2, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position 3 (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006). Des groupements hydroxyles et méthoxyles peuvent le plus souvent se situer en position 2', 3', 4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7 (Abderrahmane, B. 2007).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanidines (Pietta, 2000 ; Gramza et Korczak, 2005). Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme glycosylée (Sakihama *et al.*,2002 ; Ghedira, 2005)(Tableau II).

Tableau II :Principales classes des flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Narayana *et al.*,2001).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
Flavonols		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

I.2.2.3. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques caractérisés par la capacité à former des complexes (par précipitation) avec des polymères naturels comme les protéines, les polysaccharides et les minéraux (Garro-Galvez et al., 1997 ; Rubanza et al., 2005). Structuellement, les tanins sont divisés en deux catégories, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Linden et Lorient, 1994) (Figure 05).

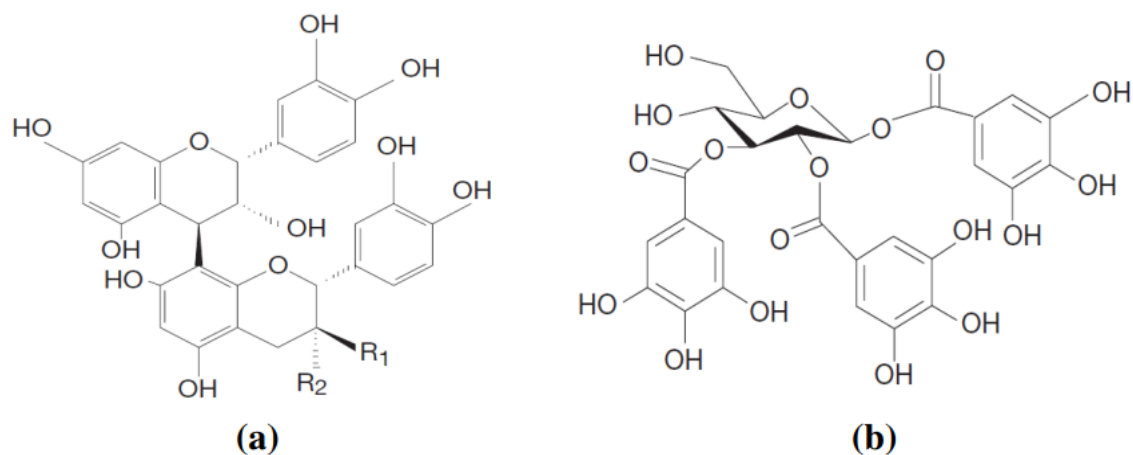


Figure 05 : Structure chimique d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b) (Derbel et al., 2005)

I.2.3. Propriété antioxydante des composés phénoliques

Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes et agissent à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux de transition, la neutralisation des radicaux libres, l'inhibition d'enzymes génératrice de radicaux libres, et l'induction de la synthèse d'enzymes antioxydantes (Cotelle et al., 1995 ; Bors et al., 1997 ; Grassmann et al., 2002). Cette activité est étroitement liée à leur structure, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim et al., 2002). L'activité antioxydante des composés phénoliques augmente avec le degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyles (Robards et al., 2005).

I.2.4. Méthodes d'extraction des polyphénols

La première technologie d'extraction des produits a vu le jour quand les humains se sont intéressés à la nature environnante et ses bienfaits. Depuis ces temps très anciens diverses

civilisations du monde entier ont apporté une pierre à l'édifice dans le domaine de l'extraction (Lucchesi, 2005).

I.2.4.1.Extraction par macération

La macération est la méthode d'extraction solide/liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. Elle consiste à mettre en contact le matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, généralement à température ambiante. L'opération est généralement longue et les rendements sont généralement modérés (GalvanD'Alessandro, 2013), Elle présente l'intérêt d'être facile à mettre en œuvre, et non coûteuse, mais d'autre part, elle nécessite beaucoup de temps et elle est très peu sélective (Makino *et al.*, 2009).

Dans les cas où les molécules extraites sont sensible à la chaleur, pour être efficace, une macération sans agitation peut durer 4 à 10 jours, ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur (GalvanD'Alessandro, 2013).

I.2.4.2. Extraction par ultrasons

Les procédés d'extraction conventionnels (macération) sont assez laborieux, prennent du temps, impliquent de grandes quantités de solvants et peuvent provoquer une certaine dégradation de la molécule cible et la perte partielle des substances volatiles (Cvjetko Bubalo *et al.*, 2018). Il est donc essentiel de promouvoir le développement et l'application de techniques d'extraction alternatives, dites non conventionnelles ou vertes tel que l'extraction assistée par les ultrasons (Brglez Mojzer *et al.*, 2016).

L'extraction par ultrasons des composés bioactifs est une technique simple, efficace et peu coûteuse (Azmir *et al.*, 2013).L'avantage de cette technique est que l'extraction peut être effectuée à température ambiante 20-25° ce qui permet de conserver les composés thermolabiles ; colorants, antioxydants, arômes ou caroténoïdes (Routray *et Orsat*, 2012),elle est trois fois plus rapide qu'une simple extraction par solvant et consomme très peu de solvant et d'énergie. En fait la matière première est d'abord immergée dans de l'eau ou un solvant tout en étant soumis à des ultrasons (Azmir *et al.*, 2013).

Le principe de cette technique est de détruire la paroi cellulaire par fréquence ultrasonique. Cela permet une meilleure pénétration du solvant au centre du matériau, donc meilleur taux d'extraction. La fréquence d'utilisation est généralement supérieure à 20 kHz. Dans les milieux liquides, les ondes ultrasonores provoquent des cycles de dilatation et de compression des cellules pour former des bulles. Les bulles microscopiques surdéveloppées près de la paroi cellulaire, entraîne une augmentation de la température et de la pression, ce qui provoque l'éclatement des bulles et endommage les parois cellulaires (Wang et Weller, 2006).

II. Méthodologie des plans d'expériences

II.1. Définition

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : $y = f(x_i)$. Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (Goupy, 2006).

II.2. Types de plans d'expériences

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur (Goupy, 2006) :

- Plans factoriels complets à deux niveaux ;
- Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux ;
- Autres plans à deux niveaux (les plans de Koshal, les plans de Rechtschaffner, les plans de Plackett et Burman, les tables de Taguchi, les plans sursaturés) ;
- Plans à plusieurs niveaux (plans complets à trois niveaux, carrés latins, carrés gréco-latins, carrés de Youden, plans à niveaux mixtes) ;
- Plans pour surfaces de réponse (les plans composites, les plans de Doehlert, les plans de Box-Behnken, les plans hybrides, les plans de Mozzo) ;

- Plans de mélanges, plans booléens, plans optimaux, et plans pour simulations numériques.

II.3. Principaux avantages des plans d'expériences

Les plans d'expériences utilisés présentent les principaux avantages suivants :

- Diminution du nombre d'essais.
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs.
- Détection des interactions entre facteurs.
- Modélisation des réponses étudiées.
- Une précision optimum des résultats.
- La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié (**Gillon, 1997**).

II.4. Logiciels de plans d'expériences

La construction des plans d'expériences est souvent facile et il suffit de choisir parmi les matrices déjà publiées. Mais, il importe que le plan soit adapté à l'étude et non pas l'inverse. Il y a donc des situations où il faut absolument tailler un plan sur mesure. Les logiciels de plan d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans sur mesures (**Goupy, 2006**) (**Tableau III**).

Tableau III : Principaux logiciels de plans d'expériences (**Goupy, 2006**).

JMP	http://www.jmpdiscovery.com
Minitab	http://www.minitab.fr
Statistica	http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica
Statgraphics	http://www.sigmaplus.fr
Unscrambler	http://www.camo.no
Pirouette	http://www.infometrix.com
Modde	http://www.umetrics.com



MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel et méthodes :

I.1. Préparation du matériel végétal

La plante entière *Matricaria pubescens*, a été récoltée d'une manière aléatoire en Mars 2022 à la Wilaya de Bechar (Algérie). Après la récolte, la plante a été nettoyée des poussières et de toutes autres impuretés, puis séchée à une température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière. Le matériel végétal séché a été broyé puis tamisé. Les fractions dont le diamètre est inférieur à 250µm ont été retenues pour l'extraction.

I.2. Optimisation des conditions et de la technique d'extraction des composés phénoliques

I.2.1. Etude préliminaire

Dans ce travail une étude préliminaire a été réalisée préalablement afin d'étudier l'effet de la durée, de la nature et de la concentration du solvant, du rapport solide/liquide et la technique d'extraction sur la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et sur l'activité anti radicalaire vis-à-vis du DPPH de la plante *Matricaria pubescens*.

Les résultats de cette étude préliminaire ont permis de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des composés phénoliques pour chaque variable indépendante.

Le tableau suivant représente les différents paramètres testés dans l'étude préliminaire et les résultats qui ont donné le meilleur rendement en polyphénols et en flavonoïdes obtenus par macération et par ultrasons (**Tableau IV**).

Tableau IV : Résumé des paramètres testés lors de l'étude préliminaire et les conditions d'extraction optimales sélectionnées.

Paramètres testés	Paramètre sélectionné	
	Ultrasons	Macération
Nature du solvant : ED, Acét50%, Méth 50%, Eth 50%	Acétone 50%	Acétone 50%
Concentration du solvant : Acétone à 30, 50, 70, 90%	Acétone 50%	Acétone 50%
Durée d'extraction par ultrasons : 10, 20, 30, 40min.	30min	
Durée d'extraction par macération : 60, 90, 120, 150min.		90min
Rapport solide/liquide : 0.05, 0,1, 0.2, 0.4/ g/20mL	0,05/20 g/ml	0,05/20 g/ml

I.2.2. Application du plan d'expérience

L'optimisation de la méthode d'extraction a été réalisée en employant le plan de Box-Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de trois variables indépendantes : la concentration du solvant (%), la durée (min), et le ratio solide/liquide (g/ml) qui sont désignés par X1, X2 et X3, respectivement.

Les études préliminaires effectuées, ont permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans les tableaux (V) et (VI).

Tableau V : Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons.

Variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
X1 : Solvant (%)	30	50	70
X2 : Temps (min)	20	30	40
X3 : Ratio Solide/liquide (g/20ml)	0,05/20	0,075/20	0,1/20

Tableau VI : Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant l'extraction assistée par macération.

Variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
X1 : Solvant (%)	30	50	70
X2 : Temps (min)	60	90	1200
X3 : Ratio Solide/liquide (g/20mL)	0,01/20	0,055/20	0,1/20

Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser trois réponses : la teneur en composés phénoliques (TCP), la teneur en flavonoïdes (TFV) et l'activité antioxydante évaluée par le test d'inhibition du radical DPPH.

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

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} x_i x_j + E \dots \dots \dots (\text{Equation 1})$$

Où : y représente la réponse étudiée (dans notre cas, y représente TCP, TF et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH); β_0 est un coefficient constant; β_i , β_{ii} et β_{ij} sont des coefficients des limites linéaires, quadratiques et interactives, respectivement, et le x_i et x_j représentent les variables indépendantes codées et E représente l'erreur expérimentale.

I.3. Détermination de la teneur en antioxydants

Les extraits obtenus ont été utilisés pour doser les CP, FV, et déterminer l'activité DPPH.

I.3.1. Dosage des composés phénoliques

- **Principe**

Le principe de dosage des composés phénoliques est basé sur la réduction en milieu alcalin de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{28}), lors de l'oxydation des polyphénols. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Kähkönen et al. (1999)**. Un volume de 0,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 100 μ L d'extrait. Après 3 minutes, 0,4 mL de la solution de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés. Après 1 heure d'incubation, l'absorbance est mesurée à 740 nm. La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en gramme équivalent acide gallique (EAG) par 100 g de matière sèche, est déterminée en se référant à la droite d'étalonnage (Annexe).

I.3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres avec l'aluminium sous forme d'ions Al^{+3} après décomposition de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les complexes formés sont responsables de l'absorption de la lumière dans le visible (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

- **Mode opératoire**

Les teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus sont déterminées par la méthode de **Lamaison et Carnet, (1990)**. Une quantité de 0,5mL de chaque extrait a été ajoutée à un volume égal du chlorure d'aluminium (2%). L'absorbance a été lue à 430nm après 20 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent quercétine (EQ) par 100g de matière sèche à partir de la droite d'étalonnage (Annexe).

I.4. Activité « scavenger » du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits de *Matricaria pubescens* a été déterminée en utilisant un test à savoir : l'activité « scavenger » du radical DPPH.

- **Principe**

Un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH· (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) de coloration violette (forme oxydée) pour le réduire en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picryl hydrazine) de coloration jaune-verte (**Molyneux, 2004**).

- **Mode opératoire**

L'effet « scavenger » du DPPH est déterminé par la méthode de **Kroyer et Hegedus (2001)**; 100uL d'extrait sont ajoutés à 900uL de DPPH (60µM). L'absorbance a été lue à 517nm après 1 heure d'incubation à l'obscurité. L'activité « scavenger » du DPPH est exprimé en gramme équivalent acide ascorbique (EAA) par 100 grammes de matière sèche à partir de la droite d'étalonnage (Annexe).

I.5. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec l'application ANOVA univariée (test Tukey-Kramer, logiciel JMP7) et la comparaison des résultats est prise à la probabilité $P < 0,05$. Toutes les données représentent la moyenne de trois essais \pm écart type.

Le logiciel JMP (Version 14, SAS) est utilisé pour construire le plan d'expérience de Box-Behnken pour l'analyse de tous les résultats.

A decorative horizontal scroll-like border with rounded ends and a slight shadow effect, containing the section header text.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

II. Résultats et discussion

La présente étude a été consacrée à l'optimisation de la technique des conditions d'extraction des poly phénols de *Matricaria pubescens* par macération et ultrasons, par la méthodologie de surface de réponse.

II.1. Application du plan d'expérience

En se basant sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante (concentration du solvant (X1), temps d'extraction (X2), et le rapport solide /liquide (X3)) influençant les réponses étudiées (teneur en polyphénols et en flavonoïdes et le test d'inhibition du DPPH) ont été introduits dans le logiciel JMP en utilisant le plan Box-Behnken.

II.2.Extraction assistée par ultrasons

Beaucoup de paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols, comme la méthode d'extraction, la nature et la concentration du solvant, la température et le temps d'extraction.

Les résultats de la détermination des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes et de l'activité anti radicalaire (DPPH) sont présentés dans le tableau (VII).

L'analyse des résultats obtenus, suite à l'extraction assistée par ultrasons, a révélé que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, et les résultats de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH, ont présentés des différences selon les paramètres d'extraction testés. Les teneurs en composés phénoliques obtenues varient de 2,8 à 6,87g EAG/100g MS. Celles des flavonoïdes varient entre 0,18 et 0,55g EQ/100g MS. Concernant l'activité antiradicalaire (DPPH), les valeurs obtenues sont comprises entre 0,19 et 0,42g EAA/100g MS.

Tableau VII : Valeurs expérimentales et prédites des TCP, TF et de l'activité DPPH de *Matricaria pubescens* obtenus avec la technique d'extraction par ultrasons, du plan Box-Behnken.

Solvant (%)	Durée (min)	Rapport S/L (g/20mL)	Valeurs réelles TCP(gEAG /100g MS)	Valeurs réelles TF(gEQ /100gMS)	Valeurs réelles DPPH (gEAA /100gMS)	Valeurs prédites CPgEGA /100gMS)	Valeurs prédites TF (gEQ /100gMS)	Valeurs prédites DPPH (gEAA /100gMS)	
X1	X2	X3							
1	30	40	0,075	3,46±0,04	0,26±0,01	0,27±0,0002	3,89	0,25	0,34
2	50	40	0,05	5,4±0,06	0,30±0,04	0,42±0,0003	5,8	0,29	1,62
3	50	30	0,075	4,88±0,05	0,33±0,01	0,27±0,0003	4,88	0,33	0,86
4	50	30	0,075	4,88±0,05	0,33±0,01	0,27±0,0003	4,88	0,33	0,86
5	70	30	0,05	3,73±0,38	0,38±0,01	0,42±0,0003	3,57	0,39	0,7
6	30	20	0,075	4,92±0,17	0,26±0,02	0,27±0,0003	5	0,26	0,22
7	30	30	0,1	2,81±0,23	0,18±0,01	0,2±0,0001	2,72	0,17	-0,14
8	70	30	0,1	4,54±0,06	0,55±0,02	0,19±0,0005	5,23	0,52	-0,13
9	50	30	0,075	4,88±0,05	0,33±0,01	0,27±0,0003	4,88	0,33	0,86
10	70	40	0,075	4,27±0,08	0,53±0,01	0,27±0,0007	5,69	0,53	0,18
11	50	20	0,05	3,66±0,15	0,32±0,01	0,42±0,0005	3,8	0,3	1,58
12	50	20	0,1	3,91±0,27	0,32±0,004	0,2±0,0007	3,76	0,33	0,82
13	50	40	0,1	3,79±0,04	0,35±0,01	0,19±0,0006	3,64	0,36	0,71
14	30	30	0,05	6,87±1,11	0,26±0,05	0,42±0,0005	6,59	0,2	0,7
15	70	20	0,075	2,8±0,17	0,5±0,02	0,27±0,0006	2,7	0,51	0,39

II.2.1. Composés phénoliques totaux

Les teneurs en polyphénols totaux obtenues dans les différentes conditions expérimentales, à partir des 15 essais sont illustrées dans le tableau VI.

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique du plan box-Behnken qui régit l'extraction des composés phénoliques totaux (CP) est représentée par l'équation (I.1) :

$$Y_{CPT} = 4,8778 - 0,3396X_1 + 0,2039X_2 - 0,5769X_3 + 0,7294X_1X_2 + 1,2168X_1X_3 - 0,4669X_2X_3 - 0,3565X_1^2 - 0,6578X_2^2 - 0,0311X_3^2 \dots \text{ (Equation I.1).}$$

b. Effet des facteurs

L'analyse des résultats obtenus a montré que les paramètres testés ont présentés différents effets sur les teneurs en composés phénoliques (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Source	Estimation	Erreur	Rapport F	Prob> F
Constante	4,8778	0,2266	10,667	0,009*
Linéaire				
Solvant % : X1	-0,3396	0,1388	5,987	0,0582
Durée : X2	0,2039	0,1388	2,1581	0,2018
S/L : X3	-0,5769	0,1388	17,2806	0,0088*
Quadratique				
X1* X1	0,3565	0,2043	3,046	0,1414
X2* X2	-0,6578	0,2043	10,369	0,0235*
X3* X3	-0,0311	0,2043	0,0231	0,8851
Interaction				
X1* X2	0,7294	0,1963	13,8116	0,0138*
X1* X3	1,2168	0,1963	38,4405	0,0016*
X2* X3	-0,4669	0,1963	5,6585	0,0633

✓ **Effet linéaire**

Le facteur qui influence d'une manière très significative sur l'extraction des composés phénoliques par ultrasons est le rapport solide/liquide (X3) avec une probabilité P= 0,008, et F-ratio =17,2806.

✓ **Effet quadratique**

Les effets quadratiques sont pas significatifs seul l'effet (X2*X2) qui est significatif avec une probabilité P=0,0235.

✓ **Effet d'interaction**

Les deux interactions (X1*X2) et (X1*X3) sont significative à des valeurs de P de 0,0138 et 0,0016 respectivement. L'interaction (X2*X3) n'est pas significative.

✓ **Analyse de la surface de réponse (ASR)**

Pour fournir une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D a été construit (**Figure 6**) à l'aide de l'équation

(I.1). Les graphiques ont été générés en traçant la réponse en utilisant l'axe z contre deux variables indépendantes, tout en gardant l'autre variable indépendante à un niveau fixé.

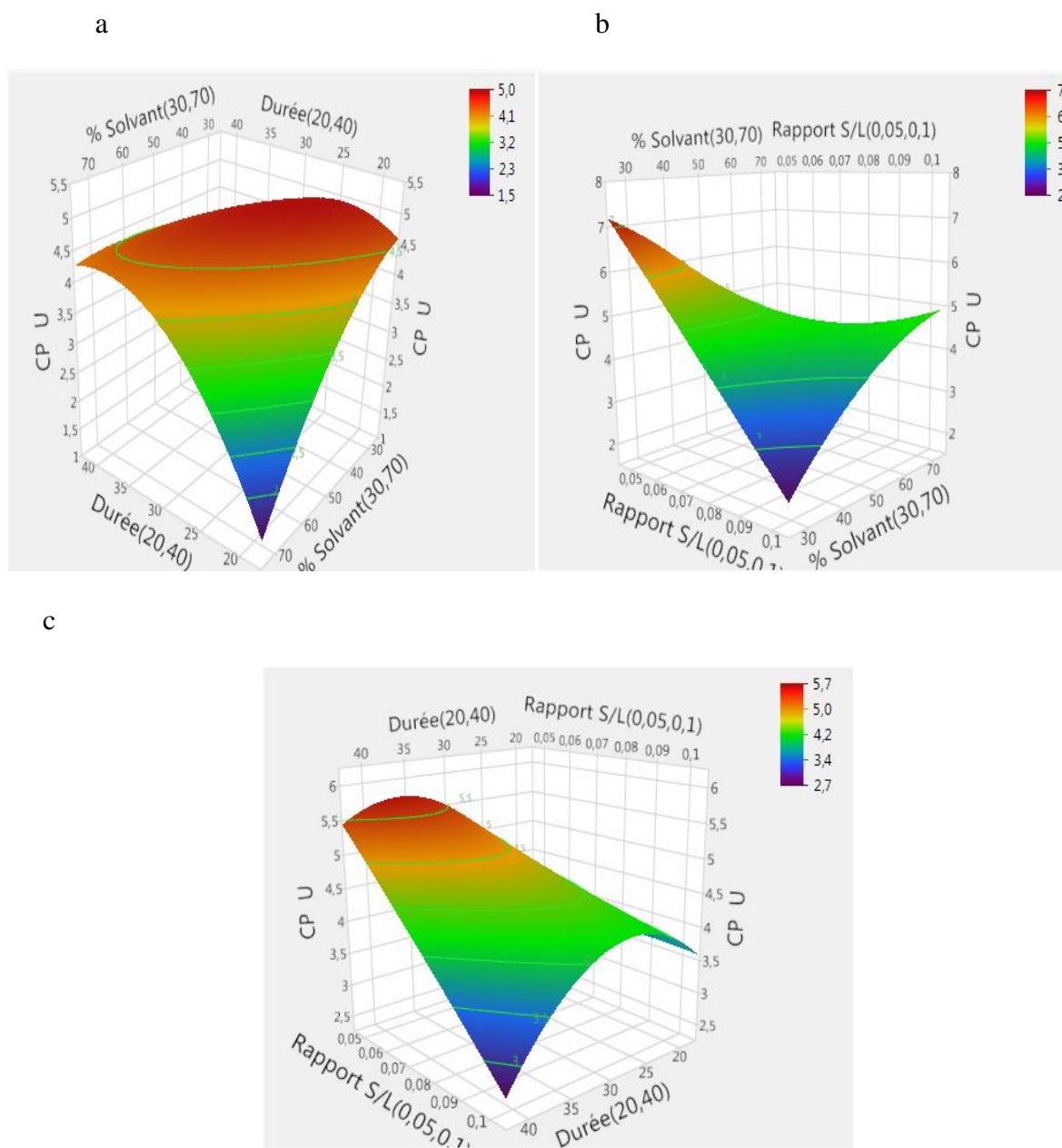


Figure 06 :Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en composés phénoliques.

(a) : durée/ %solvant, (b) : % solvant / rapport S/L, (c) : durée / rapport S/L.

Les résultats illustrés dans la figure 06. (a) montrent que la teneur en CPT augmente en diminuant la concentration du solvant jusqu'à une concentration de 70% et en augmentant

La durée d'extraction et peuvent elles diminuent en prolongeant le temps au de-là de 35 min. Cela peut être dû à la formation des substances chimiques sonores. Ces composants peuvent avoir des effets oxydatifs en produisant des radicaux libres qui peuvent détruire les doubles liaisons conjuguées de certains composés phénoliques (**Zhang et al., 2010**)

Concernant les résultats de l'interaction de la concentration du solvant avec le rapport S/L sur la teneur en composés phénoliques, cette étude révèle que l'augmentation de la concentration du solvant de 50 à 70% et une diminution du rapport solide/liquide jusqu'à 0,05 marquent une augmentation du rendement d'extraction des composés phénoliques (**Figure 6.2 (b)**). Le même résultat a été trouvé par **Mahmoud et al. (2014)**.

Comme le montre la figure VI.2. (c), les teneurs en composés phénoliques extraits augmentent avec l'augmentation de la durée d'extraction et la diminution du rapport solide/liquide de 0,05 à 0,1. **Ghafoor et Choi, (2009)** ont également obtenu des résultats similaires, ceci pourrait être expliqué par le fait que l'extraction par ultrasons brise les cellules végétales pour simplifier la pénétration du solvant dans les cellules (**Bilgin et Shin, 2013**). Par conséquent, le temps d'extraction est important pour l'extraction des composés phénoliques dans la méthode d'extraction assistée par ultrasons. Un temps d'extraction plus long entraîne une augmentation dans la teneur en composés phénoliques totaux contenu extrait (**Liu et al., 2014**).

c. Validation du model

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées. Le coefficient de corrélation R^2 exprime l'efficacité d'ajustement globale (**Chan et al., 2009**).

Les résultats de l'effet des facteurs testés sur la teneur en composés phénoliques sont représentés par les coefficients de régression dans le tableau (X).

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs étudiés sur les teneurs en composés phénoliques indiquent que le modèle choisi est satisfaisant ($P=0,009 < 0,05$) avec un coefficient de régression R^2 de 0,95, ce qui signifie qu'uniquement 0,05 des variations ne sont pas expliquées par le modèle étudiée.

La valeur élevée de R^2 ajusté à 0,86 trouvée dans cette étude avec une probabilité d'ajustement non significative ($P=0,12 > 0,05$). Ce qui confirme la haute significativité du modèle. La valeur du R^2 ajusté (valeur du R^2 après élimination des coefficients inutiles du

modèle) sera très inférieure à celle de R² si le modèle contient beaucoup de termes inutiles (non significatifs) (El-Adawi et al., 2011)

Tableau IX : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
Modèle	14,7916	10,667	0,009*	9	4,8778	0,2266
Défaut d'ajustement	0,7704		0,009*	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Totale	0,7704			5		
Totale corrigé	15,5620			14		
R ²	0,9505					
R ² Adj.	0,8614					
RMSE	0,3925					

II.2.2. Flavonoïdes

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique postulé pour la teneur en flavonoïdes est représenté par la relation suivante :

$$Y_{\text{flavonoïde}} = -0,3317 + 0,1236X_1 + 0,0044X_2 + 0,0159X_3 + 0,0287X_1X_2 + 0,0611X_1X_3 + 0,0121X_2X_3 + 0,0402X_1^2 + 0,0178X_2^2 - 0,0287X_3^2 \dots \text{(Equation I.2).}$$

b. Effet des facteurs

✓ Effet linéaire

L'équation I.2 montre que les paramètres linéaires, la concentration du solvant (X₁) est hautement significatifs à (P<0,0001) et que le rapport solide/ liquide (X₃) est significatifs à (P=0,0018)

✓ Effet quadratique

Les trois effets quadratiques (X₁*X₁), (X₂*X₂) et (X₃*X₃) influencent d'une manière significatifs sur l'extraction des flavonoïdes avec P=0,0001, P=0,0059 et P=0,0007, respectivement.

✓ **Effet d'interaction**

Les deux interactions significatives sont (X1*X3) (X2*X3) avec (P<0,0001) et (P=0,0225).

Tableau X : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré

Source	Estimation	Erreur standard	Rapport F	Prob> F
Constante	0,3317	0,0043	303,6637	<0,0001*
Linéaire				
Solvant % : X1	0,1236	0,0026	2213,806	<0,0001*
Durée : X2	0,0044	0,0026	2,8406	0,1527
Rapport S/L : X3	0,0159	0,0026	36,83	0,0018*
Quadratique				
X1* X1	0,0402	0,0039	108,0212	0,0001*
X2* X2	0,0178	0,0039	21,0963	0,0059*
X3* X3	-0,0287	0,0039	54,942	0,0007*
Interaction				
X1* X2	0,0287	0,0037	3,0038	0,1436
X1* X3	0,0611	0,0037	270,6283	<0,0001*
X2* X3	0,0121	0,0037	10,6099	0,0225*

✓ **Analyse de surface de réponse (ASR)**

Les graphiques de l'interaction entre les facteurs testés construits à l'aide de l'équation (I.2), ont été générés en traçant la réponse en utilisant l'axe z contre deux variables indépendantes, tout en gardant l'autre variable indépendante à un niveau fixé (**Figure 07**).

Les résultats obtenus montrent que la teneur en flavonoïdes augmente en augmentant la durée d'extraction et la concentration du solvant jusqu'à une concentration de 70%. Les mêmes résultats ont été trouvés par **Chang et al. (2015)**.

Les résultats de l'interaction rapport S/L avec le % du solvant indiquent qu'une augmentation de la concentration du solvant de 30 à 70% améliore le rendement d'extraction des flavonoïdes, et une augmentation du rapport solide/liquide jusqu'à 0,05 marque une augmentation de la réponse.

Les teneurs en flavonoïdes extraites par les ultrasons augmentent avec le temps d'extraction. Une augmentation du rapport solide/liquide de 0,05 à 0,1 améliore le rendement d'extraction des flavonoïdes.

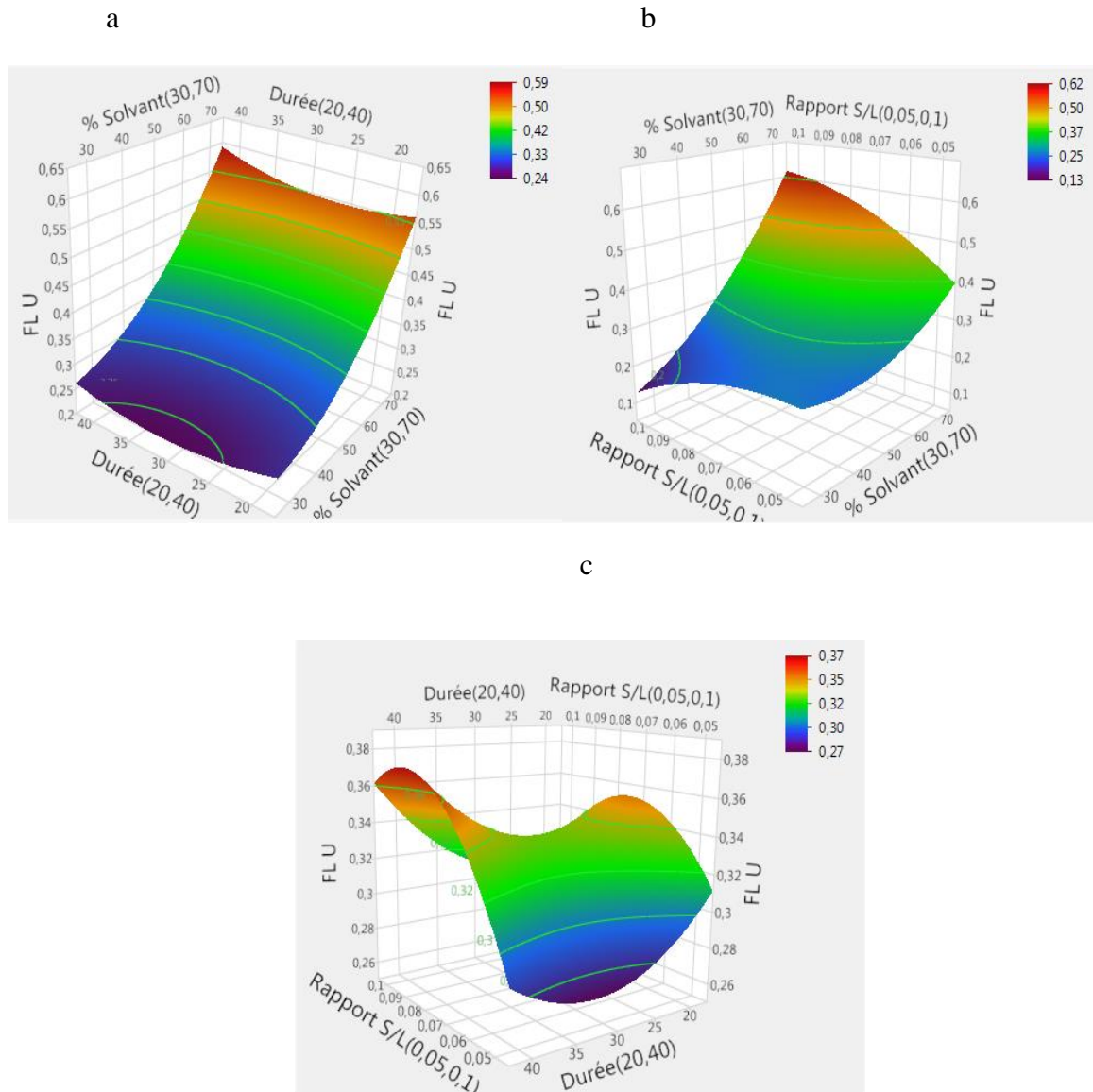


Figure 07: Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en flavonoïdes

(a) :% solvant/durée, (b) : % solvant / rapport S/L, (c) : durée /rapport S/L.

c. Validation du model

Les résultats de l'effet des facteurs sur la teneur en flavonoïdes sont représentés par les coefficients de régression dans le tableau (XI).

D'après les résultats obtenus le modèle choisi pour les teneurs en flavonoïdes est satisfaisant ($P < 0,0001$) avec un coefficient de régression $R^2 = 0,94$, une valeur $R^2_{\text{ajusté}} = 0,88$ et une probabilité de manque d'ajustement non significative ($P = 3,30$).

Tableau XI : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes.

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
Modèle	0,1509	303,6637	<0,0001*	9	0,3317	0,0043
Défaut d'ajustement	0,0002		<0,0001*	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Totale	0,0002			5		
Totale corrigé	0,1512			14		
R ²	0,9982					
R ² Adj.	0,9949					
RMSE	0,0074					

II.2.3. DPPH

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique approprié à l'activité antioxydante testée dans cette étude relative aux 15 essais de l'extraction assistée aux ultrasons, est déterminé par la relation suivante :

$$Y_{DPPH} = 0,2684 + 0,0001X_1 - 0,0002X_2 - 0,1116X_3 + 0,0002X_1X_2 + 0,0002X_1X_3 + 0,0002X_2X_3 + 0,0003X_1^2 - 0,0001X_2^2 + 0,0383X_3^2 \dots \text{(Equation I.3)}$$

b. Effet des facteurs

L'ensemble des interactions étudiées sur l'activité antioxydante de *M. pubescens* sont présentées dans le tableau XII.

✓ Effet linéaire

Le seul paramètre linéaire qui a une influence hautement significative sur l'activité antioxydante est le rapport S/L (X3) (P<0,0001).

✓ Effet quadratiques

L'étude a révélé qu'il y'a qu'un seul effet quadratique (X2*X3), qui a un effet hautement significatif (P<0,0001) sur l'activité antioxydante.

✓ Effet d'interaction

Tous les effets d'interaction sur l'activité anti radicalaire de cette étude ne sont pas significatifs.

Tableau XII : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Source	Estimation	Erreur standard	Rapport F	Prob> F
Constante	0,2684	0,0003	32916,27	<0,0001*
Linéaire				
Solvant % : X1	0,0001	0,0002	0,4397	0,5366
Durée : X2	-0,0002	0,0002	0,7815	0,4172
Rapport S/L : X3	-0,1116	0,0002	280802,5	<0,0001*
Quadratique				
X1* X1	0,0003	0,0003	1,2688	0,3111
X2* X2	-0,0001	0,0003	0,2029	0,6713
X3* X3	0,0383	0,0003	15282,57	<0,0001*
Interaction				
X1* X2	0,0002	0,0003	0,2995	0,6077
X1* X3	0,0002	0,0003	0,2581	0,6331
X2* X3	0,0002	0,0003	0,3436	0,5832

✓ **Analyse de surface de réponse (ASR)**

Le diagramme de surface de réponse 3Da été construit (figure 8) à l'aide de l'équation (I.3).

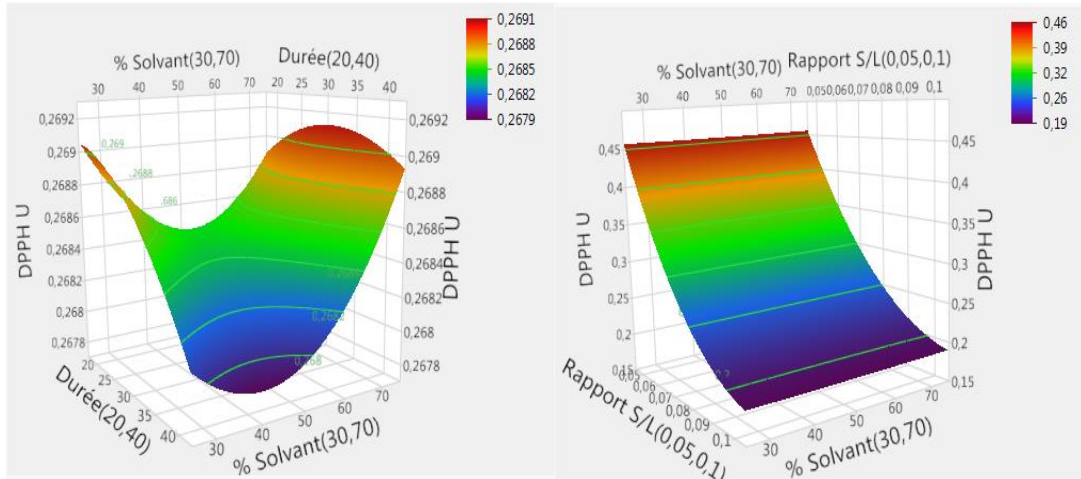
Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante augmente en diminuant la durée d'extraction et en augmentant la concentration du solvant jusqu'à une concentration de 70%.Ceci pourrait s'expliquer par la dégradation thermique des composés antioxydants et phénoliques (Sahar et al., 2019). Le temps et la température d'extraction les plus élevés pourraient conduire à l'hydroxylation ou à la dégradation des antioxydants des plantes (Chen et al., 2012).

Les résultats de l'interaction de la durée avec le % du solvant d'extraction ont révélé que la diminution du rapport solide/liquide de 0,05 à 0,1 marque une augmentation de la réponse.

Concernant l'interaction du rapport S/L avec la durée, les données montrent qu'une augmentation du rapport solide/liquide marque une diminution de l'activité

antioxydante, par conséquent, les ultrasons ont provoqué une augmentation de l'effet inhibiteur des radicaux libres de l'extrait (Sahar *et al.*, 2019).

ab



c

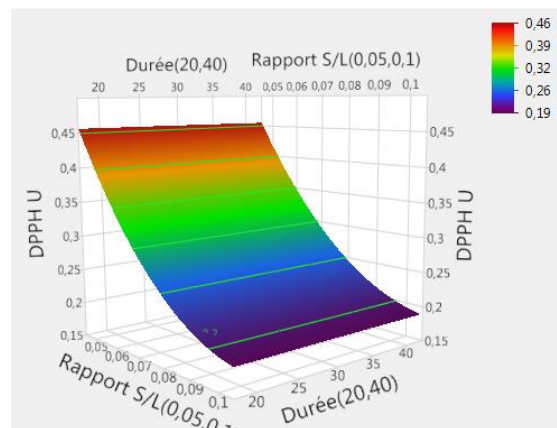


Figure 08 :Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité antioxydante.

(a) : solvant / durée, (b) : solvant / rapport S/L, (c) : durée /rapport S/L.

c. Validation du model

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante sont résumés dans le tableau (XIII).

Tableau XIII: Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante .

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
modèle	0,1051	32916,27	<0,0001*	9	0,2684	0,0003
Défaut d'ajustement	1,77E-06		<0,0001*	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Totale	1,77E-06			5		
Totale corrigé	0,1051			14		
R ²	0,99998					
R ² Adj.	0,99995					
R M S E	0,0006					

Le tableau (XIII) indique que le modèle choisi pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante des extraits est satisfaisant ($P < 0,0001$) avec un R^2 de 0,98, une valeur de R^2 ajusté de 0,97 et une probabilité de manque d'ajustement non significative ($P = 0,051$).

En résumé, l'analyse globale des résultats a révélé que le facteur le plus important pour l'extraction par ultrasons est le rapport solide/liquide avec des effets linéaires hautement significatifs sur les deux réponses composés phénoliques et l'activité antiradicalaire (DPPH), et a un effet significatif sur la teneur en flavonoïdes, aussi il a un effet quadratique hautement significatifs sur l'activité antiradicalaire (DPPH) et significatif sur les flavonoïdes. La durée d'extraction a une influence quadratique qui est hautement significatif uniquement sur l'activité antiradicalaire (DPPH) et à une influence quadratique qui est significatif pour les deux réponses composés phénolique et flavonoïdes. La concentration du solvant n'influence pas significativement l'activité antioxydante testée et la teneur en composé phénoliques mais influence quadratiquement sur les teneurs en flavonoïdes. Les interactions des différents facteurs ne sont pas significatives sur l'activité antioxydante sauf les deux interactions entre la concentration de solvant avec le rapport S/L qui est significatif pour les deux réponses composés phénoliques et flavonoïdes.

II.3. Extraction par macération

Le taux d'extraction et les activités antioxydantes peuvent être affecté par différents paramètres d'extraction tels que : la température d'extraction, le temps de macération, le volume ainsi que la nature du solvant (Nack et Shahidi, 2004 ; Hayouni et al., 2007).

Les résultats de dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes de *M. pubescens* obtenus par macération et ceux de leur activité antiradicalaire (DPPH) sont exprimés dans le tableau (XIV).

Les résultats de la présente étude montrent que les teneurs en composé phénoliques et en flavonoïdes ont été affectées par les différents paramètres testés. Les teneurs en composés phénoliques sont présentées par des valeurs allant 2,18 à 7,74g EAG/100g MS. Celles des flavonoïdes varient entre 0,37 et 0,99g EQ/100g MS. Alors que celle de l'activité antiradicalaire (DPPH) les valeurs obtenus varient entre 0,19 et 1,90g EAA/100g MS. Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (la concentration du solvant, le temps et le rapport S/L d'extraction).

Tableau XIV : Valeurs expérimentales et prédites des TCP, TF et de l'activité DPPH de *Matricaria pubescens* obtenus avec la technique d'extraction par macération, du plan Box-Behnken.

	Solvant (%)	Durée (min)	S/L (g/mL)	Valeurs réelles TCP (gEAG /100g MS)	Valeurs réelles TF (gEQ /100gMS)	Valeurs réelles DPPH (gEAA /100gMS)	Valeurs prédite TCP (gEGA /100gMS)	Valeurs prédite TF (gEQ /100gMS)	Valeurs prédite DPPH (gEAA /100gMS)
	X1	X2	X3						
1	30	60	0,055	2,97±0,21	0,37±0,02	0,35±0,002	2,65	0,35	0,34
2	30	90	0,01	4,36±1,07	0,63±0,04	1,88±0,002	4,43	0,64	1,88
3	50	120	0,01	5,3±0,65	0,59±0,07	1,9±0,003	5,25	0,58	1,89
4	70	120	0,055	2,3±0,07	0,52±0,01	0,34±0,0002	2,73	0,55	0,35
5	50	90	0,055	2,8±0,19	0,50±0,01	0,35±0,0006	2,8	0,5	0,35
6	30	90	0,1	2,7±0,08	0,41±0,02	0,2±0,0004	2,7	0,49	0,2
7	50	90	0,055	2,8±0,19	0,50±0,01	0,35±0,0006	2,8	0,5	0,35
8	70	60	0,055	7,74±0,12	0,60±0,05	0,35±0,0005	7,6	0,61	0,35
9	50	60	0,01	5,3±1,8	0,58±0,07	1,89±0,0056	5,96	0,58	1,89
10	50	120	0,1	2,18±0,1	0,39±0,01	0,19±0,0003	1,83	0,3	0,19
11	70	90	0,01	6,92±1,68	0,99±0,18	1,90±0,0059	6,92	0,97	1,9
12	30	120	0,055	3,95±0,3	0,4±0,03	0,35±0,0008	4,26	0,36	0,35
13	50	60	0,1	4,19±0,08	0,4±0,02	0,19±0,0069	4,38	0,35	0,19
14	70	90	0,1	3,45±0,04	0,62±0,01	0,19±0,0002	3,64	0,61	0,19
15	50	90	0,055	2,8±0,19	0,50±0,01	0,35±0,0006	2,8	0,5	0,35

II.3.1. Composés phénoliques totaux

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique du plan Box-Behnken qui régit l'extraction des composés phénoliques est représenté par l'équation (I.4) :

$$Y_{TCP} = 2,796 + 0,8046X_1 + -0,809X_2 + -1,1712X_3 + -1,6038X_1X_2 - 0,4533X_1X_3 - -0,5035X_2X_3 - 0,7781X_1^2 + 0,6626X_2^2 + 0,7823X_3^2 \dots\dots\dots \text{(Equation I.4).}$$

b. Effet des facteurs

Les résultats des effets des facteurs testés sur l'extraction des composés phénolique de *M. pubescens* par macération sont résumés dans le tableau (IX.1).

✓ Effet linéaire

Les trois facteurs influencent d'une manière significative l'extraction des composés phénoliques par macération sont le % du solvant (X1) avec une probabilité P=0,0027), et rapport F=30.3282, suivi par la durée d'extraction (X2) avec une probabilité P=0,0026 et rapport F=30,657, puis par le rapport S/L (X3) avec P=0,0005, et rapport F= 64,2546.

✓ Effet quadratique

Les effets quadratiques constatés dans cette étude sont tous significatifs. Le % du solvant (X1) est significatif avec une probabilité de P=0,0153 et un rapport F de 13,0892. La durée d'extraction (X2) s'est montrée significative avec une probabilité P de 0,0274, et un rapport F de 9,4926. Concernant le rapport S/L (X3) le degré de signification est de 0,0149, avec un rapport F de 13,2314.

✓ Effet d'interaction

Les deux interactions (X1*X3) et (X2*X3) ne sont pas significatives. Seul l'interaction (X1*X2) qui est hautement significative avec une probabilité de (P=0.0006).

Tableau XV : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré

Source	Estimation	Erreur standard	Rapport F	Prob> F
Constante	2,796	0,2386	25,2572	0,0012*
Linéaire				
Solvant % : X1	0,8046	0,1461	30,3282	0,0027*
Durée : X2	-0,809	0,1461	30,657	0,0026*
S/L : X3	-1,1712	0,1461	64,2546	0,0005*
Quadratique				
X1* X1	0,7781	0,2151	13,0892	0,0153*
X2* X2	0,6626	0,2151	9,4926	0,0274*
X3* X3	0,7823	0,2151	13,2314	0,0149*
Interaction				
X1* X2	-1,6038	0,2066	60,2451	0,0006*
X1* X3	-0,4533	0,2066	4,8119	0,0797
X2* X3	-0,5035	0,2066	5,9368	0,0589

✓ **Analyse de surface de réponse (ASR)**

Pour fournir une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D a été construit (**Figure 9**) à l'aide de l'équation (I.4). Les graphiques ont été générés en traçant la réponse en utilisant l'axe z contre deux variables indépendantes, tout en gardant l'autre variable indépendante à un niveau fixé.

Les résultats de l'interaction du pourcentage du solvant avec la durée montrent que la teneur en composés phénoliques augmente avec la durée et diminue la concentration du solvant (**Figure 9 (a)**).

Les résultats de l'interaction rapport S/L avec le % du solvant montrent que les teneurs en composés phénoliques augmentent en diminuant la concentration du solvant et le rapport S/L, puis elles diminuent en prolongeant la concentration du solvant jusqu'au 30 puis elles reprennent à augmenter (**Figure 9 (b)**).

Les données de l'interaction du % du solvant avec le rapport S/L sur la teneur en composés phénoliques ont révélé que l'augmentation de la durée d'extraction de 90 à

120min avec la diminution du rapport S/L améliorent le rendement d'extraction des composés phénoliques. Une augmentation de rapport S/L dans la durée entre 60 et 90 min à marquer une diminution de la réponse. Le même résultat a été trouvé par **Khizar et al.(2009)**.

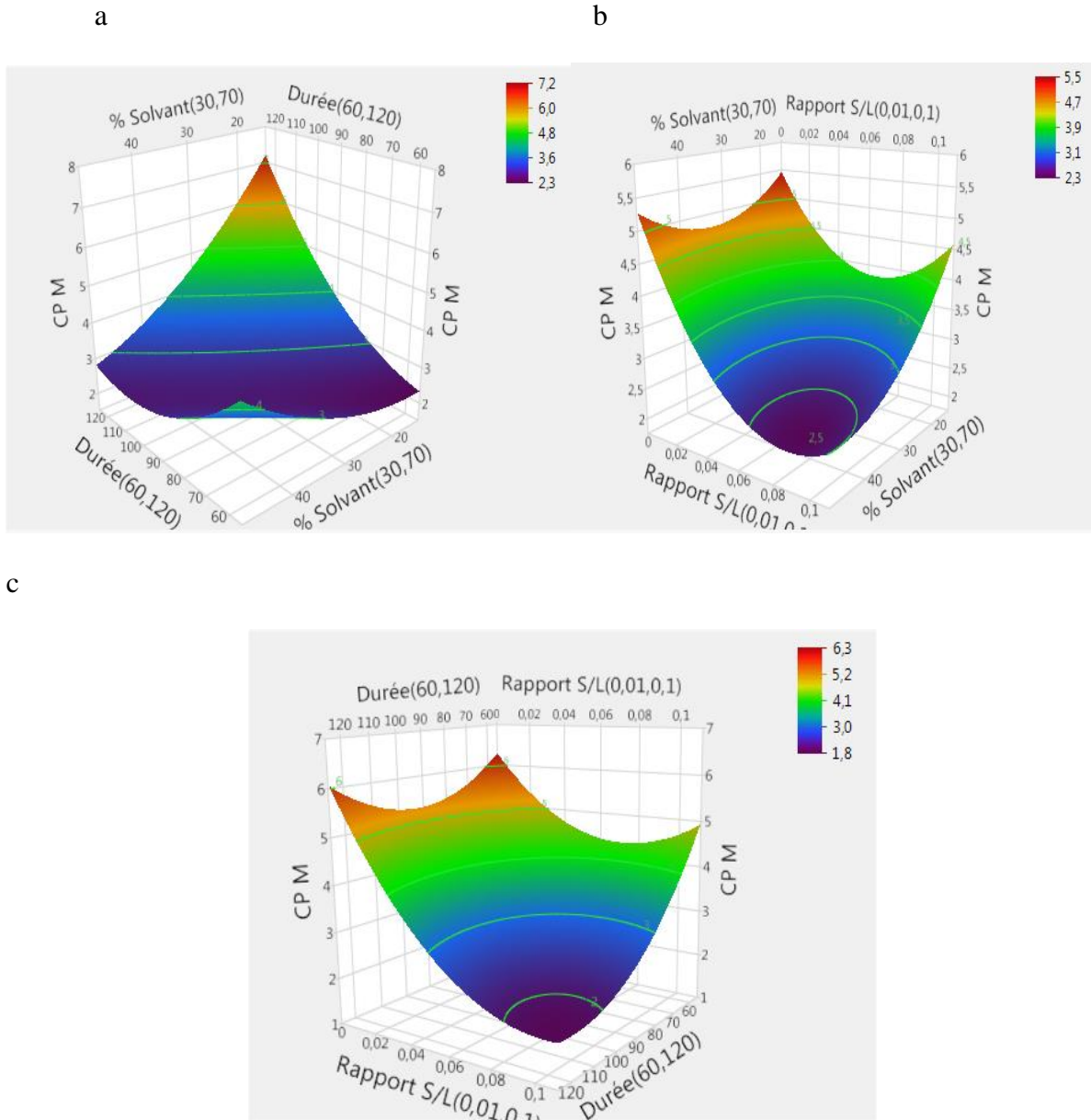


Figure 09 : Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en composés phénoliques.

(a) : % solvant/durée, (b) : % solvant /rapport S/L, (c) : durée/rapport S/L.

b. Validation du model

Les résultats de l'effet des facteurs d'extraction sur la teneur en composés phénoliques sont représentés par les coefficients de régression dans le tableau (XV).

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques indiquent que le modèle choisi est satisfaisant (P=0,0012) avec un coefficient de régression R² de 0,97, une valeur de R² ajustée de 0,94 et une probabilité d'ajustement significative (P= 0,0012).

Tableau XVI : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
Modèle	38,8218	25,2572	0,0012*	9	2,796	0,238596
Défaut d'ajustement	0,8539		0,0012	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Totale	0,8539			5		
Total corrigé	39,6757			14		
R ²	0,9785					
R ² Adj.	0,9397					
RMSE	0,4133					

II.3.2.Flavonoïdes

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique postulé pour la teneur en flavonoïdes est représenté par la relation suivante :

$$Y_{flavonoïde} = 0,5016 + 0,1154X_1 - 0,0086X_2 - 0,1213X_3 - 0,0264X_1X_2 - 0,0387X_1X_3 - 0,0018X_2X_3 + 0,0731X_1^2 - 0,1017X_2^2 + 0,0871X_3^2 \dots\dots\dots$$

(Equation I.5).

b. Effet des facteurs

Les interactions exercées sur les flavonoïdes de la plante étudiée sont présentées dans le tableau(XVII).

✓ Effet linéaire

Cette étude a montré que les deux paramètres linéaires, la concentration de solvant(X1) et le rapport s/l (X3) sont significatifs à (P<0.005), tandis que la durée d'extraction (X2) n'a pas montré aucun effet significatif sur l'extraction des flavonoïdes.

✓ **Effet quadratique**

Les trois effets quadratiques trouvés ($X1*X1$), ($X2*X2$) et ($X3*X3$) sont significatifs avec des $P=0,0372$, $0,0112$ et $0,0201$, respectivement.

✓ **Effet d'interaction**

Les trois interactions exercées sur les teneurs en flavonoïdes constatées dans ce cas ne sont pas significatives.

Tableau XVII : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Source	Estimation	Erreur standard	Rapport F	Prob> F
Constante	0,5016	0,0288	14,5611	0,0044*
Linéaire				
Solvant % : X1	0,1154	0,0176	42,8375	0,0012*
Durée : X2	-0,0086	0,0176	0,2384	0,646
S/L : X3	-0,1213	0,0176	47,3398	0,001*
Quadratique				
X1* X1	0,0731	0,0260	7,9396	0,0372*
X2* X2	-0,1017	0,0260	15,3649	0,0112*
X3* X3	0,0871	0,0260	11,2773	0,0201*
Interaction				
X1* X2	-0,0264	0,0249	1,1212	0,3381
X1* X3	-0,0387	0,0249	2,4117	0,1811
X2* X3	-0,0018	0,0249	0,0053	0,9448

✓ **Analyse de la surface de réponse (ASR)**

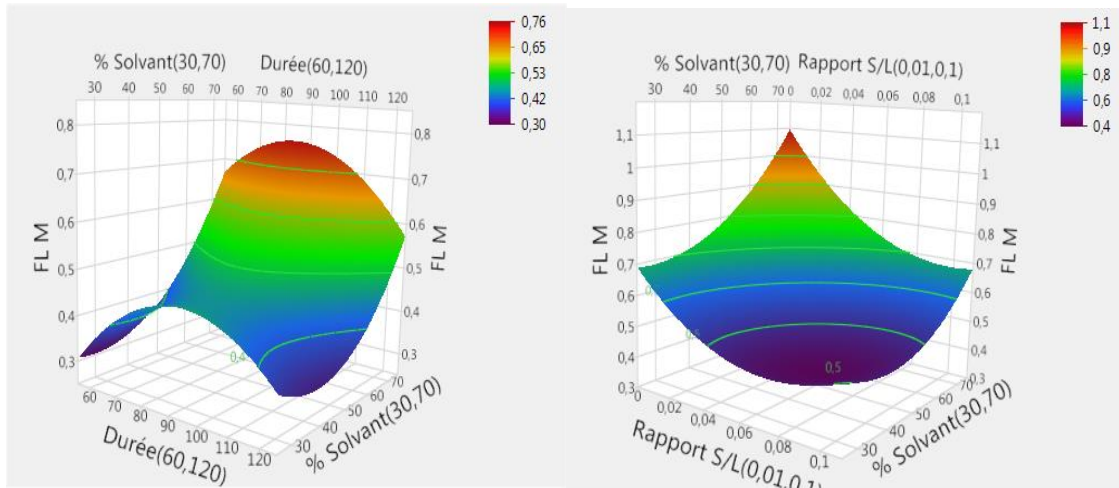
Pour fournir une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D a été construit (**Figure 10**) à l'aide de l'équation (I.5). Les graphiques ont été générés en traçant la réponse en utilisant l'axe z contre deux variables indépendantes, tout en gardant l'autre variable indépendante à un niveau fixé.

Les résultats illustrés dans la figure 10 (a) montrent que la teneur en flavonoïdes augmente avec la concentration du solvant sur une durée comprise entre 60 et 90min. Au-delà de 90min, une diminution de la teneur en flavonoïdes a été enregistrée.

Les résultats de la figure 10(b) révèlent que les teneurs en flavonoïdes augmentent en augmentant la concentration du solvant et diminuent avec le rapport S/L.

La figure 10 (c) indique que l'augmentation de la durée de 60 à 90min avec la diminution du rapport S/L améliorent le rendement d'extraction des flavonoïdes. Une augmentation du rapport S/L et une durée supérieure à 90min marquent une diminution de la réponse. Le même résultat a été enregistré par **Khizar et al. (2009)**.

ab



c

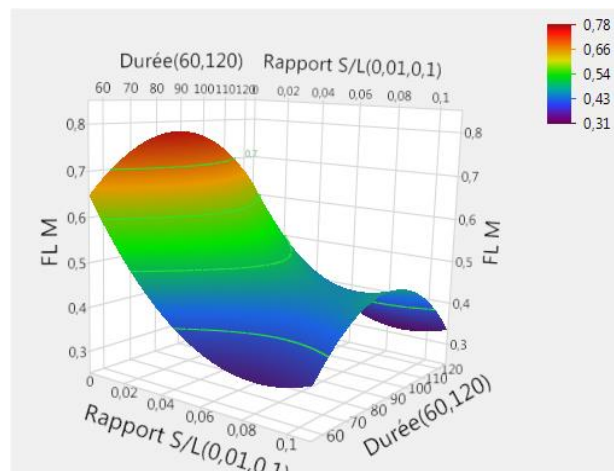


Figure 10 :Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en flavonoïdes.

(a) : % solvant/durée, (b) : % solvant / rapport S/L, (c) : durée /rapport S/L.

c. Validation du model

Les résultats de l'effet des facteurs sur la teneur en flavonoïdes sont représentés par les coefficients de régression dans le tableau (XVII).

D'après les résultats de la présente étude, le modèle choisi pour les teneurs en flavonoïdes est satisfaisant ($P=0,0044$) avec un coefficient de régression $R^2=0,96$, une valeur de R^2 ajusté $=0,89$ et une probabilité de manque d'ajustement significative ($P=0,044$).

Tableau XVIII : Analyse de la variance pour l’effet des facteurs sur les flavonoïdes.

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
modèle	0,3259	14,5611	0,0044*	9	0,5016	0,0288
Défaut d’ajustement	0,0124		0,0044	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Total	0,0124			5		
Totale corrigé	0,3383			14		
R ²	0,9632					
R ² Adj.	0,8971					
RMSE	0,0499					

II.3.3.DPPH

a. Modèle mathématique

Le modèle mathématique approprié aux activités antioxydantes relatives aux 15 essais de l’UAE est résumé dans la relation suivante :

$$Y_{Dpph} = 0,3478 + 0,0024X_1 - 0,0007X_2 - 0,8485 - 0,0014X_1X_2 + -0,0052X_1X_3 + -0,0002X_2X_3 - 4,73E - 05X_1^2 - 0,0008X_2^2 + 0,6934X_3^2 \dots \dots \dots \text{(Equation I.6)}$$

b. Effet des facteurs

L’ensemble des effets des facteurs testés sur l’activité antiradicalaire (DPPH) sont résumé dans le tableau (XIX).

✓ Effet linéaire

Le paramètres linéaire ; rapport S/L a une influence significative sur l’activité antioxydante.

✓ Effet quadratique

Les effets quadratiques (X1*X1), (X2*X2) ne sont pas significatifs sur l’activité antioxydante. Cependant l’effet (X3*X3) est hautement significatif avec probabilité (P<0,0001).

✓ Effet d’interaction

Les trois interactions ne sont pas significatives.

Tableau XIX : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Source		Erreur standard	Rapport F	Prob> F
Constante	0,3478	0,0033	26101,93	<0,0001*
Linéaire				
Solvant % : X1	0,0024	0,0020	1,6418	0,2563
Durée : X2	-0,0007	0,0020	0,1394	0,7242
S/L : X3	-0,8485	0,0020	179093,9	<0,0001*
Quadratique				
X1* X1	-4,73E-05	0,0030	0,0003	0,9878
X2* X2	-0,0008	0,0030	0,0753	0,7948
X3* X3	0,6934	0,0030	55194,93	<0,0001*
Interaction				
X1* X2	-0,0014	0,0028	0,2463	0,6408
X1* X3	-0,0052	0,0028	3,3214	0,128
X2* X3	-0,0002	0,0028	0,0071	0,9362

✓ **Analyse de la surface de réponse (ASR)**

Les résultats des différentes interactions exercées sur l'activité antioxydante testée sont tracés et présentés sur la figure 11.

Les résultats illustrés dans la figure 11. (a) montrent que l'activité antioxydante augmente en augmentant la concentration du solvant avec une durée minimale de 60min, alors si on augmente la durée elle diminue l'activité antioxydante.

Les résultats de la figure 11. (b) révèlent que l'activité antioxydante est maximale à un rapport S/L inférieure et avec différente concentration du solvant. Alors qu'elle diminue à chaque augmentation du rapport S/L.

Les résultats de la figure 11. (c) montrent que l'activité antioxydante est maximale à un faible rapport S/L avec différente durée d'extraction. Alors qu'elle diminue à chaque augmentation du rapport S/L.

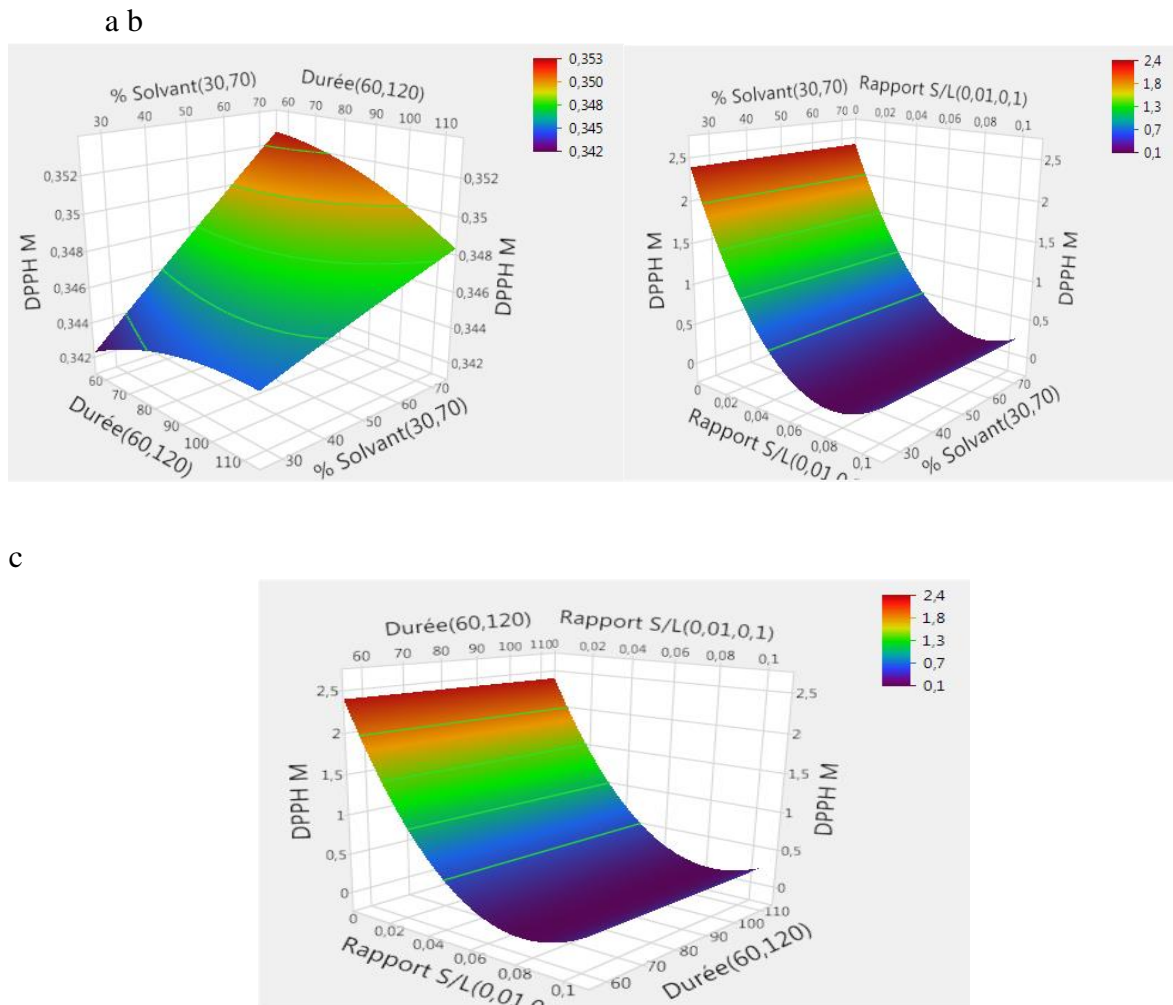


Figure 11 :Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité anti oxydante.

(a) : % solvant/durée, (b) : % solvant /rapport S/L, (c) : durée /rapport S/L.

c. Validation du model

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante sont résumés dans le tableau (XX).

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de régression R^2 (Chan et al., 2009). Dans la présente étude, la valeur de R^2 est 0,99, une valeur de R^2 ajusté de 0,99 et une probabilité de manque d'ajustement hautement significative ($P < 0,0001$). Cela indique que le modèle choisi pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante des extraits issus par macération est satisfaisant ($P < 0,0001$).

Tableau XX : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante

Source	Somme des carrés	Rapport F	Prob> F	Degrés de liberté	Estimation	Erreur Standard
modèle	7,5550	26101,93	<0,0001*	9	0,3478	0,0033
Défaut d'ajustement	0,0002		<0.0001*	3		
Erreur Pure	0			2		
Erreur Total	0,0002			5		
Totale corrigé	7,5552			14		
R ²	0,99997					
R ² Adj.	0,99994					
R M S E	0,0057					

En résumé, le facteur le plus important dans l'extraction par macération est le rapport solide/liquide avec des effets significatifs sur les trois réponses. La durée d'extraction à une influence linéaire significative sur la teneur en composé phénoliques mais pas avec les deux autres réponses, aussi le terme quadratique qui est significatif uniquement sur les composés phénoliques et les flavonoïdes. La concentration du solvant n'influence pas significativement l'activité antioxydant mais influence linéairement et quadratiquement les teneurs en composés phénoliques et les flavonoïdes. Les interactions des différents facteurs ne sont pas significatives sauf l'interaction entre la concentration de solvant avec la durée d'extraction.

II.4. Conditions optimales

Les conditions optimales de l'extraction des polyphénols par ultrasons et macération ont été obtenues en utilisant les équations de régression de la méthodologie de surface de réponse. Les figures 12 et 13 montrent les profiteurs de prédiction pour les conditions optimales obtenues par le modèle box-behnken.

Après avoir déterminé l'optimum des conditions et prédire la réponse dans ces conditions, une nouvelle série d'expériences a été conçue et conduite avec les conditions optimales sélectionnées des paramètres de processus pour prédire et vérifier la précision du modèle mathématique. Les résultats sont présentés dans le tableau XXI, la forte corrélation entre les résultats réels (expérimentaux) et prédits confirme l'efficacité des modèles de surface de réponse à refléter l'optimisation attendue.

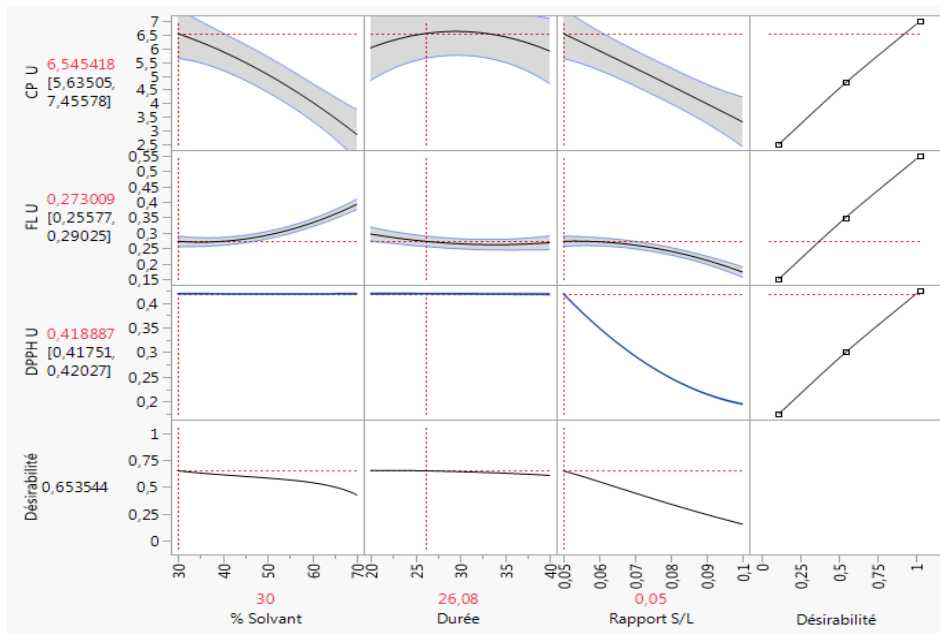


Figure 12 : Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode ultrasons.

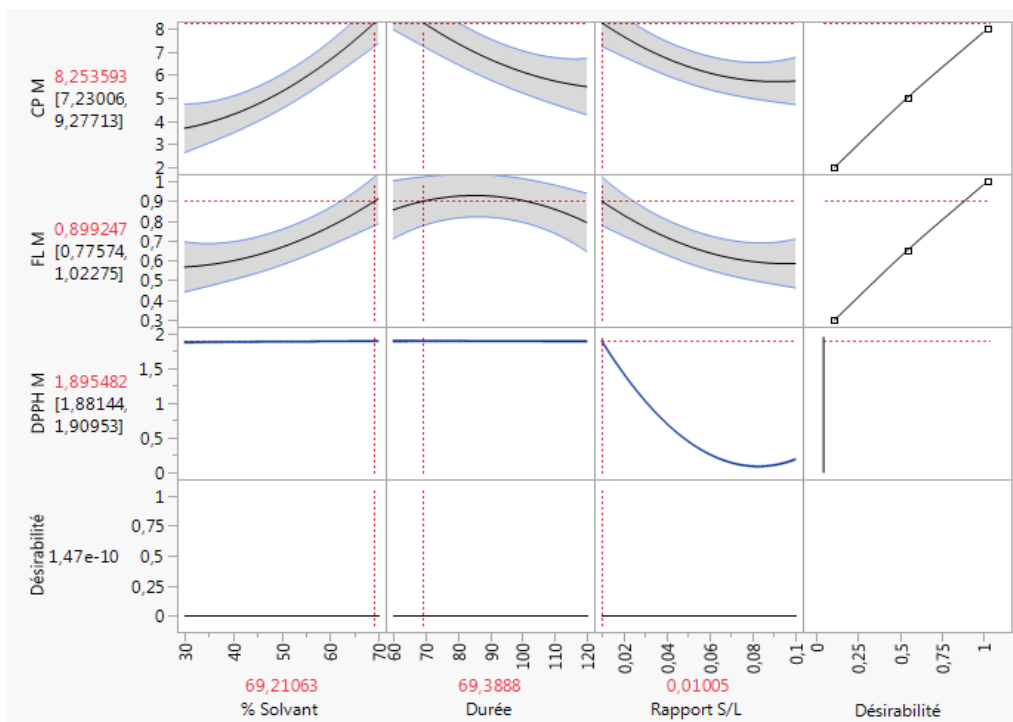


Figure 13 : Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode de macération.

Tableau XXI : Conditions optimales et résultats prédites et expérimentaux des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes et de l'activité DPPH obtenus par macération et par ultrasons.

	Solvant (%) X1	Durée (min) X2	S/L (g/ml) X3	Valeurs réelles TCP (gEAG /100g MS)	Valeurs réelles TF (gEQ /100gMS)	Valeurs réelles DPPH (gEAA /100gMS)	Valeurs prédites TCP (gEGA /100gMS)	Valeurs prédites TF(gEQ /100gMS)	Valeurs prédites DPPH (gEAA /100gMS)
Ultrasons	30	26,08	0,05	6,26±0,121	0,21±0,082	0,41±0,003	6,78	0,21	0,42
Macération	69,21	69,38	0,01	8,80±0,74	0,87±0,155	1,91±0,003	8,25	0,9	1,9

Les valeurs optimales en composés phénoliques, en flavonoïdes et l'activité anti radicalaire(DPPH) sont obtenues par les conditions suivantes : une concentration du solvant de 30%, une durée d'extraction de 26,08 min et un rapport S/L de 0,05g/ml pour l'extraction assistée par les ultrasons alors que celle de la macération les conditions sont: une concentration du solvant de 69,21%, une durée de 69,38min et un rapport S/L de 0,01g/ml. En effet, l'étude a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les teneurs prédites en composés phénoliques et en flavonoïdes et les valeurs de l'activité anti oxydante et celles obtenues par l'expérimentation pour les deux méthodes d'extraction. Ce qui confirme la validité du plan d'expérience utilisé.

Les résultats du tableau XXI montrent que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, et les résultats de l'activité anti-radicalaire obtenus par la méthode de macération sont plus élevées à ceux obtenus par l'ultrason. Ce qui confirme que c'est plus avantageux de choisir l'ultrason comme méthode d'extraction.



CONCLUSION

Conclusion

Cette étude a été consacrée à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des extraits de *Matricaria pubscens* par deux méthodes d'extraction à savoir ; les ultrasons et la macération, tout en suivant un plan d'expérience, afin d'élaborer un procédé d'extraction simple, rapide et efficace pouvant être employé à des fins analytiques et industrielles.

Le plan Box-Behnken a été mis en place pour étudier l'effet de trois variables indépendantes, à savoir : la concentration du solvant(%), le temps (min) et le ratio solide/liquide (g/ml), sur l'extraction des composés phénoliques totaux par les deux méthodes ; ultrasons et macération, afin de définir un modèle mathématique permettant l'optimisation des conditions d'extraction. Une étude préliminaire a permis de définir les niveaux hauts et bas pour chaque facteur.

L'utilisation du plan Box-Behnken a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction pour les deux méthodes. Les meilleures conditions d'extraction assistée par ultrasons sont : une durée de 26,08 min, une concentration du solvant de 30% et un rapport solide/liquide de 0,05g/ml. Concernant l'extraction par macération les meilleures conditions obtenues sont : un temps d'extraction de 69,38 min, une concentration du solvant de 69,21% et un rapport solide/liquide de 0,01g/ml.

L'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons a permis de donner des teneurs optimales en composés phénoliques de 6,26g EAG/100g MS, en flavonoïde de 0,21g EQ/100g MS et une activité anti-radicalaire (DPPH) de 0,41gEAA/100g MS. Tandis que le procédé d'optimisation par la méthode de macération a donné les résultats suivantes : une teneur optimale en composés phénoliques de 8,80g EAG/100g MS, une teneur optimale en flavonoïde de 0,87g EQ/100g MS et une valeur pour l'activité anti-radicalaire (DPPH) de 1,91g EAA /100g MS.

Une étude comparative entre les conditions optimales obtenues pour les deux méthodes d'extraction testées, concernant les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, et les résultats de l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH, a révélé que la méthode d'extraction par macération a permis de donner des résultats plus importantes concernant les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes et l'activité antioxydante, par rapport à ceux trouvés par la méthode d'extraction assistée par ultrasons.

En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail, plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés :

- Utiliser des techniques analytiques avancées (CCM, HPLC, ...) pour identifier les antioxydants de l'extrait.
- Optimiser d'autres paramètres qui affectent le taux d'extraction des composés phénoliques, tels que ; la température, le pH, la granulométrie de la poudre...etc.
- Utiliser des techniques analytiques (CCM, HPLC, ...) pour identifier les antioxydants de l'extrait.

A decorative horizontal scroll-like border with a black outline and rounded ends, containing the text.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

1. Abderrahmane, B. 2007. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat d'Etat en Biochimie Appliquée. L'université Mentouri Constantine.
2. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*.117(4) : 426-436.

B

3. Benard, C., 2009. Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat, Univ. France, 265 p.
4. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D. 2005. Phenolics content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal chem.* 82: 390-393.
5. Bilgin, M, Sahin, S. 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.44(1): 8–12.
6. Bruneton, J., 2008. Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.
7. Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Édition Technique et Documentations. Pp. 227–445.
8. BrglezMojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules (Basel, Switzerland)*:21(7).
9. Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *British Library*. 6: 399–402.

C

10. Crozier, A. 2003. Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health*". Ed. Goldberg. pp: 27- 48.

11. Chira, K., Such, J., Saucier, C., Teissède, L. 2008. Les polyphénols du raisin. *Ed:Springer*.6 :75-82.
12. Chen, R., Li, Y., Dong, H., Liu, Z., Li, S., Yang, S., et al .2012.Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum Caudatum* Air and evaluation of its biological activities. *Ultrason Sonochem*. 19(6):1160–8.
13. Chang-Liang, J., Xiao-Fang, D.,Jian-Ming, Tong.2015.Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method.*Molecules*.20.
14. Cotelle, N., Benier, J.H., Catteau, J.P., Gaydou, E., Wallet, J.C., 1995. Activité biologique de 24 flavones : inhibition de la xanthine oxydase et capture de radicaux libres. Edition INRA. Pp. 359–396.
15. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. 2018. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*. 109: 52–73.

D

16. Derbel, S., Ghedira, K. 2005. Phytothérapie et nutrition : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 1: 28-34.
17. Djellouli, M., Moussaoui, A., Benmehdi, H., Ziane, L., Belabbes, A., Badraoui, M., Slimani, N. and Hamidi, N. 2013. Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of southwest Algeria. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences*. 2 (2): 159–165.

E

18. El-Adawi, H., Abdel-Fattah, Y., & El-Wahab, A. A. 2011. Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from ‘milkthistle’ seeds. *African Journal of Biotechnology*. 10(48): 9804-9811.

G

19. Garro-Galvez, J.M., Ried, B., Conner, A.H., 1997.Analytical Studies on Tara Tannins.*Holzforschung*.51:235–243.

20. Gebhardt, Y., Witte, S., Forkmann, G., Lukacin, R., Matern, U., Martens, S., 2005. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family *Apiaceae*. *Phytochemistry*.66, 1273–1284.
21. Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4: 162–169.
22. Gramza, A., Korczak, J., 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*. 16:351–358.
23. Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F., 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*.40: 471–478.
24. Galvan D'Alessandro, L. 2013. Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits, Lille 1.
25. Gillon, F. 1997. Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques. Thèse de doctorat : Génie électrique. Lille : L'université des sciences et technologies de Lille, 42-43 p.
26. Ghafoor, K. 2009. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitisvinifera*) Seeds J. *Agriculture and Food Chemistry*. 57: 4988–4994.
27. Goupy, J. 2006. Les plans d'expériences. *Tutoriel*. (34): 74-116.

H

28. Hammiche, V., Maiza, K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmmacopoeia of TassiliN'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 105.
29. Hayouni, E.A., AbedrabbaBouix, 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 phenolicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105: 1126–1134.
30. Herzi, N. 2013. Extraction et purification de substances naturelles. ThèsedoctoratUniversité de Toulouse. France.
31. Heim, K.E., Tagliafeno, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572-584.

J

32. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. 2002. Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université. 84-87.

K

33. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.47: 3954–3962.
34. Khizar H., Xiaoming Z., Umar F., Shabbar A., Shuqin X., Chengsheng J., Fang Z. et Jing Zhang. 2009. Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry*.123: 423–429.
35. Kroyer, G., Hegedus, N., 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.2:171–174.

L

36. Lamaison, J.L.C., Carnet, A. 1990. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret) D.C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*.65 : 315–320.
37. Linden, G., Lorient, D., 1994. Pigments et arômes. In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed : Masson. 338-340.
38. Lucchesi, M.-E. 2005. *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Université de la Réunion.
39. Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K.V., Bíró, L. 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 47: 119–125.

M

40. Makhloufi, A. 2013. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des

- dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en biologie. L'université Aboubaker Belkaid. Faculté des sciences. 14-17.
41. Martin, S., Andriantsitohaina, R. 2002. Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 51: 304–315.
42. Yolmeh, M., Mohammad, B., Najafi, H., Farhoosh, R. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*. 155: 319–324.
43. Makino, R., Ohara, S., Hashida, K. 2009. Efficient extraction of polyphenolics from the bark of tropical tree species. *Journal of Tropical Forest Science*. 45-9.
44. Markouk, M. 1992. Valorisation des plantes médicinales marocaines : Contribution à l'étude de quelques aspects pharmacologiques de *Cotula cinerea* Del. Thèse Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences- Semlalia, Marrakech.
45. Maiza, K., Brac De La Perriere, R.A., Hammiche, V. 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique. Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11ème Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993 :169-171.
46. Maiza, K., Hammiche, V., Maiza-Benabdesselam, F. 2011. Traditional medicine in North Sahara the Deffi. *Life Sciences Leaf lets*. 16:551-560.
47. Macheix, j.j. 1996. Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Acta Botanica Gallica*. 143:6, 473-479.
48. Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* . 26(2): 211–219.

N

49. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33: 2–16.
50. Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054:95–111.

51. Nève, J. 2002. Nutrition et stress oxydant : Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. *Nutrition Clinique et métabolisme*.16 :292–300.

O

52. Ozenda, P. 2004. Flore et végétation du Sahara. Paris : CNRS édition (3). 92.
53. Ozenda P. 1991. Flore du Sahara, Ed. CNRS, Paris France. 201-280.
54. Ould el hadj, M.D., Hadj-Mahammed, M., Zabeirou, H. 2003. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla. *Courrier du Savoir*. N°03 : 47-51.

P

55. Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63 : 1035–1042.

Q

56. Quezel, P., et Santa, S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris ; CNRS, Tome II. 600.

R

57. Rahman, I., Biswas, S.K., Kode, A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*.533:222–239.
58. Routray, W., Orsat, V. 2012. Microwave assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 5(2):409-24.
59. Ribéreau-Gayon, P. 1968. Notions générales sur les composés phénoliques. In : « Les composés phénoliques des végétaux ». Edition Dunod. Pp.1–27.
60. Ribereau-Gayon, P. 1982. Notions générales sur les composés phénoliques, méthodes générales d'études des composés phénoliques. In : « Composés phénoliques des végétaux ».Ed.Dunod,Paris.Pp.173–201.

61. Rubanza, D.K., Shemb, M.N., Otsyinac, R., Bakengesac, S.S., Ichinohed, T., Fujiharad, T., 2005. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. *Animal Feed Science and Technology*. 119:129–142.
62. Robards, K., Prenzler, D.P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66: 401–436.

S

63. Poorhashemi, S., Arianfar, A., Mohammadi, A. 2019. Ultrasound-Assisted Extraction and Optimization Process Parameters of Antioxidant and Phenolic Compounds from *Myristica fragrans*. Jundishapur J Nat Pharm Prod. In Press(In Press):ed63423.
64. Sakihama, Y., Cohen, MF, Grace, SC., Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 177:67–80.

T

65. Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A. and Bellinghieri, V. 2013. Juniperus oxycedrus L. subsp. oxycedrus and Juniperus oxycedrus L. Subsp. macrocarpa (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. 58: 22-29.
66. Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V. 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'- hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 7: 140–146.

V

67. Vercauteren, J., Chez, C., Triaud, J. 1998. Polyphenols 96, 18th international conference on polyphénols. INRA. Pp.32–33.

W

- 68.** Wang, L, Weller, CL. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*.17(6):300-12.

X

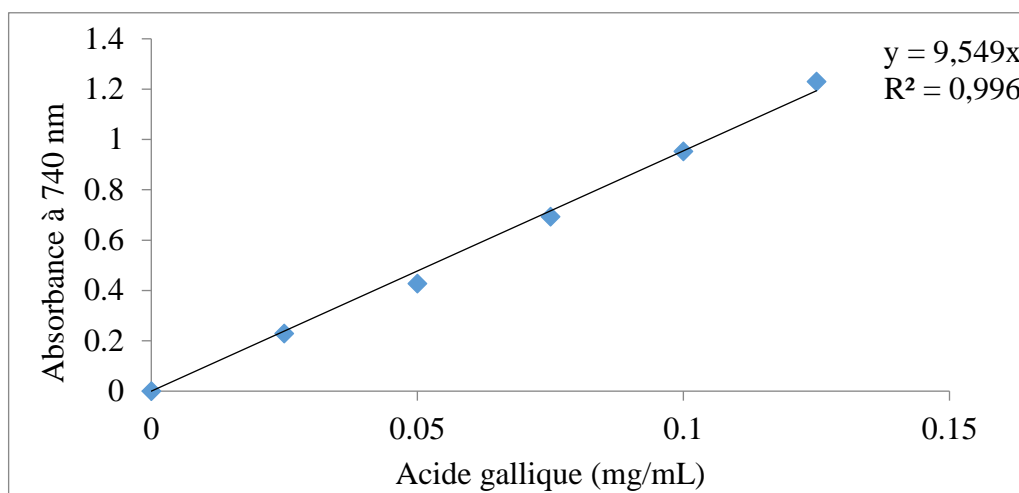
- 69.** Xiao, W., Han, L., Shib, B. 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali. *Separation and Purification Technology*.62: 614–618.

Z

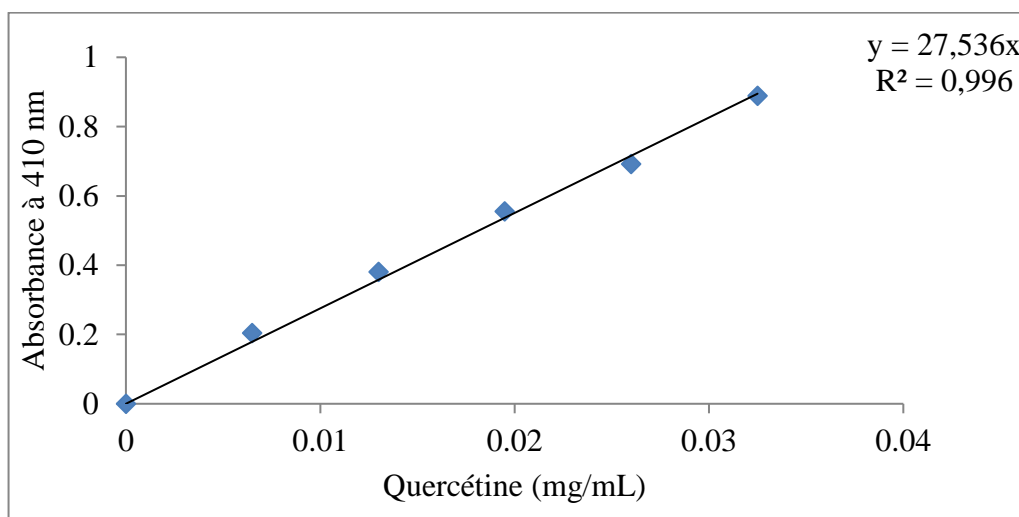
- 70.** Zhang, L., Xu, L., Wang, M., Y.M., Wu, D. M., Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic ellagic acid extraction conditions from infructescence of *Platycarya strobilacea* using response surface methodology. *Molecules*. 15, 7923–7932.



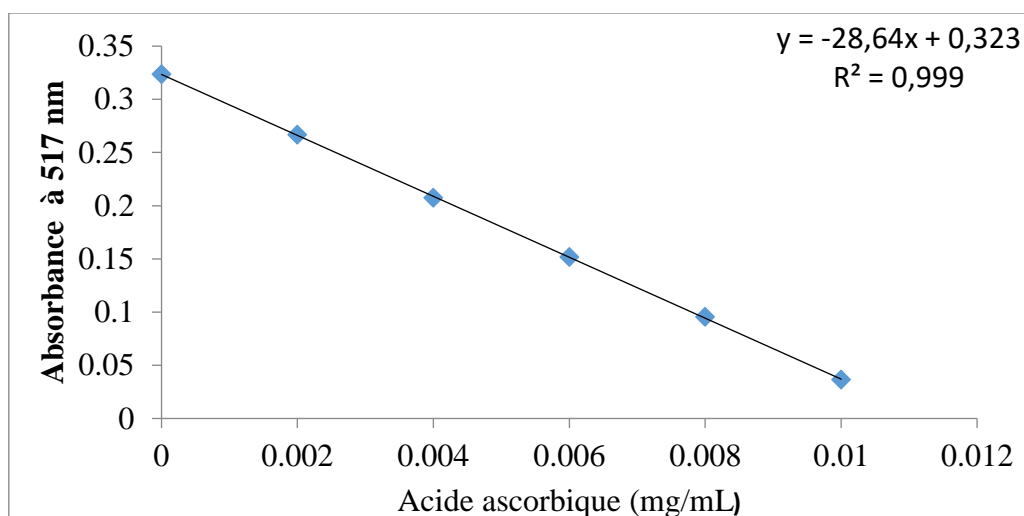
ANNEXES



Annexe 01 : Droite d'étalonnage des composés phénoliques.



Annexe 02 : Droite d'étalonnage des flavonoïdes.



Annexe 03 : Droite d'étalonnage du DPPH.

Résumé

Dans cette étude, deux méthodes d'extraction (EAM, EAU), ont été utilisées pour l'extraction des polyphénols totaux issus d'une plante saharienne *Matricaria pubescens*. L'application de la conception des expériences est envisagée pour optimiser les conditions d'extraction. L'effet variable des indépendants : le pourcentage du solvant, la durée d'extraction et le rapport solide/liquide, sur les trois réponses : teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et activité antioxydante DPPH, a été déterminé, à l'aide de la méthodologie de surface de réponse (MSR). Le modèle polynomial de second degré obtenu à partir de la MRS explique pleinement les deux méthodes d'extraction. En utilisant les conditions optimales obtenues, ces deux méthodes ont été comparées entre elles. Les résultats d'études comparatives montrent que la méthode de macération améliore l'efficacité de la teneur et l'ultrason réduit le temps d'extraction.

Mots clés : *Matricaria pubescens*, extraction, macération, ultrasons, polyphénols.

Abstract

In this study, two extraction methods, MAE and UAE, were used for the extraction of total polyphenols from a Saharan plant *Matricaria pubescens*. Application of the design of the experiments is considered to optimize the extraction conditions. The variable effect of the independents, percentage of solvent, extraction time, and solid/liquid ratio, on the three responses: content of total polyphenols, flavonoids and DPPH antioxidant activity, were determined, using Response Surface Methodology (MSR). The second-degree polynomial model obtained from MRS fully explains the two extraction methods. Using the optimal conditions obtained, these two methods were compared with each other. The results of comparative studies show that the maceration method improves the efficiency of the content and the ultrasound reduces the extraction time.

Key words

Matricaria pubescens, extraction, maceration, ultrasound, polyphenols.

ملخص

في هذه الدراسة، تم استخدام طريقتين للاستخراج، طريقة النقع MAE والموجات فوق الصوتية UAE، لاستخراج البوليفينول الكلي من نبات صحراوي قرطوفه. يعتبر تطبيق تصميم التجارب لتحسين ظروف الاستخراج. التأثير المتغير للمستقلين (النسبة المئوية للمذيب، وقت الاستخلاص، نسبة المادة الصلبة / السائلة) على الاستجابات الثلاثة (محتوى البوليفينول الكلي، الفلافونويد ونشاط مضادات الأكسدة DPPH). تم التقييم باستخدام منهجية سطح الاستجابة (MSR). يشرح نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية التقييم الحصول عليه تمامًا بطريقتي الاستخراج. باستخدام الظروف المثلى التي تم الحصول عليها، تمت مقارنة هاتين الطريقتين مع بعضهما البعض. تظهر نتائج الدراسات المقارنة أن طريقة النقع تعمل على تحسين كفاءة المحتوى وأن الموجات فوق الصوتية تقلل من وقت الاستخراج.

كلمات مفتاحية

قرطوفه، الاستخراج، النقع، الموجات فوق الصوتية، البوليفينول

