

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES



## MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT  
EN CONTROLE DE QUALITE ET ANALYSES

### THEME

Optimisation par plan d'expérience des paramètres  
d'extraction des flavonoïdes par micro-ondes et ultrason

Etude de cas: feuilles de *Pistacia lentiscus* et *Myrtus  
communis*

Présenté par :

SAADI Sofiane  
IDOUGHI Amirouche

Soutenu le 10 Juin 2012 devant le jury composé de :

Président :	Mr BOUAOUDIA A	Univ de Béjaïa
Promoteur :	Mr MADANI K	Univ de Béjaïa
Examineur :	Mr KATI Dj E	Univ de Bejaïa
Examinatrice :	Mlle ACHAT S	Univ de Bejaïa

Année universitaire: 2011-2012.

## Remerciements

*Cette première page est dédiée à toutes les personnes qui ont contribué, à un moment de notre travail, au bon déroulement et à l'achèvement de ce mémoire. En espérant ne pas en avoir oublié, qu'ils soient tous ici chaleureusement remercier.*

*Tout d'abord, nous devons remercier Mr. MADANI Khodhir, Maître de conférences (Classe A) à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaïa, directeur de notre travail de mémoire, qui a su nous accorder une grande confiance et un grand degré de liberté, indispensables à notre "épanouissement scientifique".*

*Nous tenons à remercier Mr. DAHMOUNE Farid, promotion préparatoire doctorat à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaïa, pour nous avoir initié à la présente étude, fait bénéficier de ses orientations.*

*Nous exprimons notre vive reconnaissance à Mr BOUAOUDIA Abdelmoumene, Maître assistant (Classe A) à l'Université de Bejaïa, pour avoir aimablement accepté la présidence du jury. Sa présence dans celui-ci, témoigne d'une grande gentillesse.*

*Nous adressons nos remerciements à Mr KATI Djamel Eddine, Maître assistant (Classe B) à l'Université de Béjaïa et Melle ACHAT Sabiha, Maître assistant (Classe A) à l'Université de Béjaïa, pour avoir accepté d'examiner le présent travail.*

*Nous remercions également tous les membres du laboratoire 3BS pour leur modestie, leur gentillesse, leurs encouragements et les conseils qu'ils nous ont prodigué en particulier Mr MOUSSI, Mr REMINI et Melle HAMOUI pour l'aide qu'ils nous ont apporté.*

*A tous les enseignants qui ont contribué à notre formation et à nos collègues, qui nous ont fait part de leur amitié et solidarité, nous témoignons notre profonde gratitude.*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont soutenus et encouragés tout au long de la réalisation du présent travail.*

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents qui m'ont soutenu depuis toujours. C'est grâce à eux que je suis aujourd'hui au stade final de ma formation.*

*Mes sœurs : Hassiba, Zahoua et Lilouh.*

*KHWALI qui m'ont soutenu tout au long de mon existence :*

*Jeddi Achour et Setti Wawa, Lounas, Toufik, Malika, Karima et les petits oiseaux Tarik et Imane.*

*Jeddi Leghel et Setti Djida. Tous mes oncles et tantes, et à tous mes cousins et cousines.*

*Tous mes cousins de Bou-Ismaïl.*

*Mes amis : Hanafi, Sofiane, Sofiane, Braham, Salah, Rachid, Khaled, Billal, Farid, Ahmed, Mahfoud, Lamine, Hafid, Yacine, M<sup>d</sup> Larbi, Yacine et Rafik.*

*Mon binôme Foufou le TOP et sa famille.*

*Toute la promotion CQA et SA.*

*Tous ceux qui me sont chers.*

*Amirouche.*

## Liste des abréviations

**ABTS:** 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid).

**ANOVA :** Analyse of variance.

**ASE:** Extraction Renforcée par Solvant.

**BBBS :** Biochimie, Bioinformatique, Biostatistique et Scientometrie.

**BBD:** Box-Behenken Design.

**BHA :** Butyl Hydroxy Anisol.

**CCD:** Centrale-Composite Design.

**CHI:** Chalcone Isomerase.

**CPT:** Composés Phénoliques Totaux.

**DF:** Degré of freedom.

**EAG:** Equivalent Acide Gallique.

**EAM :** Extraction Assistée Par Micro-onde

**EAU :** Extraction Assistée par Ultrasons.

**EC :** Extraction Conventionnelle.

**EQ:** Equivalent Quercitine.

**ASE:** Extraction Accélérée par Solvant.

**FAS:** Fatty Acid Synthase

**HPLC:** High performance liquid chromatography.

**MEB :** Microscope Electronique à Balayage.

**MS :** Matière Sèche.

**pH:** potentiel d'Hydrogène.

**R<sup>2</sup> :** Coefficient de corrélation.

**RMSE:** Root Mean Squar Error.

**S C :** Somme des Carrés.

**UA:** unité arbitraire.

**V.C.R :** Variables Centrées Réduites.

## Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Feuille de <i>Myrtus communis</i>	2
2	Feuille de <i>Pistacia lentiscus</i>	3
3	Structure générale des flavonoïdes	4
4	Différentes réactions conduisant aux principales familles de flavonoïde	7
5	Domaines de fréquence des sons	12
6	Évolution de la taille d'une bulle au cours du temps sous l'effet d'une onde acoustique	13
7	Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide et d'une cellule végétale.	15
8	Gamme de fréquence micro-ondes et le spectre électromagnétique.	16
9	Différentes parties du magnétron	18
10	Schéma d'un four micro-ondes monomode	19
11	Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage conventionnel et micro-ondes	20
12	Comportements de la matière vis à vis d'une onde électromagnétique	20
13	Etat des molécules sous champ électrique	21
14	Appareillage d'un four micro-onde utilisé pour EAM	28
15	Appareillage de sonication utilisé pour EAM	29
16	Procédure d'extraction des flavonoïdes par macération.	29
17	Protocole de dosage des polyphénols	30
18	Protocole de dosage des flavonoïdes totaux	31
19	Protocole d'étude de l'effet scavenger du DPPH	31
20	Protocole d'étude de l'effet scavenger de l'ABTS	32
21	Surface de réponse pour les différentes interactions (cas myrtus EAM)	38
22	Surface de réponse pour les différentes interactions (cas Pistacia EAM)	39
23	Surface de réponse pour les différentes interactions (cas Myrtus EAU)	42
24	Surface de réponse pour les différentes interactions (cas pistacia EAU)	42
25	Teneur des différents extraits en CPT	
26	Teneur des différents extraits en flavonoïdes	44
27	Pouvoir antioxydant des extraits obtenus par EAM, EAU et EC évalué par le test ABTS et le pouvoir réducteur	45
28	Pouvoir antioxydant des extraits obtenus par EAM, EAU et EC évalué par le test DPPH et le pouvoir réducteur.	46

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b>	Principales classes des flavonoïdes	<b>5</b>
<b>Tableau II</b>	Equations de maxwell	<b>17</b>
<b>Tableau III</b>	Constantes diélectriques et facteurs de dissipation de quelques solvants.	<b>21</b>
<b>Tableau IV</b>	Les variables indépendantes et les niveaux de facteurs influençant sur l'extraction assistée par micro-ondes.	<b>26</b>
<b>Tableau V</b>	Les variables indépendants et les niveaux de facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultra-son.	<b>26</b>
<b>Tableau VI</b>	Teneur en eau et matière sèche des poudres	<b>33</b>
<b>Tableau VII a</b>	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le BBD de la surface de réponse. (Cas du <i>Myrtus</i> )	<b>35</b>
<b>Tableau VII b</b>	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le BBD de la surface de réponse. (Cas de <i>Pistacia</i> )	<b>36</b>
<b>Tableau VIII a</b>	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le CCD de la surface de réponse. (Cas du <i>Myrtus</i> )	<b>39</b>
<b>Tableau VIII b</b>	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le CCD de la surface de réponse. (Cas de <i>Pistacia</i> )	<b>40</b>
<b>Tableau X</b>	conditions optimales d'extraction.	<b>42</b>
<b>Tableau XI</b>	teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes après extraction par agitation par ultrason et par micro-onde.	<b>43</b>

## Sommaire

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

### Partie théorique

Chapitre I : Les plantes médicinales.....	2
I-1 Définition.....	2
I-2 Plantes sélectionnées.....	2
I-2-1 <i>Myrtus communis</i> .....	2
I-2-1-1 Description botanique .....	2
I-2-1-2 Taxonomie .....	2
I-2-1-3 Effet et usage médicinaux.....	2
I-2-2 <i>Pistacia lentiscus</i> .....	3
I-2-2-1 Description botanique .....	3
I-2-2-2 Taxonomie.....	3
I-2-2-3 Effet et usage médicinaux.....	3
I-3 Polyphénols.....	3
I-4 Flavonoïdes.....	4
I-4-1 Structure des flavonoïdes.....	4
I-4-2 Classification des flavonoïdes.....	4
I-4-3 Localisation et distribution des flavonoïdes.....	6
I-4-4 Biosynthèse des flavonoïdes.....	6
I-4-5 Propriété des flavonoïdes.....	7
I-4-5-1 Propriété antiradicalaires .....	8
I-4-5-2 Effet cardiovasculaire.....	8
I-4-5-3 Activité anti microbienne.....	8
I-4-5-4 Activité anti inflammatoire.....	8
I-4-5-5 Effet anti cancéreux.....	9
Chapitre II : Méthodes d'extractions .....	10

II -1 Extractions conventionnelles .....	10
II -1-1 Extraction soxhlet .....	10
II -1-2 Extraction par macération .....	10
II-2 Extractions innovantes .....	11
II-2-1 Extraction accélérée par solvant.....	11
II-2-2 Extraction par fluide supercritique .....	11
II -2-3 Extraction assisté par ultrason.....	12
II-2-3-1 Définition des ultrasons.....	12
II-2-3-2 Cavitation.....	12
II-2-3-2-1 Origine de la cavitation.....	13
II-2-3-2-2 Paramètres influençant la cavitation.....	13
a- Puissance.....	13
b- Température.....	14
c- Pression.....	14
d- Gaz.....	14
e- Liquide .....	14
II -2-3-3 Principe d'extraction.....	15
II-2-4 Extraction assisté par micro-ondes.....	15
II-2-4-1 Généralités sur les micro-ondes.....	16
II-2-4-2 Technologie du four à micro-ondes .....	17
a- Magnétron.....	17
b- Guide d'onde.....	18
c- Applicateur.....	18
II-2-4-3 Chauffage micro-ondes.....	19
II-2-4-4 Interaction onde-matière .....	20
a- En absence d'un champ électrique.....	20
b- En présence d'un champ électrique continu.....	21

d- En absence d'un champ électrique continu .....	21
II-2-4-5 Propriétés diélectrique du solvant.....	21
II-2-4-6 Principe de l'extraction.....	22
II-2-4-7 Facteurs influençant l'extraction assisté par micro-ondes.....	22
a- Puissance du micro-onde.....	22
b- Temps d'extraction.....	22
c- La température.....	22
d- Nature du solvant.....	22

### **Partie pratique**

Chapitre III : Matériel et méthodes.....	23
III-1 Matériel végétale.....	23
III-2 Taux d'humidité.....	23
III-3 Optimisation d'extraction des flavonoïdes.....	23
III-4 Etude préliminaire.....	24
III-4-1 Choix du solvant.....	24
III-4-2 Concentration du solvant.....	24
III-4-3 Temps de l'extraction.....	24
III-4-4 Puissance d'extraction (pour le micro-onde) .....	25
III-4-5 Amplitude (pour l'ultrason) .....	25
III-4-6 Ratio (lis/sol).....	25
III-5 Conception expérimentale (BBD et CCD).....	25
III-6 Procédure d'extraction.....	26
III-6-1 Extraction par micro-onde.....	28
III-6-2 Extraction par ultrasons.....	28
III-6-3 Extraction par macération.....	29
III-7 Dosage des polyphenols totaux.....	30
III-8 Dosage des flavonoïdes.....	30

III- 9 Détermination de l'activité anti-oxydante.....	31
III -9-1 Pourcentage d'inhibition du DPPH.....	31
III - 9-2 Pourcentage d'inhibition de l'ABTS .....	32
Chapitre IV : Résultats et discussions.....	33
IV-1 Taux d'humidité.....	33
IV -2 Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes.....	33
IV -2-1 Extraction par micro-onde.....	33
IV -2-2 Extraction par ultrasons .....	33
IV -3 Analyse des résultats .....	34
IV -3-1 Plan d'expérience BBD (pour EAM) .....	34
IV -3-1-1 Analyse de la variance (ANOVA) .....	34
IV -3-1-2 Modèle mathématique.....	36
IV -3-1-3 Effets des facteurs.....	37
a-Effet linéaire.....	37
b-Effet d'interaction.....	37
c-Effet quadratique.....	39
IV -3-2 Plan d'expérience CCD (pour EAU) .....	39
IV -3-2-1 Analyse de la variance (ANOVA) .....	39
IV -3-2-2 Modèle mathématique.....	40
IV -3-2-3 Effets des facteurs.....	40
a-Effet linéaire.....	40
b-Effet d'interaction.....	41
c-Effet quadratique.....	42
IV -4 Conditions optimales de l'extraction des flavonoïdes et CPT par micro-ondes et ultrasons à partir de Pistacia lentiscus et Myrtus communis.....	42

IV -5 Comparaison entre la méthode d'extraction assistée par micro-onde, ultrasons et la méthode conventionnelle (Solide-liquide).....	42
IV -6- Activité anti oxydante des extraits.....	44
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.	
Liste des annexes.	
Résumé.	

# Introduction

## Introduction

L'utilisation des plantes médicinales en tant qu'agents thérapeutiques est aussi vieille que la présence de la vie humaine sur terre. Bien que nous soyons dans le siècle des médicaments industriellement synthétisés, les plantes médicinales sont encore employées dans différents pays pour leurs effets thérapeutiques **(Kaniyas, 1993)**. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études **(Zeghad N, 2008)**.

Durant les 30 dernières années, les composés phénoliques des plantes sont considérés comme des déchets sans aucune signification. Ce concept erroné a été remplacé par l'opinion courante que ces composés jouent des rôles cruciaux en phytoécologie et en physiologie des plantes. En outre, la recherche biomédicale a indiqué que les composés phénoliques, en raison de leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires, jouent des rôles importants dans la prévention contre plusieurs maladies chroniques contemporaines **(Daayf et Lattanzio, 2008)**.

Utilisées comme remèdes contre l'hypertension artérielle, troubles digestifs, les deux plantes *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis* sont des antiseptiques puissants, utilisés dans plusieurs pays méditerranéens pour le traitement des toux, des rhumes et des maux de gorge **(Iserin, 2001)**.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en flavonoïdes et à déterminer leurs propriétés antiradicalaires. Pour cela cette étude englobe trois aspects, dont le premier est d'ordre bibliographique porté sur les plantes utilisées et leurs contenances en composés flavonoïdiques, ainsi qu'un aperçu sur les techniques d'extraction innovantes et classiques.

Le second aspect est consacré à l'optimisation des paramètres d'extraction avec un plan d'expérience en utilisant deux méthodes d'extraction, extraction assistée par micro-onde et extraction assistée par ultrasons.

Le troisième aspect est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des flavonoïdes par méthodes colorimétriques. Il porte également sur une évaluation de l'activité antioxydante des extraits vis-à-vis des radicaux libres DPPH et ABTS.

# Partie Théorique

# Chapitre I

## Les plantes médicinales

## I- Plantes médicinales

### I-1 Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al, 2007**).

### I-2 Les plantes médicinales sélectionnées

#### I-2-1 *Myrtus communis*

##### I-2-1-1 Description botanique

Arbrisseau de 1 à 3 mètres, inerme, aromatique, toujours vert ; feuilles opposées, très rapprochées, subsessiles, ovales-lancéolées aiguës, entières, coriaces, persistantes, glabres et luisantes, sans stipules; fleurs, blanches, axillaires, solitaires, longuement pédonculées, odorantes ; calice à tube soudé à l'ovaire, à 5 lobes étalés ; 5 pétales ; étamines nombreuses ; 1 style à stigmate simple ; ovaire infère ; baie à peine charnue, ovoïde, d'un noir bleuâtre, couronnée par le calice, à graines peu nombreuses (**Bock B, 2011**).



##### I-2-1-2 Taxonomies

- Règne : végétale.
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Myrtale
- Famille : *Myrtaceae*
- Genre : *Myrtus*
- Espèce : *Myrtus communis*

**Figure 1:** Feuille de *Myrtus communis* (**Bock B, 2011**).

##### I -2-1-3 Effet et usage médicaux

Les feuilles de myrte sont astringentes, toniques et antiseptiques. Une infusion à partir des feuilles sert, en usage externe, à guérir les blessures et les ulcères, ou en usage interne, à soigner les troubles digestifs et urinaires. L'huile essentielle, antiseptique et expectorante, est utilisée en cas d'affections respiratoires (**IserinP, 2001**).

## I -2-2 *Pistacia lentiscus*

### I -2-2-1 Description botanique

Arbrisseau de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte; feuilles persistantes, paripennées, à 4-10 folioles elliptiques-obtuses, mucronulées, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous; pétiole étroitement ailé ; fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole; pédicelles très courts ; fruit petit, subglobuleux, apiculé, rouge, puis noir à la maturité (**Bock B, 2011**).

### I -2-2-2 Taxonomie

- Règne : végétale.
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Spinales
- Famille : *Anacardiaceae*
- Genre : *Pistacia*
- Espèce : *Pistacia lentiscus*.



**Figure 2:** Feuille de *Pistacia lentiscus* (**Bock B, 2011**).

### I -2-2-3 Effets et usages médicaux

La résine de lentisque est peu employée aujourd'hui, mais elle serait efficace contre les affections bronchiques et la toux et pour soigner la diarrhée. On l'a aussi appliqué sur les ulcères et les furoncles. La résine, mélangée à d'autres composants, sert de pansement dentaire provisoire. Les pinènes, contenus dans l'huile essentielle, sont très antiseptiques (**Iserin P, 2001**).

## I -3 Polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'Homme, ces

molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (**Macheix *et al.*, 2005**).

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols : ce sont des molécules aromatiques polysubstitués ayant un rôle de métabolite secondaire chez les plantes (**Isorez G, 2007**).

#### I-4 Les flavonoïdes

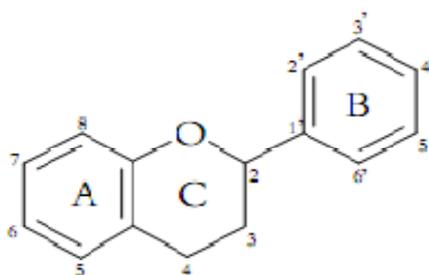
Le terme *flavonoïde* provient du latin *flavus* signifiant *jaune*. La présence de flavonoïdes a été révélée dans le zeste du citron par les travaux du Hongrois Szent-Gyorgyi en 1936 et 1937 sur le scorbut. Avant lui, la première substance flavonoïde obtenue à l'état pur : le morin, a été isolée par Chevreul en 1814. Le terme "flavonoïde" provient du nom *flavedo* correspondant à la couche externe des écorces d'orange. Ce terme désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Lhlah F, 2008**) qui sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles (**Riberau-Gayon, 1968**).

Les flavonoïdes sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées) (**Anthoni, 2007**).

Désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines (**Anthoni, 2007**).

##### I-4-1 Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> en formant ainsi l'hétérocycle (C). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (**Wei F, et al, 2004**).

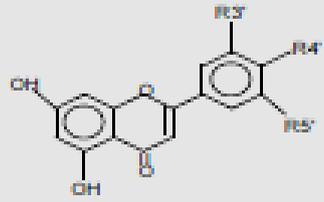
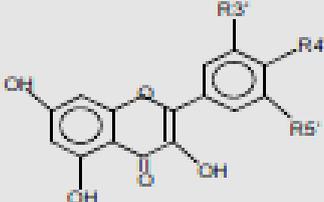
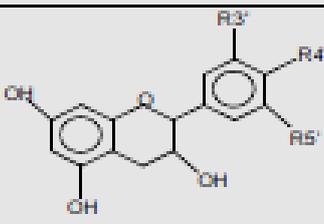
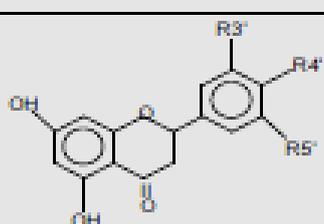
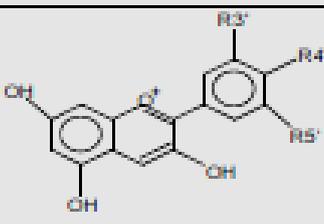
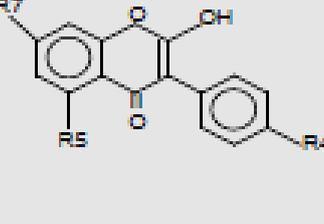


**Figure 3:** Structure générale des flavonoïdes (**Wei F *et al.*, 2004**).

##### I-4-2 Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, auronnes et anthocyanes (**Kuresh *et al.*, 2002**).

Tableau I : Principales classes des flavonoïdes (Ghedira k, 2005).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		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
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genistéine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

### **I -4-3 Localisation et distribution des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont répandus dans toutes les parties de la plante : racines, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les anthocyanes sont plutôt localisées dans la partie externe des fruits, des fleurs et les cellules épidermiques; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolet des fleurs (**Zeghad ,2008**)

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Lahlah f, 2008**).

La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique, ils ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Anthoni, 2007**).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs.

On trouve la chrysin, la quercétine, de la galangine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (**Lahlah, 2008**).

### **I -4-4 Biosynthèse des flavonoïdes :**

La Chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes, elle est en équilibre avec les flavonoïdes, cet équilibre étant contrôlé par une enzyme, la chalcone isomérase, conduisant à une cyclisation stéréospécifique du cycle donnant naissance aux flavanones. Les chalcones gardent la structure de tri ou tétra-stérols. Les flavanones dérivent des précédentes par une cyclisation du noyau central, conduisant à un hétérocycle, suite à une isomérisation par la chalcone isomérase (CHI) (**Heller et al., 1998**).

Les flavonoïdes dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Les flavonols se différencient des flavones par la présence d'un OH en C<sub>3</sub>.

Les isoflavones dérivent aussi des flavanones, mais après une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C<sub>2</sub> au C<sub>4</sub> de l'hétérocycle (**Anthoni, 2007**).

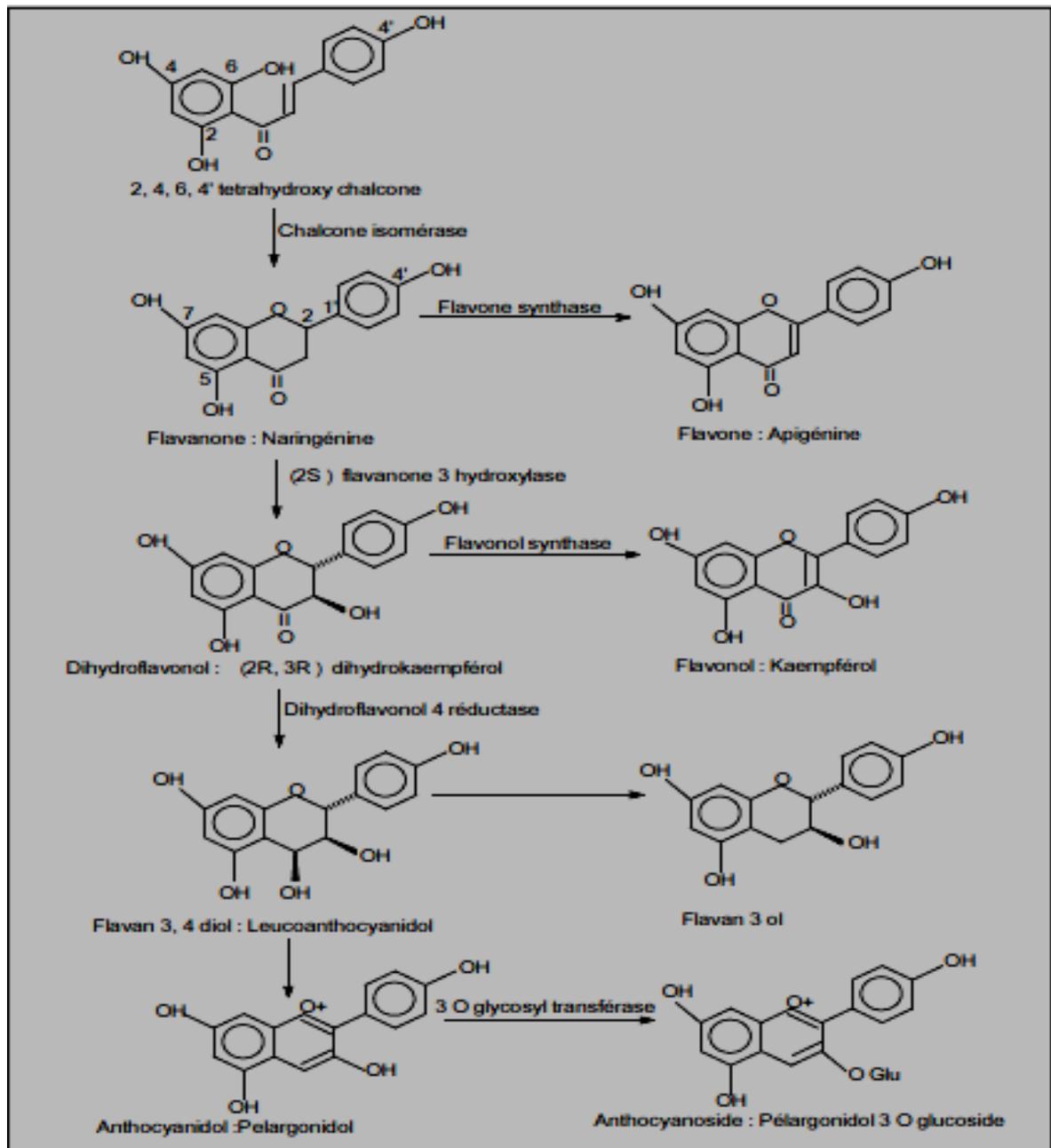


Figure 4 : Différentes réactions conduisant aux principales familles de flavonoïde.

### 1-4-5 Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, certaines sont établies depuis longtemps (2000 ans), ces composés sont réputés pour leurs caractères antioxydants, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladie. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte (Isorez G, 2007).

### **I-4-5-1 Propriétés anti-radicalaires**

Les flavonoïdes sont des antioxydants capables de piéger les radicaux libres générés par notre organisme en réponse aux agressions de l'environnement, cigarette, polluants, infectieux, etc. (Ce qui favorisent le vieillissement cellulaire) donc ils renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (**Anthoni, 2007**).

Les flavonoïdes forment des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous : (**Zeghad, 2008**).



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•) qui subit un changement de structure par résonance; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible créativité par rapport aux R•.

En outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (**Amić et al, 2003**).

$\text{FLO}\bullet + \text{R}\bullet \longrightarrow \text{FLO-R}$  (réaction de couplage radical-radical).

$\text{FLO}\bullet + \text{FLO}\bullet \longrightarrow \text{FLO-OFL}$  (réaction de couplage radical-radical).

### **I-4-5-2 Effet cardiovasculaire**

Les flavonoïdes sont « veino-actif » c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance ; une étude menée aux Pays Bas a mis en évidence le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres. Grâce à l'effet synergique des flavonoïdes, de nombreuses plantes sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires (**Hertog et al., 1995**).

### **I-4-5-3 Activité antibactérienne**

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

### **I-4-5-4 Activité anti inflammatoire**

Les flavonoïdes accélèrent le processus de destruction des agents pathogènes en améliorant la capacité des macrophages à les neutraliser. La transformation des macrophages en antigène est donc plus rapide et les lymphocytes-T peuvent intervenir avec plus d'efficacité.

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (**Fleuriet et al, 2005**).

Cette activité concerne de nombreux composés phénoliques et en premier lieu l'acide salicylique sous sa forme acétylé (acétylsalicylique) commercialisée sous le nom d'aspirine (**Manthey, 2000**).

#### **I-4-5-5 Effet anticancéreux**

De nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voir d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (**Hertog, 1996**).

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose.

Certains flavanols représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate, ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (Fatty Acid Synthase).

Les travaux réalisés par **Depeint et al., (2002)** montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercitine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercitine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toute fois signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes: (**Zeghad, 2008**)

- Piégeage des radicaux libres ;
- Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique ;
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène ;
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes ;
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ;
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses ;
- Induction de l'apoptose ;
- Inhibition des processus d'angiogénèse.

# Chapitre II

## Méthodes d'extractions

L'extraction est utilisée principalement pour l'obtention de certains composants souhaités initialement retenus dans une matrice alimentaire. Elle est l'une des opérations unitaires les plus largement utilisées dans l'industrie alimentaire.

Des méthodes d'extractions classiques ont été utilisées durant plusieurs années telles que la macération et l'extraction soxhlet dont l'objectif est de libérer les composés phénoliques et les flavonoïdes de la structure vacuolaire où ils sont trouvés, en rompant le tissu végétal ou par un processus de diffusion (**Wang & Weller, 2006**).

Des nouvelles méthodes d'extraction sont apparues ces dernières années, ce qui a mené à une demande croissante de ces techniques qui permettent le raccourcissement du temps d'extraction et la réduction de la consommation des solvants. Parmi ces techniques d'extraction les plus efficaces, nous avons : l'extraction assistée par micro-ondes, extraction ultrasonique, extraction par fluide supercritique et extraction accélérée par solvant (**Hayat et al., 2009**).

## **II-1 Extractions conventionnelles**

### **II-1-1 Extraction soxhlet**

Méthode classique pour l'extraction solide/liquide basé sur le choix de solvant couplé à l'utilisation de la chaleur et/ou agitation, elle a été employée pendant longtemps ; c'est une technique standard et la référence standard pour évaluer l'exécution d'autres méthodes solide/liquide (**Wang & Weller, 2006**).

Les inconvénients principaux de l'extraction conventionnelle de Soxhlet incluent :

- (1) le temps d'extraction est long ;
- (2) une grande quantité de solvant est employé ;
- (3) l'agitation ne peut pas être fournie dans le dispositif de Soxhlet qui accélèrent le processus ;
- (4) la grande quantité de solvant utilisée exige un procédé d'évaporation concentration (**Luque de Castro & Garcia-Ayuso, 1998**).

### **II -1-2: Extraction par macération**

L'extraction par macération est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide consiste à mettre en contact un solide et un liquide et de séparer grâce au liquide un ou plusieurs composés solubles, «les solutés», contenus dans un matériau solide insoluble. Le liquide d'extraction est appelé «solvant». Le composé soluble peut être solide ou liquide. Enfin, le solide insoluble peut être massif ou poreux et se présente en général sous la forme de particules poreuses ou cellulaires avec des membranes semi-perméables (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles. Parmi ces techniques, la macération est largement utilisée. L'extraction a lieu à température ambiante ou non et par conséquent il n'ya pas d'altération des composés

thermolabiles. Malheureusement, elle n'est pas toujours applicable car elle nécessite une longue période de contact entre le solide et le liquide. (Naviglio *et al.*, 2007). Au cours de l'opération, plusieurs étapes peuvent être décrites :

- La pénétration du solvant au sein de la structure du solide. Il s'agit en général d'une étape rapide qui ne limite pas le procédé ;
- La libération du soluté dans le solvant d'imprégnation. Cette étape peut recouvrir des phénomènes physiques et physico-chimiques différents suivant la nature du soluté et sa place dans la structure (liaison chimique à rompre, diffusion, au travers d'une membrane, désorption, dissolution) ;
- Enfin, la diffusion du soluté au travers de la porosité de la structure solide jusqu'au film liquide entourant le solide et le transfert vers le sein du solvant. Cette dernière étape est en général l'étape limitant le procédé et explique les ordres de grandeurs de plusieurs heures habituellement rencontrés lors de cette opération. Comme toutes les opérations de transfert de matière, le dimensionnement se base sur le concept d'étage idéal ou étage d'équilibre, mais l'extraction est tout autant un problème cinétique qu'un problème d'équilibre (Chemat, 2010).

## II -2 Extractions innovantes

### II -2-1 Extraction accélérée par solvant (ASE®)

L'extraction accélérée par solvant (ASE) ou l'extraction renforcée par solvant (ESE) utilisent des solvants conventionnels à des températures et des pressions élevées. La cinétique d'extraction augmente avec la température, le rôle de la pression est de maintenir le solvant à l'état liquide. Le principal avantage de l'ASE, outre sa rapidité et son automatisation, est sa faible consommation de solvant (Aimesther O, 2008).

Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles (Wang & Waller, 2006).

### II -2-2 : Extraction par fluide supercritique

Les fluides supercritiques et principalement le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> sous pression (100-400 bar) et à température voisine de (30-60 °C) font l'objet d'un très vif intérêt car leurs propriétés physico-chimiques particulières permettent d'envisager des applications dans de nombreux domaines (Michel, 2012).

Précisons que le véritable intérêt du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique est lié à ses propriétés notamment ses coordonnées critiques qui permettent son emploi à une température voisine de l'ambiante et à des pressions «acceptables» de 8 à 20 MPa; le CO<sub>2</sub> présente en plus l'avantage décisif d'être non toxique, non combustible et «naturel». Il est donc un solvant de choix pour les applications dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétologiques..., où l'extraction et le fractionnement doivent être conduits à des températures aussi voisines que possible de l'ambiante afin d'éviter toute

dégradation thermique et exigeant l'élimination de toute trace de solvant « chimique » dont l'innocuité est toujours sujette à caution (**Michel, 2012**).

Les avantages de cette méthode devant les méthodes conventionnelles sont basées sur une durée d'extraction plus courte, une sélectivité élevée et la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression (**Danielski, 2006**).

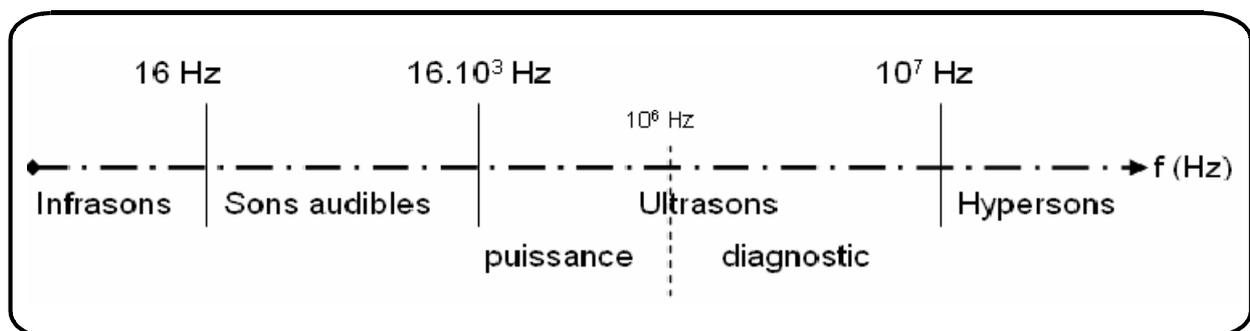
### II -2-3 : Extraction assisté par ultrasons

L'extraction assisté par ultrasons été largement appliquée pour l'extraction matériel alimentaire, tel que les lipides, des protéines, des huiles essentielles et des composés bioactive (**Yujing Sun, 2010**).

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu couteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique (**Penchev, 2010**).

#### II -2-3-1 : Définition des ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (voire figure 5), c'est-à-dire entre les domaines des sons audibles (16 Hz-16 kHz) et des hypersons (> 10 MHz) (**Veillet, 2010**).



**Figure 5:** Domaines de fréquence des sons (**Laugier, 2007**).

Les ondes sonores sont des vibrations mécaniques qui influencent sur la matière. Par conséquent, à mesure que les ondes sonores se propagent dans le milieu environnant sous forme d'ondes longitudinales, ils créent des cycles d'expansion et de compression dans le milieu. Dans un cycle d'expansion, les molécules sont écartés alors que dans un cycle de compression, ils se rassemblent (**Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003**).

La fréquence des ultrasons est plus élevée que la gamme audible pour l'Homme. Ainsi, la plus basse fréquence ultrasonique est considérée comme 20 kHz.

#### II -2-3-2 Cavitation

Il est généralement reconnu que les effets majeurs des ultrasons sont dus au phénomène de cavitation. En effet, l'activité cavitaire permet de transformer la densité

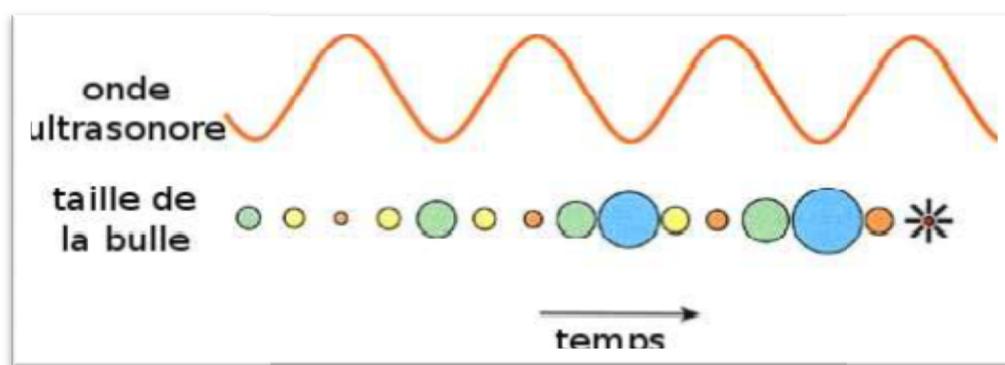
d'énergie assez faible d'un champ acoustique en une haute densité d'énergie caractéristique du voisinage des bulles en cours d'implosion (**Laugier, 2007**).

La cavitation décrit la naissance, l'oscillation radiale et l'implosion de bulles de gaz et de vapeur dans un liquide soumis à une phase de dépression (**Izella S, 2009**).

### II -2-3-2-1 Origine de la cavitation

❖ La cavitation hydrodynamique, provoquée par l'écoulement d'un liquide à forte vitesse (**Izella S, 2009**). La cavitation hydrodynamique est indésirable parce qu'elle abaisse le rendement de la pompe ou de l'hélice et peut endommager l'hélice ou le moteur de la pompe (**Laugier, 2007**).

❖ La cavitation acoustique provoquée par un son de forte intensité, généralement par les ultrasons de puissance, qui est le domaine d'intérêt de cette étude (**Laugier, 2007**). Elle est liée aux variations de densité d'un liquide soumis à une onde acoustique, Lorsque l'amplitude de l'onde ultrasonore augmente, il peut arriver que la dépression au sein du liquide soit assez grande pour provoquer la formation de cavités et leur évolution vers des bulles de tailles micrométriques voire millimétriques (**Izella S, 2009**).



**Figure 6:** Évolution de la taille d'une bulle au cours du temps sous l'effet d'une onde acoustique (**Izella S, 2009**).

### II -2-3-2-2 Paramètres influençant la cavitation

L'apparition de la cavitation dépend d'un grand nombre de paramètres : puissance et forme de l'onde acoustique, température, viscosité du liquide et pression intérieure du milieu, présence d'impuretés et/ou de gaz dissout (**Izella S, 2009**).

#### *a- Puissance*

Il s'agit là du paramètre qui a l'effet le plus marqué. Une puissance minimale est requise pour que la cavitation ait lieu (seuil de cavitation). L'effet des ultrasons augmente avec la puissance injectée. Cependant il existe une limite physique : lorsque la cavitation devient trop intense, un bouclier de bulles de cavitation se forme sur la surface émettrice. L'onde est fortement amortie par ce coussin de bulles, ce qui diminue l'effet des ultrasons. Une solution consiste à éteindre le générateur de manière cyclique (pulsations) afin d'évacuer ce bouclier de bulles (**Laugier F., 2007**).

### ***b-Température***

Une augmentation de la température diminue la solubilité des gaz dans les liquides, et augmente la tension de vapeur du solvant, donc le seuil de cavitation est abaissé (**Izella S, 2009**). Cependant il est prouvé qu'une augmentation de la température diminue l'efficacité des ultrasons. Dans la pratique en présence de ces effets antagonistes, on observe une température optimale (**Mason, 1988**).

### ***c-Pression***

La pression appliquée au milieu (Pl) soumis aux ultrasons peut être calculée comme étant la somme de la pression hydrostatique (Ph) et de la pression acoustique (Pa) (Equation 1). Par conséquent la cavitation sera possible dans le liquide si la tension de vapeur du liquide est supérieure à la somme de la pression hydrostatique et la pression acoustique. Cela signifie que plus la pression appliquée au milieu sera élevée, plus il sera difficile de provoquer de la cavitation. En effet, pour la provoquer il faudra augmenter la pression acoustique et donc augmenter l'intensité des ultrasons (**Veillet, 2010**).

$$Pl = Ph + Pa \dots\dots\dots (I).$$

Où : pl : pression appliquée au milieu  
Ph : pression hydrostatique.  
Pa : pression acoustique.

### ***d-Gaz***

A chaque expansion de la bulle, le gaz dissout dans le liquide pénètre dans la bulle, et à chaque compression, du gaz est diffusé de l'intérieur de la bulle vers le liquide. La quantité de gaz diffusé entre un milieu et un autre est proportionnelle à la surface d'échange. Le flux entrant est donc supérieur au flux sortant et la bulle contient plus de gaz à l'issue de l'oscillation: c'est l'effet de surface. De plus, lors d'une phase d'expansion, la couche de liquide qui entoure la bulle est comprimée, et contient donc une plus grande concentration de gaz dissout, ce qui entraîne un gradient de concentration élevé. Cela contribue à augmenter encore le flux entrant dans la bulle pendant une phase d'expansion: c'est l'effet de couche. Ces transferts de masse dépendent donc beaucoup de la concentration en gaz dissout dans le milieu. La diffusion récitée permet donc à des germes de taille inférieure au micron de croître pour atteindre des tailles plus importantes susceptibles d'être excitées par l'onde ultrasonore (**Izella S, 2009**). Les propriétés de la vapeur du solvant interviennent aussi et leurs effets sont les mêmes que ceux du gaz (**Laugier, 2007**).

### ***e-Liquide***

Les propriétés du liquide qui peuvent influencer sur l'effet des ultrasons sont la tension de vapeur, la tension interraciale et la viscosité. Comme pour la température, une augmentation de la tension de vapeur du liquide facilite l'apparition de la cavitation mais réduit les pressions et températures atteintes dans la bulle lors de son implosion. Dans une moindre

mesure, la tension interfaciale et la viscosité affectent aussi le seuil de cavitation (**Izella S, 2009**). Plus elles sont élevées, plus la cohésion du fluide est forte et donc la cavitation sera plus difficile à obtenir. Indépendamment des ultrasons, les bulles formées sont plus petites si la tension interfaciale est élevée. La viscosité joue aussi un rôle important dans la propagation de l'onde car la viscosité augmente l'absorption de l'onde, c'est-à-dire que l'énergie acoustique est dégradée en chaleur et la zone active ultrasonore voit son volume diminuer. Mais le paramètre d'importance reste la tension de vapeur. (**Laugier, 2007**).

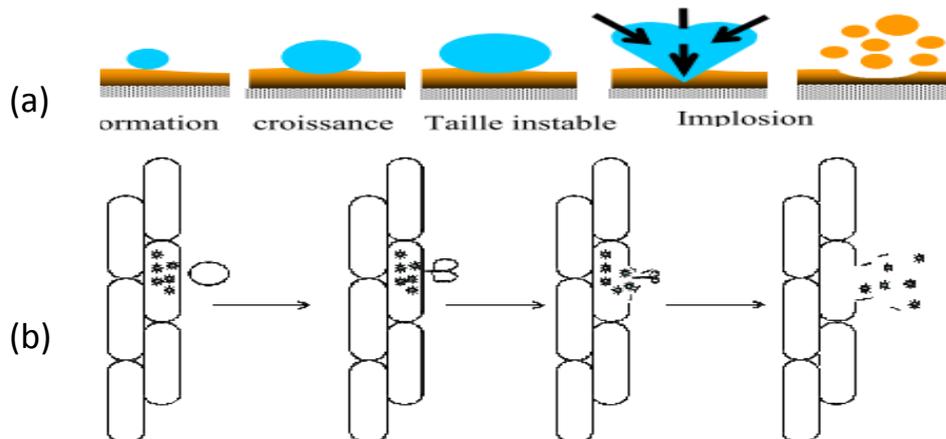
D'une manière synthétique, ces effets sont repris dans l'annexe I.

### II -2-3-3 Principe d'extraction

La propagation des ondes sonores dans les liquides soumis aux ultrasons à hautes intensités, induit des cycles de haute pression (compression) et de basse pression (raréfaction), avec des vitesses qui dépendent de la fréquence utilisée.

Au cours du cycle de basse pression, les ondes ultrasonores de haute intensité créent de petites bulles de vide dans le liquide (**Michel, 2012**).

Après un certain temps, les bulles ne peuvent pas continuer à absorber l'énergie des ultrasons et ne peuvent donc plus se développer, ce qui provoque leur éclatement. La compression rapide adiabatique du gaz et des vapeurs dans les bulles produit des températures extrêmement élevées (**Luque Garcia & Luque de Castro, 2003**). Ce qui mène à la libération des constituants des cellules par éclatement des parois (**Chemat, 2010**). (**Figure 7**)



**Figure 7** : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (a) et d'une cellule végétale (b) (**Chemat, 2010**).

### II -2-4 Extraction assistée par micro-ondes

La technologie d'extraction assistée par micro-ondes, appelée MAE (microwave-assisted extraction) ou MAP, s'applique dans les mêmes secteurs que les méthodes classiques. Appliquée à l'extraction de produits naturels, cette technologie innovatrice et écologiquement rationnelle favorise le développement durable dans la bio-économie (**Aimesther, 2008**).

**II-2-4-1 Généralités sur les Micro-ondes**

✚ Le rayonnement électromagnétique

Une onde électromagnétique peut être assimilée à un flux de particules sans masse appelées photons. Ces derniers se déplacent à la vitesse de la lumière ( $C_0$ ) dans le vide. Cette onde est caractérisée par la distance qu'elle parcourt à chaque oscillation, c'est à dire sa longueur d'onde ou par sa fréquence. La relation entre la longueur d'onde et la fréquence est décrite par l'Équation II (Grosin, 2006).

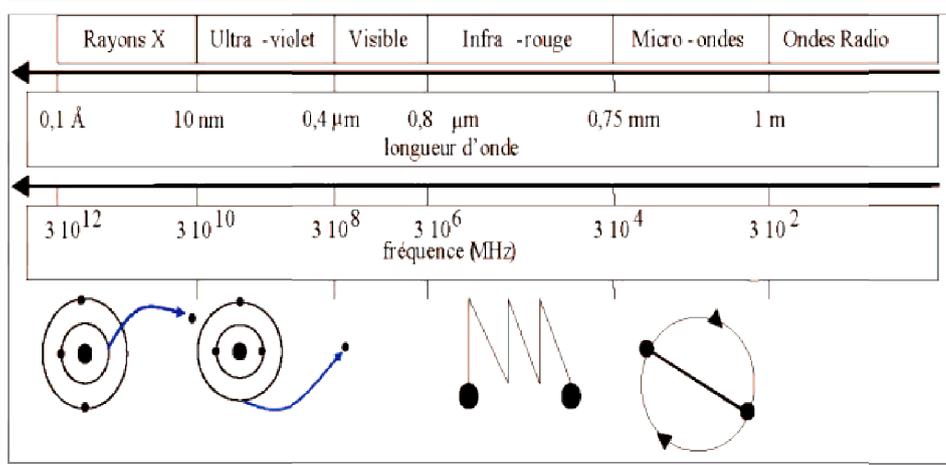
$$\lambda = \frac{c_0}{f} = \frac{2\pi c_0}{\omega} \dots\dots\dots(II)$$

$\lambda$  (m): Longueur d'onde  $c_0$  (m.s<sup>-1</sup>): Célérité  $f$  (s<sup>-1</sup> ou Hz): Fréquence  $\omega$  (rad.s<sup>-1</sup>): pulsation.

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques couvrant les gammes des ondes décimétriques UHF, centimétriques SHF et millimétriques EHF figure 8. Dans le spectre électromagnétique, les micro-ondes occupent une bande de fréquence de trois décades de 0.3 MHz à 300 MHz (Wang L, 2006).

Les longueurs d'ondes associées s'étalent de 1 millimètre à 1 mètre (voire figure 8). La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz correspondant à la fréquence de la majorité des magnétrons des fours micro-ondes de cuisine ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm (Lucchesi, 2005).

L'onde électromagnétique résulte d'un champ électrique E et d'un champ magnétique B se propageant dans l'espace et variant dans le temps. La propagation de cette onde obéit, quelle que soit la nature du milieu, aux équations de Maxwell, qui sont résumés dans le tableau II (Grossin, 2006). Le champ électrique est créé par une cathode interne et une anode externe avec une grande différence de potentielle entre elles. Le champ magnétique est imposé par les aimants permanents situés habituellement sur le fond du magnétron (voire figure 9) (Mutyala et al 2010).



**Figure 8:** gamme de fréquence micro-ondes et le spectre électromagnétique (Lucchesi, 2005).

**Tableau II:** Equations de maxwell (Grosin ; 2006).

Loi de Maxwell		Vecteurs champs	Charges électriques fixes / en mouvements	Perméabilité Permittivité Relative
$\vec{\text{rot}}(\vec{H}) = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$	$\text{div}(\vec{B}) = 0$	$\vec{B} = \mu \vec{H}$	$\rho_c$	$\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0}$
$\vec{\text{rot}}(\vec{E}) = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$	$\text{div}(\vec{D}) = \rho$	$\vec{D} = \varepsilon \vec{E}$	$\vec{J} = \sigma \vec{E}$	$\varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}$
<b>Avec :</b> $\vec{B}$ (Tesla) : Vecteur champ magnétique $\vec{H}$ (A.m <sup>-1</sup> ) : Excitation magnétique $\mu$ (H.m <sup>-1</sup> ) : Perméabilité magnétique du milieu $\mu_0=4\pi 10^{-7}$ H.m <sup>-1</sup> (air). $\mu_r$ : Perméabilité relative $\vec{D}$ (C.m <sup>-2</sup> ) : Vecteur déplacement		$\vec{E}$ (V.m <sup>-1</sup> ) : Champ électrique $\vec{J}$ (A.m <sup>-2</sup> ) : Densité de courant $\sigma$ (Ω <sup>-1</sup> .m <sup>-1</sup> ) : Conductivité électrique $\rho_c$ (C.m <sup>-3</sup> ) : Densité volumique de charges $\varepsilon$ (F.m <sup>-1</sup> ) : Permittivité du milieu $\varepsilon_0=8.8541.10^{-12}$ F.m <sup>-1</sup> (air). $\varepsilon_r$ : Permittivité relative		

### II -2-4-2 Technologie du four à micro-ondes

Un four micro-ondes est constitué de trois éléments principaux: un magnétron, un guide d'ondes et un applicateur ou une cavité micro-ondes. Les ondes électromagnétiques produites par le magnétron à une fréquence très élevée seront propagé dans le guide d'ondes en direction de l'applicateur dans lequel se trouve l'échantillon à traiter. Ces éléments constituent les pièces fondamentales d'un four micro-ondes. En outre, de nombreux éléments peuvent être ajoutés et adaptés en fonction des besoins de l'expérience (**Luque Garcia &Luque de Castro, 2003**).

#### a. Le magnétron

Le magnétron constitue le cœur du four micro-ondes, c'est lui qui sera à la base de la production d'énergie électromagnétique (**Cendres, 2010**).

Le magnétron est une diode thermoïonique cylindrique. Une diode est un tube à vide avec deux électrodes, l'anode et la cathode (voire figure 9). Cette diode est composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode qui attire les électrons par le champ électrique continu  $E_0$  (**Lucchesi, 2005**).

Le magnétron offre un rendement de l'ordre de 60 à 70%. La puissance perdue sert au chauffage de la cathode où est dissipée par effet Joule dans l'anode du magnétron (**Grossin, 2006**).

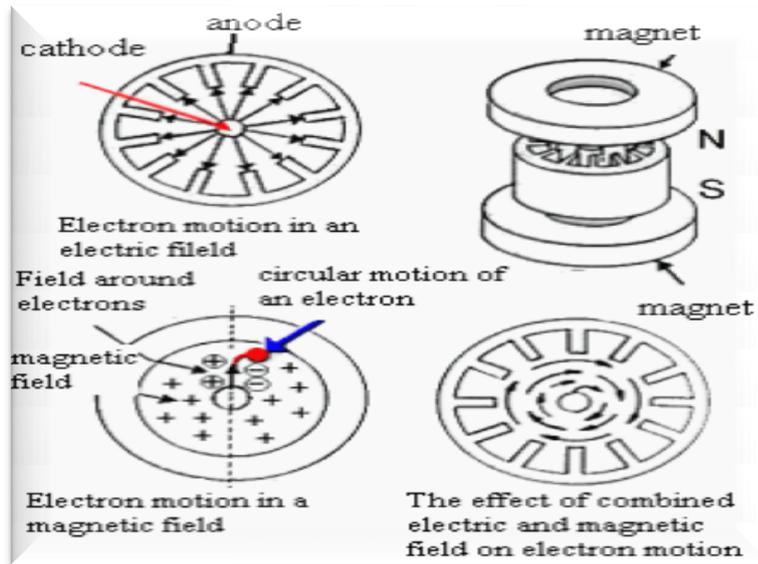


Figure 9 : les différentes parties du magnétron (Mihaela , 2007).

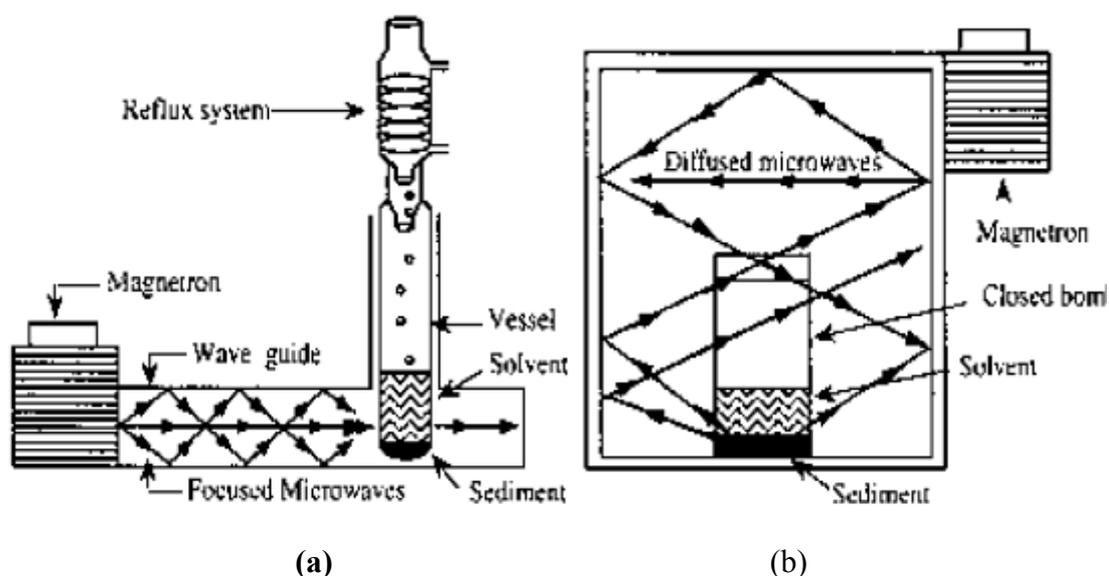
### ***b. Guide d'onde***

Après avoir été libéré, les ondes électromagnétiques vont être envoyées dans un guide d'onde en vue de leur propagation dans l'applicateur. Le guide d'onde est conducteur creux recouvert d'un métal conducteur (Cendres, 2010).

### ***c. L'applicateur***

Deux grandes catégories d'applicateurs existent: les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes :

- L'applicateur dit *monomode* ne permet qu'un seul mode de propagation de l'onde (voire figure 10 a). Ce résultat est obtenu en aménageant une ouverture dans un guide d'ondes pour y introduire le produit à traiter (Anizon et al, 2003).
- L'applicateur *multimode* consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configurations de champ (voire figure 10 b). Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. On préfère donc utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu (Lucchesie, 2005).



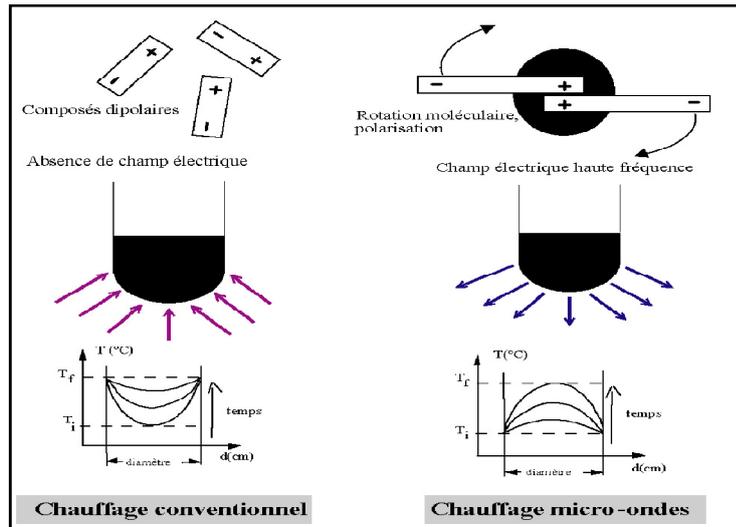
**Figure 10:** Schéma d'un four micro-ondes monomode (a) et multimode (b)  
(Mandal V, 2007).

➤ Le choix de la cavité

En fonction du type d'étude désiré, le choix de la cavité micro-onde peut être primordial. Si le but est de réaliser des essais sur de petites quantités, de réaliser des études très précises, d'étudier l'impact des micro-ondes, leurs effets sur la matière ou sur un processus chimique, les cavités monomode seront privilégiées. L'échantillon pourra être placé dans un maximum de champ électrique et ainsi permettre une efficacité optimale (Cendres 2010).

### II-2-4-3 Le chauffage micro-onde

Contrairement au chauffage conventionnel par conduction thermique, l'agitation moléculaire est la source principale de production de chaleur pour le chauffage par micro-ondes. Ainsi, la matrice, le mélange ou le volume traité absorbe l'énergie directement et s'échauffe rapidement, devenant lui-même source de chaleur. Les parois externes du récipient sont plus froides que le cœur de la solution, la figure 11 illustre ces deux modes de chauffage et présente le mécanisme du chauffage par micro-ondes et l'inversion des phénomènes de transfert de chaleur induit. Cependant, la présence d'un champ électromagnétique induit des gradients de température inversés par rapport à un chauffage conventionnel (Cendres, 2010).

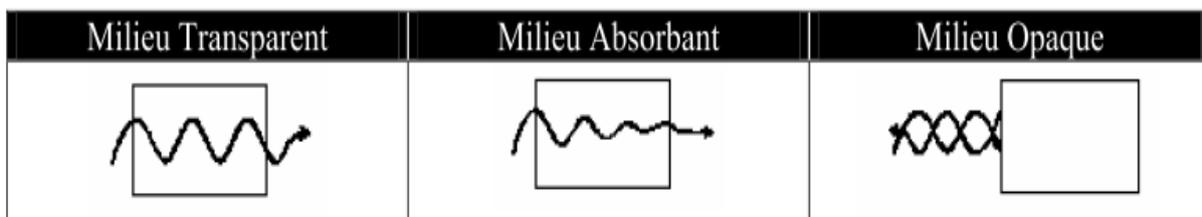


**Figure 11:** Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage conventionnel et micro-ondes (Lucchesie, 2005).

**II -2-4-4. Interaction ondes-matière**

Lorsque la matière est irradiée par une onde électromagnétique, plusieurs comportements sont possibles (voir figure 12) (Grossin, 2006).

- Le matériau est transparent, l'onde électromagnétique est transmise sans perte d'énergie.
- Le matériau est absorbant, une fraction plus ou moins importante de l'énergie de l'onde est absorbée.
- Le matériau est opaque, l'onde est réfléchi.



**Figure 12 :** Comportements de la matière vis à vis d'une onde électromagnétique (David GROSSIN).

**a. En absence d'un champ électrique**

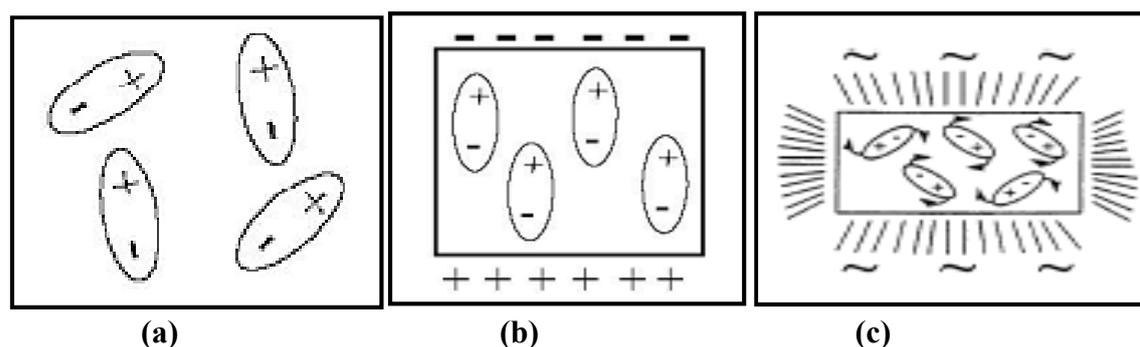
Les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives: ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu (voire figure 13 a) (Lucchesi, 2005).

### **b. En présence d'un champ électrique continu**

Les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le champ électrique est intense moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a de l'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, il apparaît un moment dipolaire global induit (voire figure 13 b) (Lucchesi, 2005).

### **c. En présence d'un champ électrique alternatif**

Les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance: c'est la rotation dipolaire (voire figure 13 c) (Lucchesi, 2005).



**Figure 13** : Etat des molécules sous champ électrique (a) : absence du champs électrique.(b)champs électrique continu (c) : champs électrique alternatif (Perreu et loupy, 2001).

## **II -2-4-5 Propriétés diélectriques du solvant**

L'interaction du solvant avec les micro-ondes dépend des propriétés diélectriques du solvant. La meilleure approximation pour la comparaison des différents solvants est de comparer leur facteur de dissipation qui est défini par la capacité de solvant à absorber l'énergie micro-ondes et l'efficacité avec laquelle l'absorption de cette énergie est convertie en chaleur, le facteur de dissipation est donné par l'équation :

$$\tan\delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \dots\dots\dots(III)$$

D'où :  $\epsilon'$  La constante diélectrique qui set la mesure de la capacité d'absorbé l'énergie de micro-ondes,  $\epsilon''$  le facteur de pertes diélectrique qui indique l'efficacité de l'énergie convertissant de micro-ondes en chaleur (Mandal et al, 2007).

Le tableau III énumère les constantes diélectriques et facteurs de dissipation pour des solvants généralement utiliser dans MAE (Mandal et al, 2007).

**Tableau III:** constantes diélectriques et facteurs de dissipation de quelques solvants.

Solvant	Constante diélectrique ( $\epsilon'$ )	Facteur de dissipation ( $\tan \delta$ )
Acétone	20,6	0,054
Ethanol	124,6	0,94
Méthanol	32,7	0,659
Eau	80,4	0.123
Acetonitrile	37,5	/
Hexane	1,89	/
2-propanol	19,9	0,67

#### **II -2-4-6 Principe de l'extraction**

Le processus d'extraction est basé sur la capacité d'une matrice à absorber l'énergie micro-ondes. L'efficacité d'absorption est largement liée à la teneur en eau de la matrice végétale. Les molécules d'eau convertissent l'énergie des micro-ondes en chaleur, résultant une élévation soudaine de la température à l'intérieur de la matrice. Lorsque les cellules végétales sont soumises à un chauffage thermique sévère, qui dépasse leur capacité d'extension, cela cause leur dislocation plus rapidement et mène le dégagement de leur contenu au milieu de l'extraction (Chemat et al, 2010).

#### **II -2-4-7 Facteurs influençant l'extraction assistée par micro-ondes**

Lors de l'extraction assistée par micro-ondes, comme pour toute autre technique d'extraction, le rendement repose en la connaissance des paramètres influant sur la nature et la cinétique du transfert de masse du solide vers le solvant. Les paramètres les plus étudiés sont: le temps d'extraction, la température, la puissance de micro-onde et de la nature du solvant (Camel, 2000).

##### ***a. Puissance micro-ondes***

L'intensité de la puissance des micro-ondes appliquée est étroitement liée à une quantité d'énergie assurée à l'échantillon qui est converti en énergie calorifique dans le matériel diélectrique en augmentant sa température (Ma et al, 2009). Généralement, il a été observé qu'il y a une augmentation du rendement d'extraction via l'augmentation de puissance de micro-ondes (Nemes & Orsat, 2009).

##### ***b. Temps d'extraction***

Comme dans d'autres techniques d'extraction, le temps est un autre paramètre dont l'influence doit être prise en considération. Dans plusieurs études rapportées, le rendement d'extraction change avec l'augmentation ou la diminution du temps d'extraction (Wang & Weller, 2006).

##### ***c. La température***

La température affecte directement la cinétique du transfert de masse du solide vers le solvant donc l'efficacité de l'extraction. Cependant, l'utilisation de composés organiques inflammables peut poser des risques d'incendie. La température doit aussi tenir compte de la nature des solutés pour éviter leur dégradation lors de l'irradiation. La température dépend principalement du solvant, de la matrice et de la puissance du micro-onde (Camel, 2000).

##### ***d. Nature du solvant***

La plupart du temps, l'absorption et donc le réchauffement sont proportionnels à la polarité du solvant (Camel, 2000). Les solvants peuvent être combinés afin d'atteindre les caractéristiques de solvation et le chauffage par micro-ondes nécessaires.

# Partie Pratique

# Chapitre III

Matériels et méthodes

### III-1 Matériel végétal

Les feuilles de *Myrtus communis* et de *Pystacia lentiscus* ont été cueillies dans la région de Béjaïa, commune d'Oued Ghir pendant le mois d'août 2011.

Les feuilles ont été bien lavées, afin d'éliminer toutes les impuretés, le séchage a été réalisé en deux étapes, d'abord un pré-séchage à l'air libre afin d'éliminer l'excès d'eau, puis un séchage à l'étuve à 40°C pendant 5 à 6 jours.

Une fois la plante séchée, les feuilles sont broyées (broyeur IKA model A11 basic), tamisées par un tamiseur (Retch, Allemagne), afin d'obtenir une poudre fine et homogène avec une granulométrie inférieure à 125 µm. Enfin, cette dernière est conservée dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière. Cette poudre présente une activité de l'eau  $a_w = 0,21$  à température  $T^\circ = 20^\circ\text{C}$ .

### III -2 Taux d'humidité

#### ➤ *Principe*

La teneur en eau est déterminée sur une partie aliquote de 1 g d'échantillon broyé étalé dans une capsule en porcelaine puis séché dans une étuve, à une température de 105°C (Amellal, 2008).

#### ➤ *Expression des résultats*

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \cdot 100 \dots\dots\dots (IV)$$

D'où :

H% : humidité.

$M_1$  : masse de la capsule + matière fraîche avant étuvage.

$M_2$  : masse de la capsule + matière fraîche après étuvage.

P : masse de la prise d'essai.

Matière sèche % = 100 – H%.	..... (V)
-----------------------------	-----------

### III -3 Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes

Afin de valoriser les produits végétaux, une méthodologie expérimentale pour l'extraction des substances bioactives du matériel végétale a été mise en place. D'abord on doit procéder à la recherche des différents facteurs qui jouent un rôle indispensable lors de la procédure d'extraction, et qui sont contrôlés par des logiciels informatiques (JMP® (ver 7.0) plans d'expériences et Experimental Design), afin de déterminer les niveaux (bas et haut) de chaque facteur. Puis on va passer au choix du plan d'expérience adéquat à l'étude.

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais. On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum.

La méthodologie de surface de réponse (MSR) est une combinaison de plan d'expérience statistique, de modélisation empirique et de techniques d'optimisation mathématique employée pour améliorer la performance des processus et des produits (**Myers et Montgomery, 2002**).

La méthodologie de surface de réponse (MSR) vise à proposer des formulations analytiques explicites des résultats d'un système dans le but de réaliser des calculs de fiabilité (**Rguig, 2005**).

### **III -4 Étude préliminaire**

Avant l'optimisation, nous avons identifié les facteurs qui ont des effets importants sur l'extraction à savoir: type de solvant, la concentration du solvant, la durée, le ratio, la puissance pour le micro-ondes et l'amplitude pour le sonicateur, et le niveau (bas et haut) de chaque facteur est déterminé.

#### **III -4-1 Choix du solvant**

Le choix de solvant est fondamental pour le processus d'optimisation de l'extraction assistée par Micro-ondes et ultrasons, il est considéré comme étape clé pour l'extraction (**Mandal et al., 2007**).

L'extraction a été conduite en utilisant quatre différents solvants (v/v): méthanol 50%, éthanol 50 %, acétone 50 % et eau, sachant que le temps et la puissance d'extraction sont fixés à 2 minutes et 500 watt respectivement. Le meilleur solvant a été choisi sur la base de contenu le plus élevé en flavonoïdes en EAG/g de la poudre.

#### **III -4-2 Concentration de solvant**

La meilleure concentration de solvant a été déterminée en utilisant le meilleur solvant choisi dans l'étape précédente, en allant de 20 à 80 % (v/v). Des procédures d'extraction ont été répétées comme décrit précédemment. La meilleure concentration de solvant a été choisie en se basant sur le rendement le plus élevé en flavonoïdes en EQ/g de la poudre.

#### **III -4-3 Temps de l'extraction**

Le temps est un paramètre dont l'influence doit être prise en considération. Généralement, l'augmentation du temps d'extraction conduit à l'accroissement de la teneur en composés bioactifs, bien qu'il y ait un risque de dégradation (**Mandal et al, 2007**).

Ainsi, l'impact du temps d'extraction (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et 240 secondes) sur les flavonoïdes a été étudié. L'extraction était accomplie en appliquant le meilleur solvant à une concentration de 50 % et une puissance de 500 watt. Le meilleur temps d'extraction a été choisi sur la contenance la plus élevée de l'extrait en flavonoïdes en EQ/g de la poudre.

### III - 4-4 Puissance d'extraction (pour micro onde)

Dans cette étape, nous avons fixé les quatre paramètres suivant : % solvant, le temps d'extraction, et le ratio, tout en variant la puissance (200, 400, 500, 600, 800 watt). La meilleure puissance d'extraction a été choisie sur la base de la valeur la plus élevée de flavonoïdes en EQ/g de la poudre.

### III -4-5 Amplitude (pour l'ultra-son)

Dans cette étape, les quatre paramètres suivant : % solvant, le temps d'extraction, et le ratio, tout en variant l'amplitude (20, 30, 50, 70, 80%) ont été fixé. La meilleure amplitude a été choisie sur la base de la valeur la plus élevée de flavonoïdes en EQ/g de la poudre.

### III -4-6 Ratio (liquide / solide)

Enfin, nous avons procédé à la détermination du domaine d'étude du ratio (liq/Sol), en fixant le solide (1g de la poudre) et en variant le liquide : 15, 20, 25 et 30 ml. Les autres paramètres déterminés précédemment sont aussi fixés. Le meilleur ratio d'extraction a été choisi sur la base de la valeur la plus élevée de flavonoïdes en EQ/g de la poudre.

### III -5 Conception expérimentale (BBD et CCD)

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 «  $x_i$  ».

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences (Goupy, 2006).

Box et Behnken ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux  $[-1, 0, +1]$ . Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des  $k$  premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués (Goopy et ghrington, 2005).

La conception également appelée de composites centrales (CCD) se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet ou fractionnaire complété par des points au centre. Pour vérifier la validité du modèle PDAI (termes du premier degré et termes d'interactions). Si les tests de validation sont positifs (la réponse mesurée au centre du domaine est statistiquement égale à la réponse calculée au même point), l'étude s'achève le plus souvent, mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré. Les essais supplémentaires sont représentés par des points d'expériences situés sur les axes de coordonnées et par de nouveaux points centraux. Les points situés sur les axes de coordonnées sont appelés les points en étoile (Goopy et ghrington, 2005).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes appliqués à la réalisation d'un plan de Box-Behnken de trois niveaux pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes : % solvant, le temps, la puissance et le ratio (liquide-solide) qui sont désignés par  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_4$  respectivement pour l'extraction par micro-ondes. Et d'un plan CCD pour évaluer l'effet

combiné de trois variables indépendantes : % solvant, le temps et l'amplitude qui sont désignés par  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  pour l'extraction par ultrason.

L'étude préliminaire effectuée, a permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans les tableaux suivants :

**Tableau IV:** Les variables indépendantes et les niveaux de facteurs influençant sur l'extraction assistée par micro-ondes.

Les variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
$X_1$ : Ethanol (%)	20	40	60
$X_2$ : Temps (S)	30	60	90
$X_3$ : Puissance (W)	400	500	600
$X_4$ : Ratio (Liquide/Solide)	20	30	40

Selon la formule  $N = 2k(k-1) + C_p$ ..... (VI) ; 27 essais seront réalisés de manière à pouvoir estimer le model mathématique de la réponse investiguée.

Où :  $N$  : est le nombre d'expériences.

$k$  : est le nombre de facteurs.

$C_p$  : est le nombre de points centraux (Bezerra et al 2008).

**Tableau V:** Les variables indépendants et les niveaux de facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultra-son.

Les variables indépendants	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
$X_1$ : Éthanol (%)	30	50	70
$X_2$ : Temps (min)	5	10	15
$X_3$ : amplitude	30	50	70

11 essais seront réalisés de manière à pouvoir estimer le model mathématique de la réponse investiguée ; si les testes de validations sont négatifs on entreprend des essais supplémentaires (19).

Lorsqu'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur et la valeur +1 au niveau haut, on effectue deux modifications importantes :

– On déplace l'origine des mesures

– On change l'unité de mesure. On donne le nom de **Pas** pour la nouvelle unité,

Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (v.c.r) : centrées pour indiquer le changement d'origine et réduites pour signaler la nouvelle unité. On utilise également le terme de variables codées ou d'unités codées. Le passage des variables d'origine **A** aux variables codées **x**, et inversement, est donné par la formule suivante (**A<sub>0</sub>** est la valeur centrale en unités courantes) :

$$\mathbf{x} = \frac{(\mathbf{A} - \mathbf{A}_0)}{\mathbf{P a s}} \dots \dots \dots \text{(VII) (Goopy et Ghrighton, 2005).}$$

L'intérêt des unités codées est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. La théorie des plans d'expériences présente ainsi une grande généralité. L'utilisation des v.c.r est très répandue dans les logiciels de plans d'expériences et certaines opérations comme la recherche des meilleurs points d'expériences par le critère de D-optimalité ne sont réalisables qu'avec ces variables. Les variables codées résultent du rapport de deux grandeurs de même unité physique, elles sont donc sans dimension. La disparition des unités naturelles associée au fait que tous les facteurs ont le même domaine de variation (deux unités codées) permet la comparaison directe des effets des facteurs entre eux (**Goopy et Ghrighton, 2005**).

Les plans d'expériences seront utilisés afin de réaliser l'analyse de données et interprétations ainsi que les réponses. La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-dessus :

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{12}X_1X_2 + a_{23}X_2X_3 + a_{34}X_3X_4 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{24}X_2X_4 + a_1X_1^2 + a_2X_2^2 + a_3X_3^2 + a_4X_4^2 + E \dots \dots \dots \text{(VIII)}$$

Avec :  $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_{12}, a_{23}, a_{34}, a_{13}, a_{14}$  et  $a_{24}$  : sont les coefficients de régression,

$X_1, X_2, X_3$  et  $X_4$  : sont les facteurs étudiés,

$y$  : est la réponse mesurée,

Et :  $E$  : est l'erreur.

### III -6 Procédures d'extraction

#### III -6-1 Extraction par micro-ondes

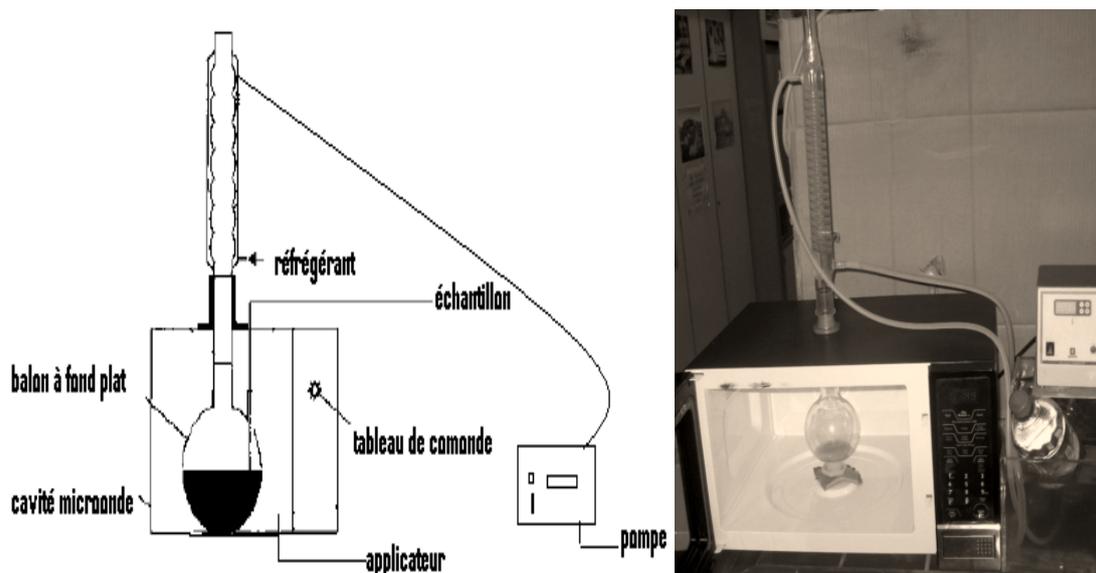


Figure14 : appareillage d'un four micro-onde utilisé pour EAM.

Les flavonoïdes sont extraits à partir des feuilles des plantes de *Myrtus communis* et *Pystacia lentiscus* en utilisant un four à micro-ondes domestique modifié (multi modes, Samsung) qui fonctionne à une fréquence de 2450 MHz et une puissance de sortie maximale de 1000W avec une incrémentation de 100W. La dimension de la cavité de chauffage est de 22,5 cm 37,5 cm 38,6 cm (Figure 14). Prototype conçu et réalisé au laboratoire **BBBS**.

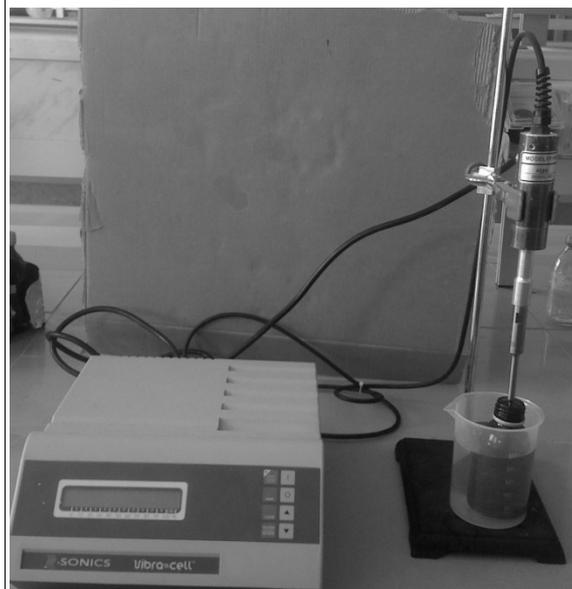
Le solvant est additionné à 1g d'échantillon dans des ballons à fond plat. Le mélange est irradié puis filtré à l'aide d'une pompe sous vide en utilisant un filtre (verre frité) de diamètre 4  $\mu\text{m}$ .

27 essais ont été réalisés avant d'obtenir l'optimum pour les deux plantes, puis on a réalisé une extraction dans les conditions optimales obtenues (**Hayat et al., 2009**).

#### III -6-2 Extraction par ultrason

Les flavonoïdes sont aussi extraits à partir des feuilles des plantes de *myrtus communis* et *Pystacia lentiscus*, en utilisant un sonicateur (Sonics, vibra cell, model vcx) qui fonctionne à une fréquence de 20 KHz et une puissance de 130W figure 15.

1g d'échantillon est mélangé avec le solvant dans des flacons puis soumis aux ondes sonores.



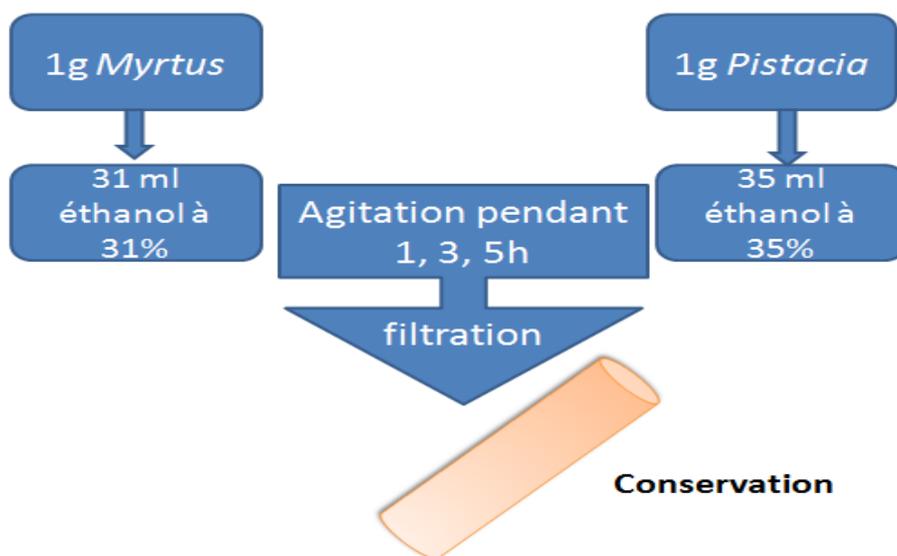
**Figure 15:** Appareillage de sonication utilisé pour EAM.

19 essais ont été réalisés afin d'obtenir l'optimum pour les deux plantes, puis on a réalisé une extraction dans les conditions optimales obtenues.

### III-6-3 Extraction par macération

Après extraction aux micro-ondes et ultrasons, des extractions par macération-agitation sont réalisées pour permettre la comparaison. Le solvant qui a donné le meilleur rendement dans l'extraction aux micro-ondes a été utilisé dans l'extraction conventionnelle. L'extraction a été réalisée à différents temps 1, 3 et 5 heures.

La procédure d'extraction des flavonoïdes à partir de *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis* est schématisée dans la figure 16.



**Figure 16 :** procédure d'extraction des flavonoïdes par macération.

### III-7 Dosage des polyphenols totaux

- **Principe**

En milieu basique et en présence de composés phénoliques, le mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) est réduit en oxydes bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) lors de l'oxydation des polyphenols. La coloration bleu obtenue est proportionnelle au taux des composés phénoliques (**Brat P,2005**).

- **Procédure analytique :**

La quantité des polyphenols contenue dans l'extrait exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche.

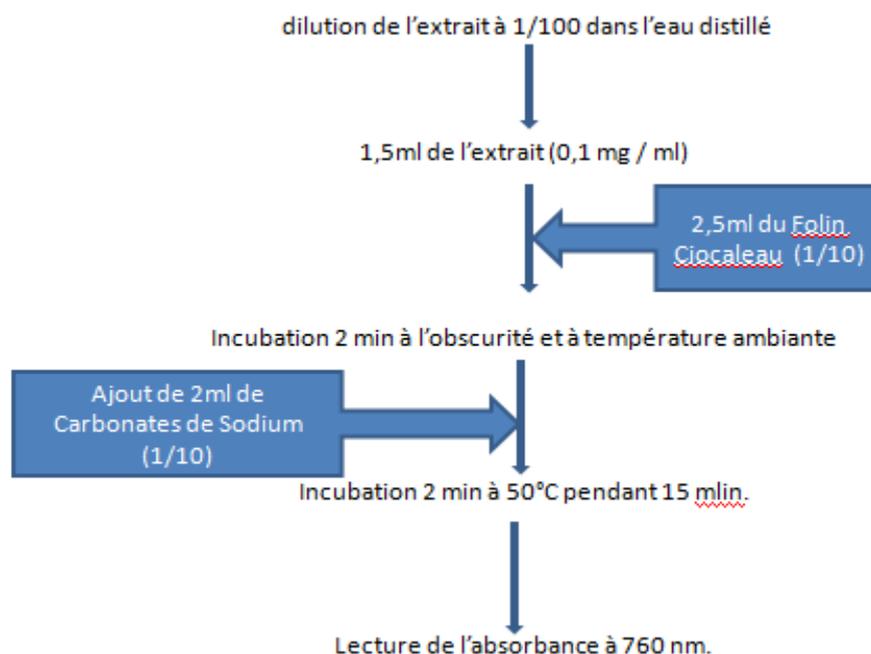


Figure 17 : Protocole du dosage des polyphenols (**Brat P, 2005**).

### III-8 Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement (CO), un complexe en présence de chlorure d'Aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium) (**Ribereau-Gayon, 1968**).

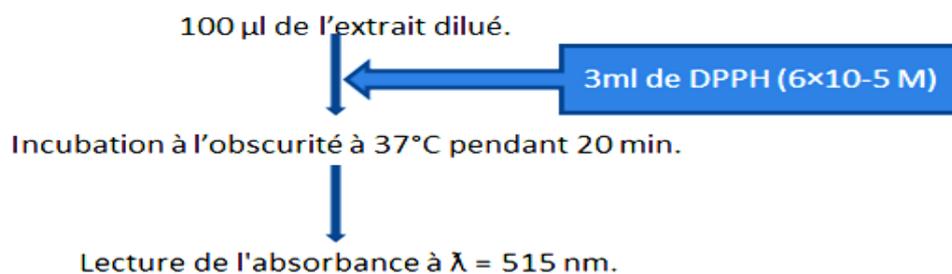
- **Procédure analytique**

La détermination de la quantité des flavonoïdes totaux contenue dans les feuilles de *Myrtus* et *Pistacia* est réalisée par la méthode colorimétrique de **Djeridane et al., 2006**.

La quantité des flavonoïdes contenue dans l'extrait est calculée par référence à une gamme d'étalonnage établie avec la quercitrine.



- **Procédure analytique**



**Figure 19:** Protocole de l'effet scavenger du DPPH (Roberta Re *et al.*, 1998 ; Boulekbache, 2013).

### III - 9-2 Pourcentage d'inhibition de l'ABTS

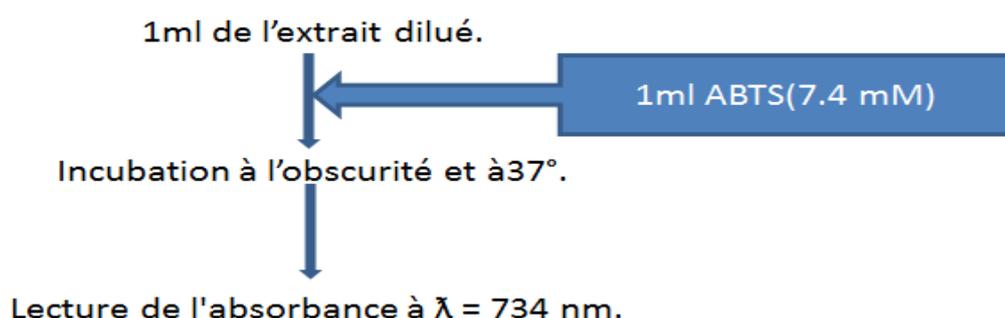
- **Principe**

A une température ambiante et en solution le cation radical ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)], présente une coloration bleuâtre due à la réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques par un antioxydant s'accompagne d'une décoloration (Roberta Re *et al.*, 1998).

La décoloration d'ABTS<sup>•+</sup> mesurée par un spectrophotomètre est un résultat de sa réduction par des atomes d'Hydrogène données par l'échantillon.

BHA et  $\alpha$ -tocophérol sont utilisées comme standards

- **Procédure analytique**



**Figure 20 :** Protocole d'étude de l'effet scavenger de l'ABTS (Roberta Re *et al.*, 1998).

# Chapitre IV

## Résultats et discussions

### IV-1 Taux d'humidité

Les teneurs en eau (en % d'humidité) pour les deux poudres de *Pistacia* et *myrtus* sont données dans le tableau VI.

**Tableau VI:** teneur en eau et matière sèche des poudres.

	<i>Pistacia</i>	<i>Myrtus</i>
Taux d'humidité (%)	5%	7%
Teneur en matière sèche (%)	95%	93%

La teneur en eau des échantillons sont de l'ordre de : 5% pour *Pistacia* et 7% pour *Myrtus*, cette légère différence est due probablement aux conditions du séchage et du stockage.

La teneur en eau du *Pistacia* est proche à celle obtenue par **Shahnaz et al. (2004)** qui est de 4,85%.

Le taux d'humidité a une grande importance, car la présence de l'eau est considérée comme un élément gênant de l'extraction des polyphénols, de plus, c'est une source d'oxydation (**Cork et Krockenberger, 1991**).

### IV -2 Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes

#### IV -2-1 Extraction par micro-onde

En se basant sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante : concentration en éthanol ( $X_1$ ), puissance de l'extraction ( $X_2$ ), temps de l'extraction ( $X_3$ ) et du ratio ( $X_4$ ) influençant les flavonoïdes ont été introduits dans le plan BBD.

Les données expérimentales obtenues à partir des 27 essais sont illustrées dans l'annexe II a et b.

Annexe II (a) : valeurs expérimentales et prédites de l'EAM du plan BBD pour *Myrtus*.

Annexe II (b) : valeur expérimentale et prédites de l'EAM du plan BBD pour *Pistacia*

Les teneurs en flavonoïdes mesurées par la méthode du chlorure d'Aluminium des extraits obtenus dans les différentes conditions expérimentales, varient entre 1,94 et 3,22mg EQ/g de poudre du *Pistacia* et entre 2,27 et 4.47 mg EQ/g de poudre du *Myrtus*. Cette variation confirme l'influence des quatre facteurs sur l'extraction. En effet, l'importance de ces facteurs a été démontrée par plusieurs auteurs (**Uma et al, 2010. Chan et al, 2009. Shi et al, 2003**)

#### IV -2-2 Extraction par ultrasons :

Les gammes de chaque variable indépendante, concentration en éthanol ( $X_1$ ), puissance de l'extraction ( $X_2$ ) et temps de l'extraction ( $X_3$ ) influençant l'extraction des flavonoïdes ont été introduites dans le plan CCD.

Les données expérimentales obtenues à partir des 19 essais sont illustrées dans les tableaux l'annexe III a et b.

Annexe III (a) : valeur expérimentale et prédites de l'EAU du plan CCD pour *myrtus*.

Annexe III (b) : valeur expérimentale et prédites de l'EAU du plan CCD pour *Pistacia*.

Les teneurs en flavonoïdes mesurées par la méthode du chlorure d'Aluminium des extraits obtenus à partir des différentes conditions expérimentales, varient entre 3,86 et 5,97 mg EQ/g pour la poudre *Pistacia* et entre 2,75 et 5,50 mg EQ/g pour la poudre du *Myrtus*. Cela est dû à l'influence des trois facteurs sur l'extraction (**Zhong et al., (2010). Ozkan, (2006)**).

### IV -3 Analyse des résultats :

#### IV -3-1 Plan d'expérience BBD (pour EAM)

##### IV -3-1-1 Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de variance (ANOVA) du rendement d'extraction des flavonoïdes permet de tester l'influence des variables indépendantes utilisées dans les modèles et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée.

L'ANOVA de la régression du plan montre qu'elle est significative à cause de sa faible probabilité ( $P < 0.0001$ ), la valeur de *F-ratio* (29.83 et 10.09) et un facteur de corrélation  $R^2$  élevé (0.97 et 0.92), pour le modèle décrivant la réponse expérimentale (*y*) de la teneur en flavonoïdes extraite à partir des feuilles de *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* (voir tableau VII (a) et (b)). Ces résultats statistiques montrent que le modèle est significatif.

D'autre part, les deux probabilités du manque d'ajustement sont très élevées ( $P \gg F$ ). Par conséquent, les deux modèles validés, expriment la teneur en flavonoïdes en fonction des quatre facteurs à optimiser (solvant, puissance du micro-onde, temps et ratio) (**Tinsosn, 2010. Granato et al., 2011**). Le plan de Box-Behnken est efficace pour optimiser les conditions d'extraction des substances bioactives en général et des flavonoïdes en particulier, à partir des poudres des deux plantes utilisées. En effet, l'efficacité du plan BBD a été démontré par plusieurs auteurs (**Ferrera et al., 2007. Dong et al 2009. Tripathi et al 2009**).

**Tableau VII (a) :** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le BBD de la surface de réponse. (Cas du *Myrtus*)

Term	Sum of Squares	DF	MC	Estimate	Ecart type	t Ratio	Prob> t	f Ratio
Intercept	8,95289	14	0,6394	3,1040	0,0845	36,72	<,0001*	29,8311
X <sub>1</sub>	4,0605	1	4,0605	0,5817	0,0422	13,76	<,0001*	189,418
X <sub>2</sub>	0,0012	1	0,0012	-0,0100	0,0422	-0,24	0,8163	0,056
X <sub>3</sub>	0,0457	1	0,0457	-0,0617	0,0422	-1,46	0,1698	2,133
X <sub>4</sub>	0,0208	1	0,0208	0,0416	0,0422	0,99	0,3438	0,971
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	0,3780	1	0,3780	-0,3074	0,0732	-4,2	0,0012*	17,634
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	0,1567	1	0,1567	0,1979	0,0732	2,7	0,0192*	7,312
X <sub>1</sub> *X <sub>4</sub>	0,0251	1	0,0251	-0,079	0,0732	-1,08	0,2996	1,175
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	0,1901	1	0,1901	0,2180	0,0732	2,98	0,0115*	8,869
X <sub>2</sub> *X <sub>4</sub>	0,0263	1	0,0263	0,0811	0,0732	1,11	0,2891	1,23
X <sub>3</sub> *X <sub>4</sub>	0,0009	1	0,0009	-0,0155	0,0732	-0,21	0,8358	0,044
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	1,1536	1	1,1536	0,4650	0,0633	7,34	<,0001*	53,815
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	0,1377	1	0,1377	-0,1607	0,0633	-2,53	0,0262*	6,424
X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>	0,5257	1	0,5257	-0,3139	0,0633	-4,95	0,0003*	24,524
X <sub>4</sub> *X <sub>4</sub>	1,0663	1	1,0663	-0,4471	0,0633	-7,05	<,0001*	49,744
lack of fit	0,2352	10	0,0235				0,360	2.14
pure error	0,0219	2	0,0198					
total error	0,2572	12						
C. Total	9,2161	26						
R <sup>2</sup>	0,972							
R <sup>2</sup> Adj	0,93							
RMSE	0,1464							

\*: effect significatif.

**DF: Degree of freedom.**

**MC: Moyenne des carrés.**

**Tableau VII (b) :** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le BBD de la surface de réponse. (Cas de *Pistacia*)

Term	Sum of Squares	D L	Mean of Squares	Estimate	Ecart type	t Ratio	Prob> t	f Ratio
Intercept	2,0671	14	0,1476	2,4995	0,0698	35,79	<,0001*	10,092
X <sub>1</sub>	0,4217	1	0,4217	0,1874	0,0349	5,37	0,0002*	28,82
X <sub>2</sub>	0,0243	1	0,0243	-0,0450	0,0349	-1,29	0,2217	1,66
X <sub>3</sub>	0,0003	1	0,0003	-0,0050	0,0349	-0,14	0,8881	0,02
X <sub>4</sub>	0,4169	1	0,4169	-0,1864	0,0349	-5,34	0,0002*	28,49
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	0,0125	1	0,0125	-0,0561	0,0604	-0,93	0,3719	0,86
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	0,0846	1	0,0846	-0,1455	0,0604	-2,41	0,0332*	5,78
X <sub>1</sub> *X <sub>4</sub>	0,0945	1	0,0945	-0,1537	0,0604	-2,54	0,0259*	6,45
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	0,0748	1	0,0748	-0,1368	0,0604	-2,26	0,043*	5,11
X <sub>2</sub> *X <sub>4</sub>	0,1145	1	0,1145	0,1692	0,0604	2,8	0,0161*	7,82
X <sub>3</sub> *X <sub>4</sub>	0,2591	1	0,2591	0,2545	0,0604	4,21	0,0012*	17,71
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	0,0636	1	0,0634	0,1092	0,0523	2,09	0,0091*	4,35
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	0,0202	1	0,0202	-0,0615	0,0523	-1,18	0,2625	1,382
X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>	0,2983	1	0,2980	-0,2364	0,0523	-4,52	0,079	20,38
X <sub>4</sub> *X <sub>4</sub>	0,0115	1	0,0115	0,0465	0,0523	0,89	0,3919	0,78
lack of fit	0,1498	10	0,0149				0,547	1,163
Pure error	0,0257	2	0,0128					
total error	0,1755	12						
R <sup>2</sup>	0,9217							
R <sup>2</sup> Adj	0,8303							
RMSE	0,1209							

#### IV -3-1-2 Modèle mathématique

Connaissant les valeurs du coefficient a<sub>0</sub>, les coefficients linéaires, les coefficients des interactions et quadratiques de chaque facteur, ces valeurs sont rapportées dans la fonction de y, le modèle mathématique postulé est un modèle polynomial de second degré présenté par les relations suivantes :

$$Y = 3,104 + 0,58x_1 - 0,010x_2 - 0,061x_3 + 0,041x_4 - 0,030x_1x_2 + 0,218x_2x_3 - 0,015x_3x_4 + 0,197x_1x_3 - 0,079x_1x_4 + 0,08x_2x_4 + 0,465x_1^2 - 0,160x_2^2 - 0,313x_3^2 - 0,447x_4^2 + E \text{ (Myrtus EAM).}$$

$$Y = 2,499 + 0,187x_1 + 1,187x_2 - 0,005x_3 - 0,186x_4 - 0,056x_1x_2 - 0,136x_2x_3 + 0,254x_3x_4 - 0,145x_1x_3 - 0,153x_1x_4 + 0,169x_2x_4 + 0,109x_1^2 - 0,061x_2^2 - 0,236x_3^2 + 0,046x_4^2 + E \text{ (Pistacia EAM).}$$

### IV- 3-1-3 Effets des facteurs

L'analyse de variance de la régression des coefficients consiste ainsi à analyser l'influence des variables ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ). Ces dernières seraient plus significatives à des valeurs plus grandes de  $F$  et le plus petit  $P$  (Zhong et al 2010). Les résultats sont illustrés dans les tableaux VII (a) et (b).

#### a- Effet linéaire

Le tableau VII (a) montre que le facteur qui influence d'une manière hautement significative pour le Myrtus est la concentration du solvant ( $X_1$ ) avec une probabilité  $P < 0.0001$ , et  $F$ -ratio ( $F = 189.41$ ). Cependant l'impact est non significatif pour les autres facteurs.

Le tableau VII (b) montre que deux facteurs influencent de manière significative le taux des flavonoïdes pour la matrice de *Pistacia* ; la concentration du solvant et le ratio (liq/sol) avec une même valeur de  $P$  (0.0002). Par contre l'influence de la puissance du micro-onde et du temps est non significative.

Ces résultats mènent à dire que la concentration du solvant est plus importante que les autres facteurs, ce constat est démontré par plusieurs études (Uma et al, 2010. Wang et al., 2009. Singh et al., 2011). Cela est vraisemblablement dû à la polarité du système (eau/éthanol) qui varie en fonction de la concentration de l'éthanol (constante diélectrique ( $\epsilon$ ) 24,3) et de la polarité des flavonoïdes de chaque matrice (Proestos & Komaitis, 2008, Spingo & De Faveri, 2009).

Concernant l'effet de la puissance, le résultat concorde avec les travaux de Goa et al, 2009 ayant montré que la puissance a un effet non significatif. Shao et al., 2011, explique ce fait par l'augmentation de l'effet direct de l'énergie micro-onde sur le milieu d'extraction par la conduction ionique et la rotation dipolaire qui se traduisent par élévation de la température du milieu, qui provoque la dégradation des substances bioactives thermosensibles.

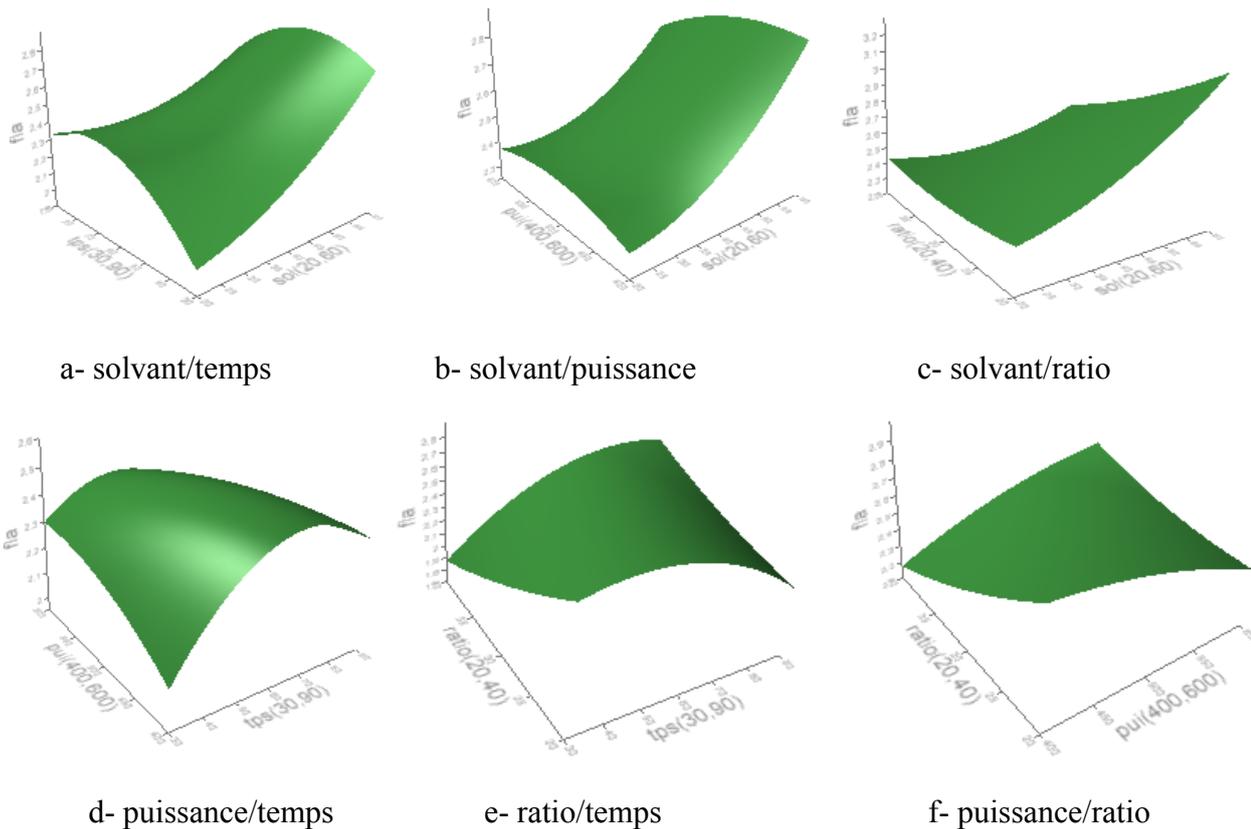
#### b- Effet d'interaction

Le tableau VII (a) montre que les interactions  $X_1$ - $X_2$  (pourcentage du solvant/puissance),  $X_1$ - $X_3$  (pourcentage du solvant/temps) et  $X_2$ - $X_3$  (puissance/temps) sont significative sur l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de myrtus avec des probabilités  $P = (0.0012, 0.0192, 0.0115)$ , respectivement. Par contre les autres interactions sont non significatives.

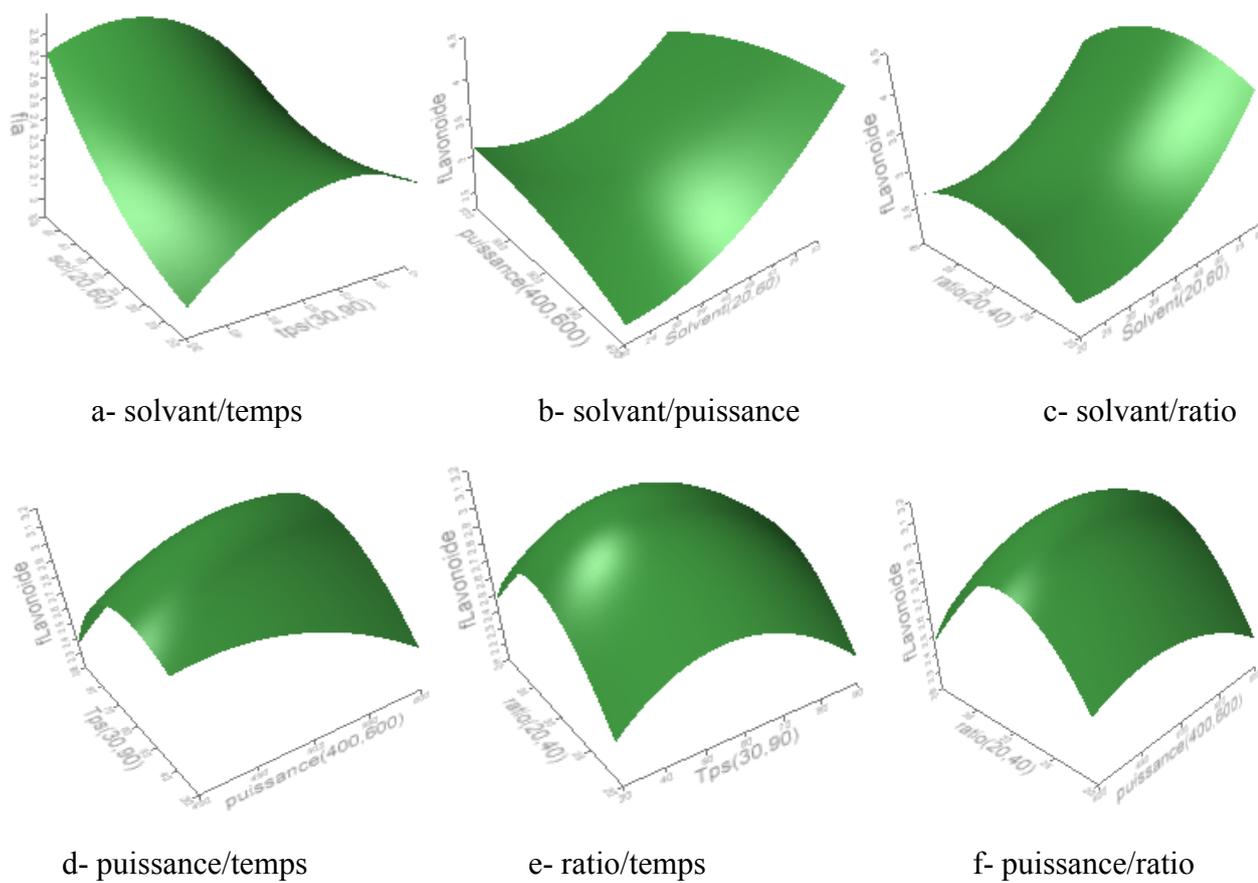
Le tableau VII (b) montre que les interaction  $X_1$ - $X_3$  (pourcentage du solvant/temps),  $X_1$ - $X_4$  (solvant/ratio),  $X_2$ - $X_3$  (puissance/temps),  $X_2$ - $X_4$  (puissance/ratio), et  $X_3$ - $X_4$  (temps/ratio) sont significatives dans le cas de la poudre de *Pistacia lentiscus*, avec des probabilité de  $P = (0,032- 0.0259- 0,043- 0,0016$  et  $0.0012)$ , respectivement. Alors que l'interaction  $X_1$ - $X_2$  (solvant/puissance) n'est pas significative au seuil de  $P = 0,3719$ .

Ces résultats confirment l'importance de la concentration du solvant par rapport aux autres facteurs comme il a été démontré par plusieurs auteurs. (Chan et al, 2009. Uma et al., 2010)

Ces interactions sont bien montrées dans les figures 21 et 22.



figures 21 : surface de réponse pour les différentes interactions (cas myrtus EAM).



**Figures 22** : surface de réponse pour les différentes interactions (cas *Pistacia* EAM).

### c- Effet quadratique

Le tableau VII (a) montre que tous les effets quadratiques  $X_1^2$  (solvant\*solvant),  $X_2^2$  (puissance\*puissance),  $X_3^2$  (temps\*temps) et  $X_4^2$ (ratio\*ratio) influencent d'une manière significative sur la teneur en flavonoïdes, à partir des feuilles de *Myrtus communis* avec des probabilités  $P = (<0.0001- 0,0262- 0.0003$  et  $<0.0001)$ , respectivement.

Alors que le tableau VII (b) montre qu'il n'y a qu'un seul effet quadratique  $X_1^2$  significatif sur l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles du pistachier lentisque avec une probabilité de  $P=(0,0091)$ . Par contre les autres effets quadratiques ne sont pas significatifs.

## IV -3-2 Plan d'expérience CCD (pour l'EAU)

### IV-3 -2-1 Analyses de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance a montré à une faible probabilité  $P$  (0.007 et 0.0004), des coefficients de corrélation importants  $R^2$  de (0.94 et 0.93) et de grandes valeurs de  $F$ -ratio (6.57 et 12.73), pour le modèle décrivant la réponse expérimentale  $y$  de la teneur en flavonoïdes extraite à partir des feuilles de *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* (voir tableau IX (a) et (b)). Cela veut dire que le plan choisi est significatif. En plus, les deux probabilités du manque d'ajustement sont très élevées ( $P \gg F$ ). Des études ont montré que ce type de plan est valable pour exprimer la teneur en flavonoïdes en fonction des trois facteurs à optimiser (solvant, amplitude des ultra-sons et du temps). (Khan et al, 2010. Virot et al, 2010).

**Tableau VIII (a):** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le CCD de la surface de réponse (Cas du *Myrtus*).

Term	Somme des carrés	DL	sm	Estimate	Ecart type	t Ratio	Prob> t	f Ratio
Intercept	3,6967	7	0,5281	4,7366	0,0854	55,45	<,0001*	6,579
$X_1$	0,1812	1	0,1812	0,1505	0,1001	1,5	0,2299	2,25
$X_2$	0,0045	1	0,0045	0,0239	0,1001	0,24	0,8265	0,0572
$X_3$	0,3041	1	0,3041	0,1949	0,1001	1,95	0,1468	3,7800
$X_1 * X_2$	1,1674	1	1,1674	-0,382	0,1001	-3,81	0,0317*	14,54
$X_1 * X_3$	1,0191	1	1,0191	-0,356	0,1001	-3,56	0,0377*	12,69
$X_2 * X_3$	0,7924	1	0,7924	0,3147	0,1001	3,14	0,0516	9,87
$X_1 * X_2 * X_3$	0,2278	1	0,2278	0,1687	0,1001	1,68	0,1906	2,83
Lack Of Fit		0,233	1	0,2331			0,016	60,79
Pure Error		0,007	2	0,0038				
Total Error		0,240	3					
$R^2$		0,938						
$R^2$ Adj		0,796						
R M S E		0,283						

**Tableau VIII (b):** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les flavonoïdes en utilisant le CCD de la surface de réponse (Cas de *Pistacia*).

Term	Sum of Squares	DL	Mean Square	Estimate	Ecart type	t Ratio	Prob> t	F ratio
Intercept	5,8314	9	0,6479	4,41459	0,08256	53,47	<,0001	12,738
X <sub>1</sub>	0,0176	1	0,0176	-0,0419	0,07131	-0,59	0,5707	0,3462
X <sub>2</sub>	1,3582	1	1,3582	0,36854	0,07131	5,17	0,0006*	26,703
X <sub>3</sub>	0,0735	1	0,0735	-0,0857	0,07131	-1,2	0,2599*	1,4457
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	0,9932	1	0,9932	0,35235	0,07973	4,42	0,0017*	19,527
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	0,4037	1	0,4037	0,22463	0,07973	2,82	0,0201*	7,9369
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	0,2935	1	0,29359	-0,1915	0,07973	-2,4	0,0397*	5,7722
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	0,9485	1	0,94855	-0,5891	0,13643	-4,32	0,0019*	18,648
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	0,4187	1	0,41872	0,39146	0,13643	2,87	0,0185*	8,2323
X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>	0,6169	1	0,61692	-0,4751	0,13643	-3,48	0,0069*	12,129
lack of fit	0,361	5	0,07239				0,153	3,02
pure error	0,095		0,02395					
total error	0,457	9						
C. Total	6,289	18						
R <sup>2</sup>	0,927							
R <sup>2</sup> Adj	0,854							
RMSE	0,225							

### IV-3 -2-2 Modèle mathématique

Les modèles mathématiques postulés sont représentés par les relations suivantes :

$$Y = 4,736 + 0,150x_1 + 0,023x_2 + 0,194x_3 + 0,382x_1x_2 - 0,314x_2x_3 - 0,356x_1x_3 + 0,168x_1x_2x_3$$

(*Myrtus communis*).

$$Y = 4,421 - 0,041x_1 + 0,369x_2 - 0,085x_3 - 0,191x_1x_2 - 0,191x_2x_3 + 0,224x_1x_3 - 0,589x_1^2 + 0,391x_2^2 - 0,475x_3^2$$

(*Pistacia lentiscus*).

### IV-3 -2-3 Effets des facteurs

#### a- Effets linéaire

Le tableau IX (b) montre que le facteur influençant d'une manière hautement significative pour le *Pistacia* est l'amplitude (X<sub>2</sub>) avec une probabilité P=0,0006, et F-ratio (F= 26,703). Cependant l'impact est non significatif pour les autres facteurs.

Par contre le tableau IX (a) montre que tout les facteurs influencent d'une manière non significative à P>0.005 avec P=(0,229, 0,826, et 0,146) pour le solvant, amplitude et le temps respectivement.

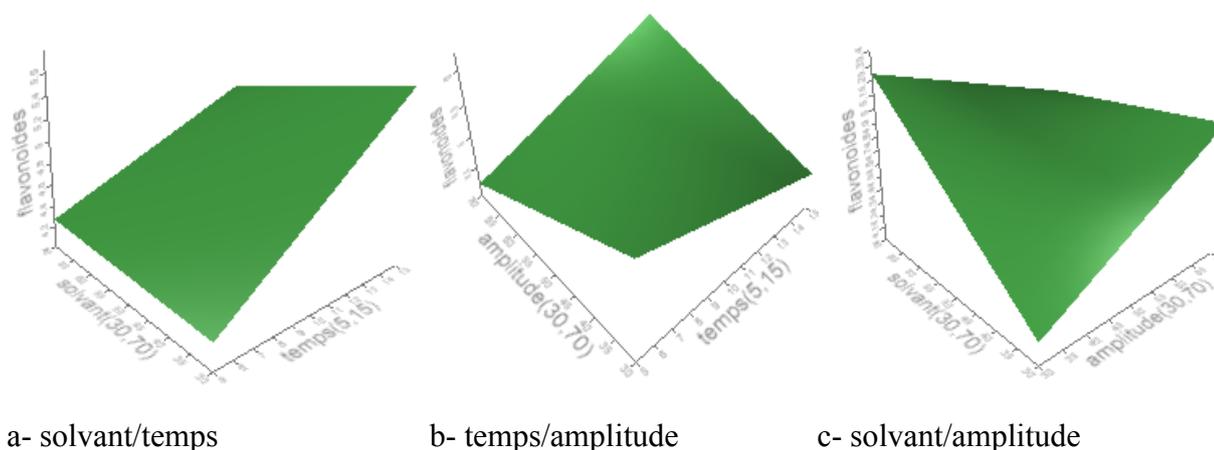
L'importance de l'amplitude a été montrée par plusieurs auteurs (Virot et al, 2010 ; Karman khan et al 2010). En effet, la cavitation des ultrasons peut augmenter significativement l'extraction des flavonoïdes dans la phase hétérogène (Virot et al, 2010).

### *b- effet d'interaction*

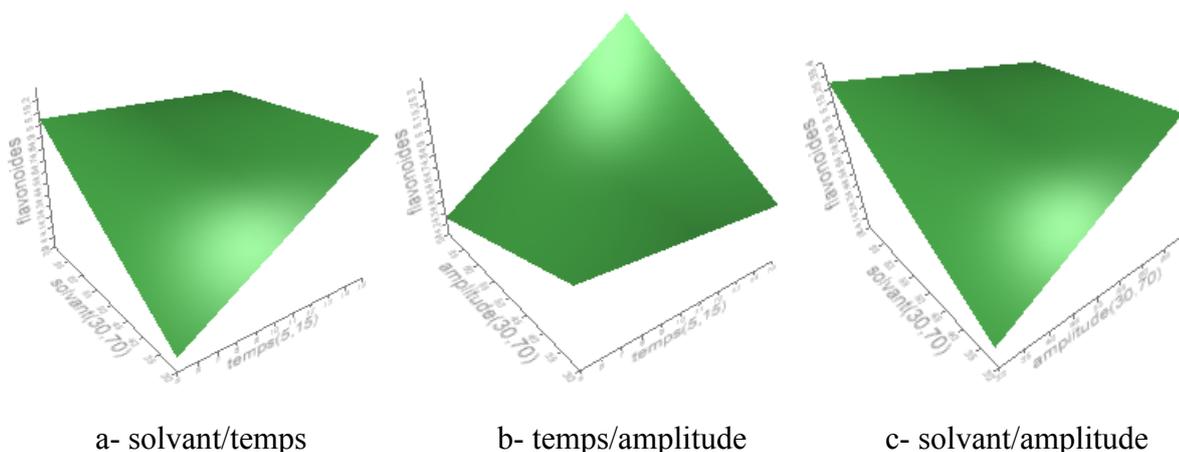
Le tableau IX (b) montre que toutes les interactions  $X_1$ - $X_2$  (pourcentage du solvant/amplitude),  $X_1$ - $X_3$  (pourcentage du solvant/temps) et  $X_2$ - $X_3$  (amplitude/temps) sont significatives sur l'extraction des flavonoïdes à partir des poudres de feuilles de *Pistacia* avec des probabilités  $P=0,0017, 0,0201$  et  $0,0397$ , respectivement.

Le tableau IX (a) montre que les interactions  $X_1$  $X_2$  (pourcentage du solvant/amplitude),  $X_1$ - $X_3$  (pourcentage du solvant/temps) sont significatives sur l'extraction des flavonoïdes à partir des poudres de feuilles de *myrtus* avec des probabilités  $P=0,0317$  et  $0,0377$ , respectivement. Alors que l'interaction  $X_2$ - $X_3$  (amplitude/temps) n'a pas d'effet significatif avec  $p=0,051$ .

Ces interactions sont montrées dans les figures 23 et 24.



**Figure 23** : surface de réponse pour les différentes interactions (cas *Myrtus* EAU).



**Figure 24:** surface de réponse pour les différentes interactions (cas *Pistacia* EAU).**c- Effet quadratique**

Le tableau IX (b) montre que tous les effets quadratiques  $X_1^2$  (solvant\*solvant),  $X_2^2$  (amplitude\*amplitude) et  $X_3^2$  (temps\*temps) influencent d'une manière significative sur la teneur en flavonoïdes, à partir des poudres de feuilles de *Pistacia lentiscus* avec des probabilités  $P=0,0019-0,0185$  et  $0,0069$ , respectivement.

Ces résultats confirment l'importance de l'amplitude et l'interaction, ainsi que l'effet quadratique de tous les facteurs, démontré par **Viro et al, 2010; karman khan et al, 2010**.

**IV - 4 Conditions optimales de l'extraction des flavonoïdes et CPT par micro-ondes et ultrasons à partir de *Pistacia lentiscus* et *myrtus communis***

Les conditions optimales de l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de *Myrtus communis* et de *Pistacia lentiscus* ont été obtenues en utilisant les équations de régression de la méthodologie de surface de réponse pour EAM et EAU. Le tableau X indique le pourcentage du solvant, la puissance des micro-ondes, l'amplitude, le temps d'irradiation et le ratio (solide/liquide) qui permettent de donner la meilleure réponse ainsi que les valeurs expérimentales (obtenues par l'expérience) et les valeurs prédites (obtenues par le logiciel).

**Tableau X:** Conditions optimales d'extraction.

		% du solvant	Temps d'irradiation	Puissance du micro-onde (W)	Amplitude (%)	Ratio (solide-liquide)	Valeur expérimentale	Valeur prédite
<i>Myrtus</i>	EAM	30.63	56s	536	/	31.23	3.13	2.97
	EAU	70	15min	/	30	40	4.55	5.68
<i>Pistacia</i>	EAM	34.85	69.41 s	511	/	35	2.63	2.42
	EAU	35.45	9.85 min	/	28.60	40	4.13	4.25

La corrélation élevée entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales confirment la validité des modèles choisies.

**IV -5 Comparaison entre la méthode d'extraction assistée par micro-onde, ultrason et la méthode conventionnelle (Solide-liquide)**

Les résultats des rendements d'extractions des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes obtenus par EAM et EAU dans les conditions optimales sont comparés à ceux obtenus par la méthode de macération EC.

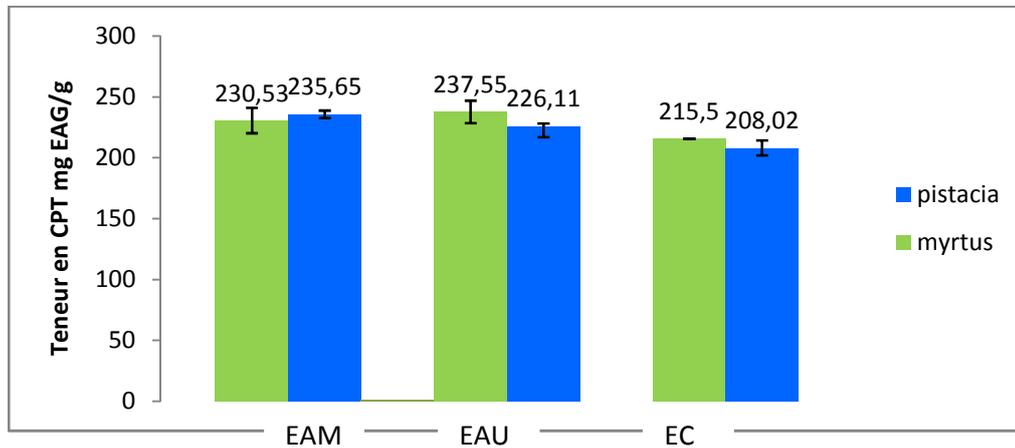


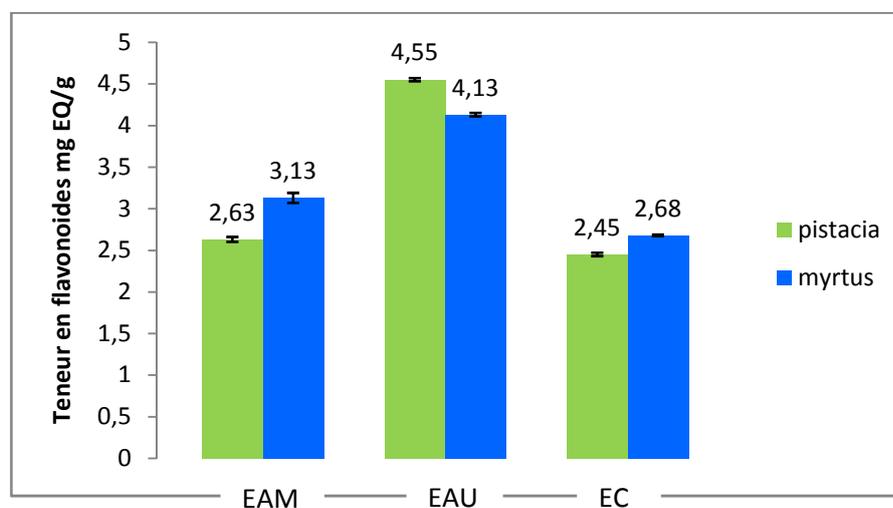
Figure 25 : Teneur des différents extraits en CPT.

Les résultats montrent que les micro-ondes et les ultrasons améliorent le rendement de l'extraction.

Tableau XI: teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes après extraction par agitation par ultrason et par micro-onde.

	CPT (mg EAG/g)			flavonoïdes mg EQ/g		
	EAM	EAU	EC	EAM	EAU	EC
<i>Pistacia L</i>	235.65	237.55	215.50	2.63	4.13	2.45
<i>Myrtus C</i>	230.53	226.11	208.02	3.13	4.55	2.68

Le tableau XI montre que l'EAU et l'EAM augmente le rendement de 9,29% et 8,86% respectivement des composés phénoliques par rapport à l'EC pour *Pistacia*, et de 9,57% et 9,97% pour le *Myrtus*. Cela veut dire que l'EAU donne le meilleur rendement (237.55) EAG/g par rapport aux autres méthodes pour *Pistacia* ce qui est prouvé par **Jacques et al., (2007)** qui ont démontré que l'EAU donne des meilleurs rendements avec *Ilex paraguariensis*. Contrairement au *myrtus* qui donne des meilleurs rendements avec EAM (230.53), ce résultat concorde à ceux reporté par la littérature (**Yiping et al 2011 ; Gallo et al 2010**). Cette différence est probablement due à la différence de variétés des plantes étudiées.



Figur26 : Teneur des différents extraits en flavonoïdes.

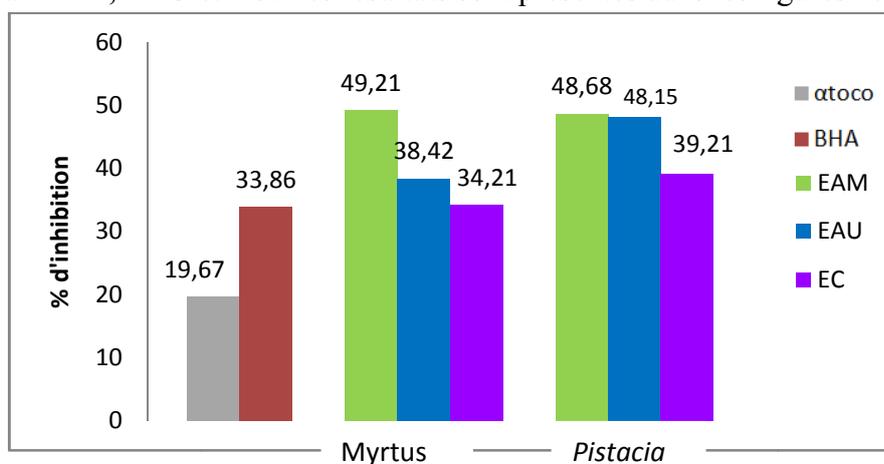
En ce qui concerne les flavonoïdes les concentrations obtenues par EAU sont nettement plus élevées (4,13 mg EQ/g) que celles obtenues par EAM (2,63 mg EQ/g) et EC (2,45 mg EQ/g) pour *Pistacia*. Et les mêmes résultats obtenus pour *Myrtus* avec une concentration plus élevée (4,55 mg EQ/g) obtenue par EAU comparée à EAM (3,13EQ/g) et EC (2,68 mg EQ/g).

Le tableau XI montre que l'EAU et l'EAM augmentent le rendement de 41,10% et 14,38% respectivement des flavonoïdes extrait par l'EC pour *Pistacia*. Et de 40,68% et 6,69% des mêmes composés obtenus par l'EC pour le *Myrtus*. Ce qui veut dire que l'EAU donne le meilleur rendement par rapport aux autres méthodes. **Rajaei et al, (2010)** ont eu les mêmes résultats lors de l'extraction des composés phénoliques à partir de *Pistacia vera*, qui ont démontré que l'EAU est la méthode la plus efficace que l'EC. Et aussi d'autres études ont montré que l'EAU peut être employée comme méthode utile et efficace pour l'extraction des molécules organiques (**Fu et al 2006 ; Rodrigues et Pinto 2006 ; Li et al 2007**).

Pour mieux comparer les techniques d'extraction, des tests ont été réalisés, pour évaluer l'activité anti oxydante

#### IV -6 Activité anti oxydante des extraits

La capacité anti oxydante des extraits est évaluée par le test au DPPH (**Boulekbache, 2013**), et à l'ABTS (**Roberta Re et al, 1998**). Ces tests permettent d'apprécier le pouvoir anti oxydant des extraits obtenus par EAM, EAU et EC. Les résultats sont présentés dans les figures 27 et 28.

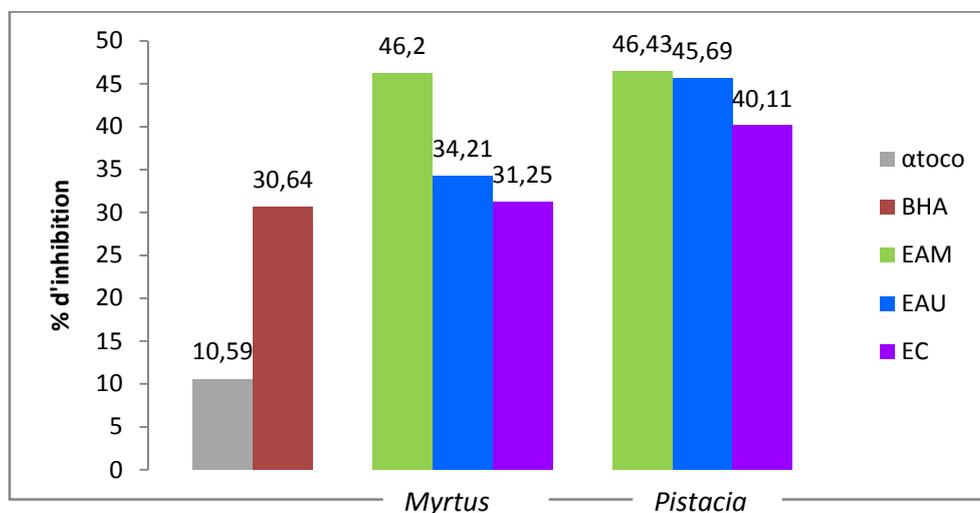


**Figure 27:** Pouvoir antioxydant des extraits obtenus par EAM, EAU et EC évalué par le test ABTS.

Les figures 27 et 28 montrent que la capacité antioxydante des extraits est plus élevée que celles des standards à des concentrations égales (50µg/ml). Ces résultats sont comparables aux résultats trouvés par **Topçu et al, (2007)**, elle est plus importante avec EAM par rapport aux méthodes EAU et EC.

L'extrait de *Pistacia* obtenue par EAM et EAU présente un pourcentage d'inhibition de l'ABTS plus élevé 48,68% et 48,15%, respectivement que celui obtenu par EC (39,21%). Tandis que l'extrait de *Myrtus* obtenue par EAM présente un pourcentage d'inhibition légèrement supérieur

49.21% à celui obtenue par EAU (38,24%), et est significativement plus élevée que celui obtenu par EC (34.21%) (Voir figure 27). **Gallo et al (2010)** ont démontré que l'activité anti oxydante de certains extraits obtenus par EAM est supérieure à celle obtenue par EAU et EC.



**Figure 28 :** Pouvoir antioxydant des extraits obtenus par EAM, EAU et EC évalué par le test DPPH.

Dans le cas du test DPPH le pourcentage d'inhibition de *Myrtus* obtenu par EAM est plus élevée (46,20) que celui obtenu par EAU et EC (34,21, 31,25%, respectivement), tandis que pour *Pistacia* les pourcentages d'inhibition obtenus par EAU et EAM sont comparables (46,43%) (45,69%), et sont supérieurs à celui obtenu par EC (40,11%) (Voir figure 28).

Dans une étude effectuée par **Gallo et al (2010)**, sur les extraits de 4 plantes 3 d'entre elle ont donné un effet scavenger plus élevé avec EAM qu'avec EAU.

La comparaison des résultats et des rendements d'extraction des CPT et des flavonoïdes par EC, par rapport à ceux obtenus par EAM et EAU, montre que les méthodes innovantes (EAM et EAU) améliorent l'efficacité d'extraction en réduisant le temps (voir tableau XI). Les teneurs en CPT et en flavonoïdes sont obtenus à des temps qui ne dépassent pas 70 secondes pour l'EAM, et à moins de 15 minutes pour l'EAU.

Les teneurs obtenus par ces méthodes innovantes sont plus élevées que celle obtenues par la technique conventionnelle qui dure 05 heures. Les méthodes innovantes réduisent de façon significative le temps d'extraction (**Martino et al, 2006. Wang et al, 2010. Jacques et al, 2007. Rajaei et al, 2010**).

Selon, **Inglett et al. (2010)** les radiation du micro-onde peuvent détruire les structures cellulaires plus efficacement que la chaleur du bain-marie et libérer ainsi plus de composés phénoliques. Dans le but, d'étudier les dommages cellulaires qui sont produit lors de l'extraction par micro-ondes, **Mandal et Mandal (2010)** ont montré que la surface des échantillons de feuilles de *Gymnema sylvestre* traités par micro-ondes a été très endommagée suivie d'un élargissement considérable des pores cellulaires. Ces observations ont suggérées que le traitement aux micro-

ondes affecte la structure des cellules par l'élévation soudaine de la température et l'augmentation interne de la pression.

**Gabaldo et al 2007** ont prouvé que les ultrasons augmentent le transfert de masse de quelque composé du poivron rouge en raison de la perméabilité croissante des parois cellulaire lors du processus de macération, les substances organique vont progressivement se libérer, mais à un rythme lent. En effet ces dernières se libèrent par un phénomène de diffusion passive ce qui fait qu'après 12 heures de macération traditionnelle, les cellules ne sont toujours pas complètement vidées de leur contenu (**Viette, 2010**). A l'inverse, lors d'une extraction assistée par ultrasons, les ondes sonores créent des bulles et produisent une pression négative, lorsque cette dernière augmente les bulles de vapeur, croissent et se soumettent à l'effondrement implosive connue sous le nom de cavitation. (**Luque-garcia et Luque de gastro, 2003**).

Les bulles de cavitation générées par les ultrasons permettent l'explosion des cellules. Cette explosion va permettre une migration plus rapide, puisque le contenu est directement libéré dans le milieu (**Viette, 2010**). Cette différence fondamentale entre un procédé de diffusion passive et un procédé endommageant les cellules, permet d'expliquer les différences de rendement en CTP et flavonoïdes observées.

Les dommages cellulaires produits lors d'extraction par ultrasons ont été étudiée par **Zhang et al, (2008)**, par observation au MEB de grains de lin avant et après extraction par ultrason et par macération. La macération a montré des changements qui ne diffèrent pas considérablement de l'échantillon, cependant la surface de l'échantillon traité par ultrasons était très endommagée.

# Conclusion

## Conclusion

*Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* sont deux plantes très utilisées dans la pharmacopée traditionnelle et moderne grâce à leurs diverses vertus, surtout contre le diabète, l'hypertension artérielle, troubles digestifs, toux, rhumes, les maux de gorge et leurs effets antiseptiques.

L'objectif de notre travail est de comparer les rendements d'extraction des flavonoïdes entre les méthodes innovante (EAM et EAU) et la méthode classique (EC).

Après collecte et séchage des plantes, l'essentiel des résultats obtenus est sur les poudres des feuilles de plantes de granulométrie  $<125 \mu\text{m}$ .

Le test d'humidité des poudres des feuilles, a révélé un taux très proche pour *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* qui est de 5 et 7%, respectivement.

Les essais réalisés en variant les condition d'extraction (concentration d'éthanol, puissance du micro-onde, temps et ratio) pour EAM, (concentration d'éthanol, amplitude et temps) pour EAU ont montré des différences significatives dans les teneurs en flavonoïdes prouvant l'influence de ces paramètres sur l'extraction des flavonoïdes.

L'utilisation du plan Box-Behenken Design pour optimiser l'extraction des flavonoïdes par EAM est efficace puisque elle donne un taux optimal en flavonoïde de 3,13 mg EQ/g pour le *Myrtus communis* avec les conditions optimales suivantes:

% d'éthanol	Temps en s	Puissance en watt	Ratio (liq/sol) ml/g
30,63	56	500	31,21

Et de 2,63 mg EQ/g pour *Pistacia lentiscus* avec les conditions suivantes :

% d'éthanol	Temps en s	Puissance en watt	Ratio (liq/sol) ml/g
34.85	59	500	35

Pour optimiser l'extraction des flavonoïdes par EAU, le plan Centrale-Composite Design est utilisé vue son efficacité puisque il donne 4,55 mg EQ/g de flavonoides pour *Myrtus communis* avec les conditions optimales suivantes :

% d'éthanol	Temps en min	Amplitude %
34.85	15	15

Et 4,13 mg EQ/g de flavonoides pour *Pistacia lentiscus* avec les conditions suivantes :

% d'éthanol	Temps en min	Amplitude %
35	9	28,60

D'après les résultats obtenus, la comparaison des rendements d'extraction des CPT et des flavonoïdes par agitation macération à ceux obtenus par EAM et EAU, dans les conditions optimales montre que les méthodes innovantes (EAM et EAU) améliorent l'efficacité d'extraction en réduisant le temps et la quantité du solvant.

En perspective, nous suggérons :

- Une optimisation d'autres paramètres influençant le taux d'extraction des flavonoïdes tel que le pH, la granulométrie des particules végétale et la température, etc.
- Une étude étendue à d'autres parties des deux plantes (tiges, fleurs, fruits et racines).

Et pour une meilleure valorisation des deux plantes, il serait intéressant de:

- Caractériser les flavonoïdes par une chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS).
- Purifier les composés responsables de l'activité antioxydante et faire des essais *in vivo*.

# Références bibliographiques

- **Abdelwahed, A et al.** (2009). Antigenotoxic and Antioxidant Activities of Fruit Extracts from (Tunisian) Pistacia Lentiscus
- **Aimesther O B,** (2008). Analyse, extraction et récupération de poly-3-hydroxybutyrate présent dans la biomasse UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL.107-109.
- **Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D, et Trinajstić N.** (2003). Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76**: 55-61.
- **Amellal,** (2008). Aptitude technologique de quelques variétés commune de date: Formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse doctorale Université de Boumerdes. P : 12.
- **Anizon J. V, Lemaire B. et Surbled M.** (2003) Extraction assistée par micro-ondes
- Techniques de l'ingénieur, traité agroalimentaire. Code : F 3 060.
- **Anthoni J.** (2007). Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères des flavonoïdes. Thèse doctorale, Institut polytechnique de Lorraine.
- **Bezerra M A, Santelli, R E, Oliveira, E P, Villar, L S, & Escaleira, L A.** (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**(5), 965-977.
- **Bock B** (22/02/2012). *Myrtus communis*. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. (02) <http://www.tela-botanica.org>
- **Bock B** (22/04/2012). *Pistacia lentiscus* L. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. (02) <http://www.tela-botanica.org>
- **Boisot N.; Charpentier J.P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *INRA -Amélioration, Génétique et physiologie forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques (numéro spécial)*.
- **Boulekbache M L, Slimani S, Madani K.** (2013). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of Eucalyptus globulus cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products* **41** : 85– 89.
- **Brat P, George Ä, Alrer P, Marie J. Amio J** (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J. Agric. Food Chem.* **53** : 1370-1373.
- **Camel, V.** (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *trends in analytical chemistry*, **19**, 229-248.
- **Cendres, A.** (2011). *Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde : viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus*. Université D'AVIGNON, France.
- **Chan S W, Lee C Y, Yap C F, Wan Aida W M and Ho C W.** (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (Citrus hystrix) peels. *International Food Research Journal* **16**: 203-213.
- **Chemat F, Huma Z, Khan M K.** (2010). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* **18**: 813–835.
- **Chin Y F, Jumat S. & Mamot S.** (2010). Optimisation of Urea Complexation by Box-Behnken Design (Pengoptimuman Pengkompleksan Urea Menggunakan Reka Bentuk Box-Behnken). *Sains Malaysiana* **39**(5): 795–803.

- **Cork S. J.; Krockenberger A. K. (1991).** Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on Eucalyptus leaves. *Journal of chemical ecology*, Vol. 17, No. 1.
- **Cowan M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, 12 (4) : 564-570.
- **Danielski L, Campos L, Bresciani H, Hense R, Yunes and Ferreira. (2006).** Oleoresin: Solubility in SC-CO<sub>2</sub> and composition profile, *Chemical Engineering and Processing*, 46 (2): 99–106.
- **Depeint F, Gee J M, Williamson G. et Johson I T. (2002).** Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society.*, 61 : 97-103.
- **Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654-660.
- **Elqaj M, Ahami A, et Belghyti D. 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- **Farnsworth N R, Akerele O, Bingel A S., Soejarto D D et Guo Z. (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.* 64(2) : 159-164.
- **Ferreira, et Brand C, (2007).** Box–Behnkendesign: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597: 179-186.
- **Fu C, Tian H, Li, Q, Cai T, and Du W. (2006).** Ultrasound-assisted Extraction of Xyloghcan from Apple Pomace. *Ultrason. Sonochem.*, 13: 511-516.
- **Gabaldo L A, Quintero-Ramos, A, Barnard J, Balandra-Quintana R. (2007).** Effect of Ultrasound on the Mass Transfer and Physical Changes in Brine Bell Pepper at Different emperatures. *J. Food Eng.*, 81: 374-379.
- **Gallo M , Rosalia F, Giulia G , Alberto R and Vincenzo F.(2010).** Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Four Different Spices. *journal/molecules* 15, 6365-6374
- **Ghedira K. (2005)** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique .4: 162-169. [kamel.ghedira@laposte.net](mailto:kamel.ghedira@laposte.net)
- **Granato D, favali B G, Arujo C. (2011).** Experimental design and application of response surface methodology for proseses modeling and optimization: a reflow, *food research international* , doi: 10:1016.
- **Goupy J. (2006).** Les plans d'expériences. *MODULAD*, 34, 74-116.
- **Goupy J., & Creighton, L. (2005).** *Introduction aux plans d'expériences* (Dunod, Paris ed.)
- **Grossin D. (2006),** *Développement du procédé de chauffage micro-ondes en vue de l'élaboration de céramiques à propriétés électriques particulières*, l'Université de Caen, 182.
- **Hadj Salem J (2009).** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. *Thèse doctorat. Université de Nancy. P 19-22.*

- **Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W.** (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63-70.
- **Hertog M. G.** 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.*, 55 (1B) : 385-397.
- **Hutzler P, Fishbach R, Heller W, Jungblut T P, Reuber S, Schmitz R, Veit M Weissenböck G et Schnitzler J P.** (1998). Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.*, 49 (323) : 953-965.
- **Inglett G, Rose D, Chen D, Stevenson D, Biswa A.** (2010). Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) with or without microwave irradiation. *Food Chemistry*. 119: 1216–1219.
- **Iserin P.** (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. *Edition Larousse. P 238 et 250.*
- **Isorez G.** (2007). Contribution à la chimie des flavonoïdes : accès à des analogues de pigments du vin rouge. Thèse doctorale. Université Luis Pasteur Strasbourg.
- **Izella S.** (2009). cavitation par excitation acoustique bifréquentielle : application à la thrombolyse ultrasonore. école doctorale mécanique, énergétique, génie civil & acoustique.18-30.
- **Jacques, R. A., Freitas, L. D. S., Perez, V. F., Dariva, C., Oliveria, A. P. D., Olivera, J. V. D. and Caramao, E. B.** (2007). The Use of Ultrasound in the Extraction of *Ilex paraguariensis* Leaves: A Comparison with Maceration. *Ultrason. Sonochem.*, 14: 6-12.
- **Khan K M, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier A, Dangles O, Chemat F.** (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119 :851–858.
- **Kuresh A, Youdim A, Jeremy, Spencer, Hangen S, Rice-Evans C.** (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.*, 383: 503-519.
- **Lahlah F.** (2008). Extraction des flavonoïdes par le butanol et le chloroforme a partir de *Silybum marianum* et étude de leur activité antimicrobienne. Thèse magistère. Université de Constantine.
- **Laugier F.** (2007). les ultrasons en procédés polyphasiques: transfert gaz-liquide et réaction liquide-liquide. thèse de génie des procédés et de l'environnement, l'institut national polytechnique de Toulouse.
- **Luque de Castro and L.E. Garcia-Ayuso.** (1998). Soxhlet extraction of solid matrices: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta.* 369: 1-10
- **Luque-Garcia, J. L., & Castro, M. D. L.** (2003). Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going? *Trends in Analytical Chemistry.*, 22, 90- 98.
- **Luque-Garcia JL, Luque de Castro MD.** (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends Analytical Chem.* 22 41-47.

- **Li, J. W., Ding, S. D. and Ding, X. L.** (2007). Optimization of the Ultrasonically Assisted Extraction of Polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao. *J. Food Eng.*, 80: 176-183.
- **Lucchesi, M.** (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Université de la REUNION, France.
- **Ljubuncic P, Song H, Cogan U, Azaizeh H , Bomzon A.** (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology* 100 : 198–204.
- **Ma, Y, Chen, J, Liu, D, & Ye, X.** (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57-62.
- **Macheix J J, Fleuriet A, Sarni-Manchado P.** (2006). Composés phénoliques dans la plante: structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Edition : Lavoisier*.
- **Macheix J J, Fleuriet A. et Jay-Allemand C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- **Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S.** (2007), Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1): 7-8.
- **Mandal V, et Mandal C.** (2010). Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. *Biochemical Engineering Journal*. 50: 63–70.
- **Martino E, Ramaiola I, Urbano M, Bracco F, Collina S.** (2006). Microwave assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis(L.)* Pallas as an alternative to soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 1125(2): 147–151.
- **Manthey, Fleuriet.A, Macheix J, Sarni M.** (2005). Les composés phénoliques dans la plante: Structure, Biosynthèse, Répartition et roles.In: les polyphénols en agroalimentaires. Eds, Tech & Doc, Lavoisier, Paris. 32, 150, 153-155, 160-161.
- **Mason T, Lorimer J.**(1988) «Sonochemistry: theory, application and uses of ultrasound in chemistry», Ellis Horwood limited, p.32.
- **Michel P.** (2012). Extraction par fluide supercritique. techniques de l'ingénieur.3-8.
- **Mihaela N.**(2007) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) from Flaxseed. These Master of Science: Department of Bioresource Engineering, McGill University Montreal, Canada.
- **Myers, R. H. et Montgomery, D. C.** (2002), *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments*, 2ème édition, John Wiley & Sons, New York.
- **Mutyala S, Fairbridge C, Paré, Bélanger, et Hawkins R.** (2010) Microwave applications to oil sands and petroleum : Areview. *Fuel Processing Technology*, 91:127–135.
- **Naviglio, D, Pizzolongo, F, Romano, R, Ferrara, L, Naviglio, B, & Santini, A.** (2007). An innovative solid-liquid extraction technology: use of the naviglio extractor for the production of lemon liquor. *African Journal of Food Science*, 1, 042-050.

- **Nemes, S M, & Orsat, V.** (2009). Screening the Experimental Domain for the Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed Prior to Optimization Procedures. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 300-307.
- **Özcan E.** (2006). *Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace*, the graduate school of natural and applied sciences of middle east technical university,66.
- **Penchev P I.** (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse doctoral Université de Toulouse .18-24.
- **Perreux, L, & Loupy, A.** (2001). A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, 9199-9223.
- **Proestos C, Komaitis M.** (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT- Food Science and Technology*. **41**: 652–659.
- **Rajaei A., Barzegar M., Hamidi Z., and Sahari M.** (2010). Optimization of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull through Response Surface Method. *J. Agr. Sci. Tech.* Vol. 12: 605-615.
- **Ribereau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition : Dunod, Paris : 173-201.*
- **Reguigue M .** (2005) .Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plates-formes pétrolières offshore fissurées.
- **Ribereau-Gayon; Peynaud E; Sudraud P. (1982).** Composés phénoliques « traité d'oenologie, sciences et technologie du vin ». *Edition: Dunod : 477-499.*
- **Roberta, R, Nicoletta, P, Anna P, Ananth P, Min Y And Catherine, R.** (1998). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation depolarization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 9(10), 1231-1237.
- **Rodrigues S, and Pinto S.** 2006. Ultrasound Extraction of Phenolic Compounds from Coconut (Cocos nucifera) Shell Powder. *J. Food Eng.,* 80: 869-872.
- **Royer M, Robert Houde, M.Sci.** (2010). technologies de conversion potentiel de développement lié aux extractibles : état des connaissances et revue des marchés. P36
- **Shahnaz H, Hifza A, Bushra K, Khan J.** (2004) Lipid studies of *Cuminum cyminum* fixed oil Pak. *J Bot.* 36: 395-401.
- **Shao P, He J, Sun, P, & Zhao, P.** (2011). Analysis of conditions for microwave-assisted extraction of total water-soluble flavonoids from Perilla Frutescens leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 1-8.
- **Singh A, Sabally K, Kubow S, Donnelly D, Gariepy Y, Orsat V & Raghavan.** (2011). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Potato Peels. *Molecules*, 16: 2218-2232.
- **Spigno G, De Faveri D. M.** (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*. **93**: 210–217.
- **SunY, Liu D, Chen J, Ye X, Yu D.** (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans-b-carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 243–249.

- **Telli A, Mahboub N, Boudjeh S, Siboukeur O E K, Moulti-Mati F.** (2010) **Optimisation des conditions d'extraction des polyphenols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) VARIETE GHARS.** Annales des Sciences et Technologie Vol. 2.
- **Tinsson W.** (2010). Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Mathématiques et application 67. édition springer-Verlag Berlin heidelberg p532.
- **Tripathi P, Srivastava V C, Kumar A.** (2009). Optimization of an azo dye batch adsorption parameters using Box–Behnken design. Desalination 249:1273–1279.
- **Tsantili E, et al** (2011) Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L) nuts in relation to cultivars and storage conditions.
- **Topçu G, Ay M, Bilici A, Cengiz S, Ozturk M, Ulubilen A.** (2007) a new flavone from anti oxydant extract of pistacia terebinthus. Food chemistry 103: 816-822.
- **Uma, D. Ho, C & Wan Aida W.** (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds for Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. Sains Malaysiana 39: 119-128
- **Veillet S.** (2010). Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive Entre Tradition et Innovation p 115.
- **Virost M, Tomao V, Le Bourvellec C, Renard C, Chemat F.** (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. Ultrasonics Sonochemistry 17 : 1066–1074.
- **Wang J, Zhang J, Zhao B, Wang X, Wu Y, Yao J.** (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. Carbohydrate Polymers. **80**: 84–93.
- **Wang L., Weller C.L.** (2006). Recent advances in Extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology, 17: 300–312.
- **Wang W., Wu N., Zu Y. G. et Fu Y. J.** (2008). Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.*, **108** (3) : 1019-1022.
- **Wei F, Ma SC, Ma LY, et al.** (2004). Antiviral flavonoids from the seeds of *Aesculus chinensis*. J Nat Prod 67 (4): 650-3.
- [www. detoursante.com/ flavo-perso.htm](http://www.detoursante.com/flavo-perso.htm). Consulté le 20 janvier 2012.
- **Yinping Li et al.** (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. Food Chemistry 129 (2011) 570–576.
- **Yujing, S., Donghong, L., Jianchu , C., Xingqian, Y., Dong Y.** (2010). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- $\beta$ -carotene from citrus peels. Ultrasonics Sonochemistry, 18,(1) 243–249.
- **Zeghad N.** (2008). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse doctorale. Université de Constantine.
- **Zhong K et Wang Q,** (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. Carbohydrate Polymers 80 : 19–25.
- **Zhang Z, Wang L, Li D, Jiao S, Dong Chen X, Mao Z.** (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. Separation and Purification Technology 62 :192–198.

# Annexes

## Annexe I : Paramètres influençant la cavitation.

paramètre	Propriété	Effet
<b>Fréquence</b> ↗	Période d'implosion ↘	Taille de résonance ↘
<b>Puissance</b> ↗	Taille zone réactive ↗	Nombre d'implosion par volume ↗ Contenu de la bulle ↗ Violence de l'implosion ↘
<b>Température</b> ↗	Pression de valeur saturant ↗	Intensité de l'implosion ↗ Violence de l'implosion ↘
<b>Pression</b> ↗	Pression totale ↗ Solubilité du gaz ↗	Intensité de l'impulsion ↗ Contenu de la bulle ↗
<b>Gaz</b>	Conductivité thermique du gaz ↗ Solubilité du gaz ↗	Intensité de l'implosion ↗ Intensité de l'implosion ↗ Contenu de la bulle ↗
<b>liquide</b>	Pression de vapeur saturant ↗ Tension superficielle ↗ Viscosité ↗	Intensité de l'impulsion ↗ Seuil de cavitation ↘ Seuil de cavitation ↗

**Annexe II a:** valeurs expérimentales et prédites de l'EAM du plan BBD pour *Myrtus*.

L'essai	X <sub>1</sub> Pourcentage du solvant(%)	X <sub>2</sub> Puissance du micro- onde(watt)	X <sub>3</sub> temps (seconde)	X <sub>3</sub> ratio (mg/g)	Valeur expérimentale (mg/g)	Valeur prédite (mg/g)
1	40	600	90	30	2,71483306	2,77564921
2	40	600	60	20	2,49589491	2,3633157
3	20	600	60	30	3,03959132	3,12412577
4	40	500	30	40	2,52143769	2,46183786
5	20	500	90	30	2,40102171	2,4137931
6	40	400	90	30	2,29520161	2,35966673
7	20	500	30	30	2,76226966	2,93316305
8	60	500	60	40	3,63802226	3,66599769
9	40	500	90	40	2,30614851	2,30736484
10	60	500	90	30	4,08684547	3,97311926
11	40	400	30	30	2,95201606	2,91917533
12	20	500	60	20	2,41926656	2,41926656
13	60	500	60	20	3,54679803	3,74140972
14	20	500	60	40	2,8279511	2,66131485
15	40	600	60	40	2,60171502	2,60901295
16	40	500	60	30	3,18190111	3,10405644
17	20	400	60	30	2,63090677	2,52934379
18	40	500	60	30	2,98485678	3,10405644
19	40	400	60	40	2,27695676	2,46670316
20	40	400	60	20	2,49589491	2,54576416
21	40	500	60	30	3,14541142	3,10405644
22	40	500	90	20	2,28060573	2,25506294
23	60	600	60	30	3,65626711	3,67268747
24	40	500	30	20	2,43386243	2,3475035
25	60	400	60	30	4,47728517	4,3076081
26	40	600	30	30	2,49954388	2,46305419
27	60	500	30	30	3,65626711	3,7006629

**Annexe II b:** valeur expérimentale et prédites de l'EAM du plan BBD pour *Pistacia*.

L'essai	X <sub>1</sub> pourcentages du solvant (%)	X <sub>2</sub> puissance du micro- onde (watt)	X <sub>3</sub> temps (seconde)	X <sub>4</sub> ratio (g/ml)	Valeur expérimentale (mg/g)	Valeur prédite (mg/g)
1	40	400	20	60	2,90457946	2,88511803
2	40	500	20	30	2,86079183	2,75550373
3	40	400	30	30	2,12005109	2,11465352
4	60	600	30	60	2,62360883	2,63356787
5	40	400	40	60	2,16018975	2,17387312
6	40	600	30	30	2,19667944	2,2983183
7	20	500	30	90	2,34628717	2,32530534
8	20	400	30	60	2,41196862	2,34864367
9	20	500	30	30	1,94854954	2,04433577
10	40	600	30	90	1,97044335	2,01461147
11	40	600	40	60	2,38825032	2,4223071
12	60	500	30	30	2,6746944	2,71027159
13	20	500	40	60	2,35358511	2,43515465
14	60	500	30	90	2,4904246	2,40923373
15	60	500	20	60	3,22568874	3,18288977
16	40	500	20	90	2,16748769	2,23643839
17	40	500	40	30	1,99598613	1,87366952
18	20	600	30	60	2,56157636	2,37084157
19	40	600	20	60	2,45575625	2,45666823
20	20	500	20	60	2,4028462	2,50053202
21	40	400	30	90	2,44116037	2,37829207
22	60	500	40	60	2,56157636	2,5026611
23	40	500	40	90	2,32074439	2,37266657
24	60	400	30	60	2,6984127	2,83578158
25	40	500	30	60	2,52508666	2,49954388
26	40	500	30	60	2,59806605	2,49954388
27	40	500	30	60	2,37547893	2,49954388

**Annexe III a** : valeur expérimentale et prédites de l'EAU du plan CCD pour *myrtus*.

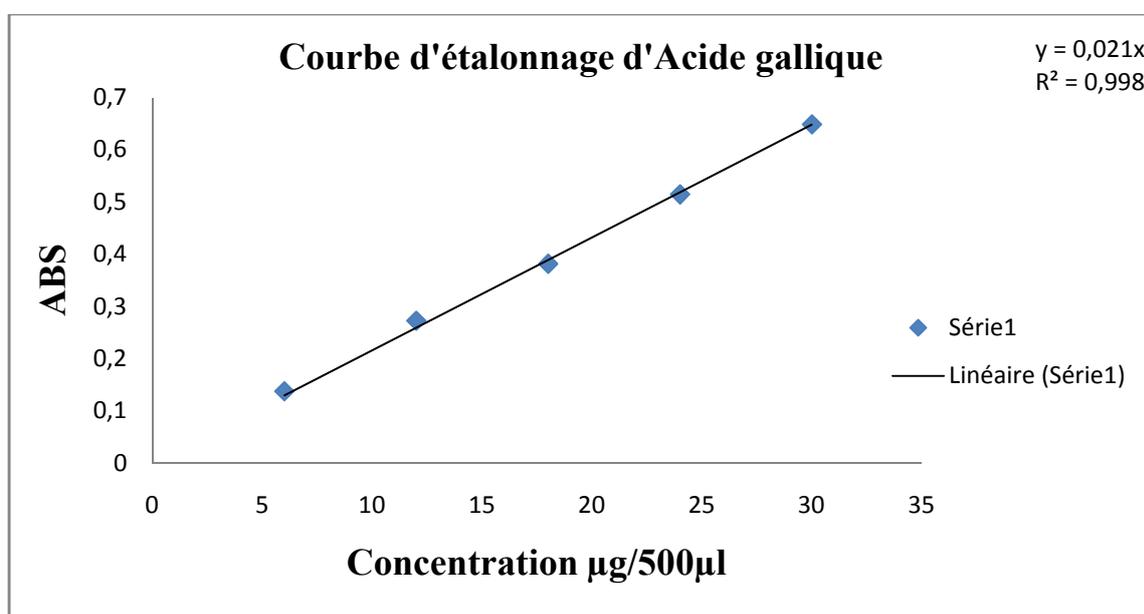
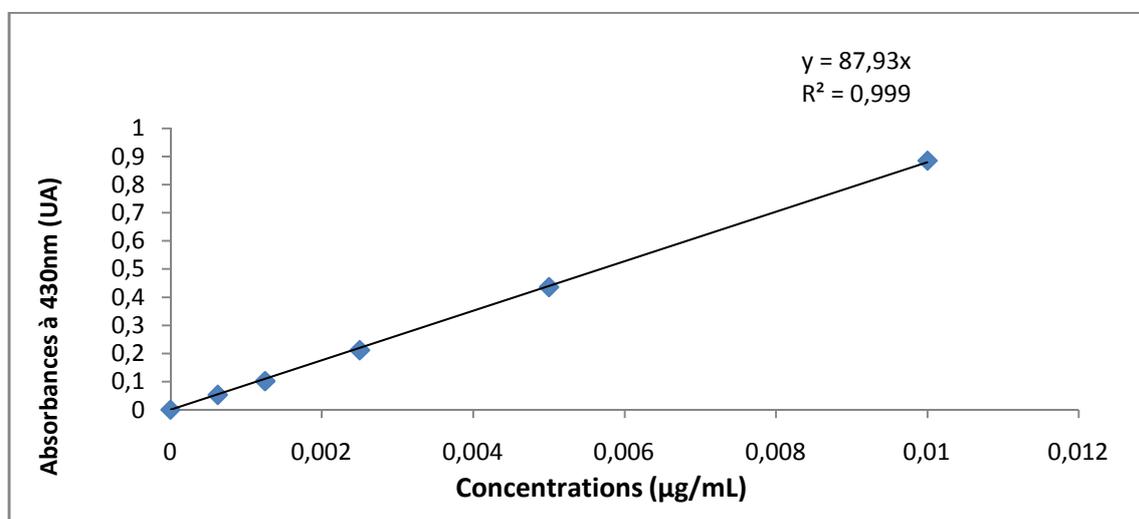
L'essai	X <sub>1</sub> pourcentages du solvant (%)	Amplitude des ultrasons (%)	X <sub>3</sub> temps (seconde)	Valeur expérimentale (mg/g)	Valeur perte (mg/g)
1	5	30	30	3,86334611	3,77419515
2	15	30	30	4,67524174	4,58609079
3	5	70	30	4,38332421	4,29417326
4	15	70	30	5,77905492	5,68990397
5	5	30	70	5,97974822	5,89059727
6	15	30	70	4,68892538	4,59977443
7	5	70	70	4,29666119	4,20751024
8	15	70	70	4,93979201	4,85064106
9	10	50	50	4,46542602	4,73661077
10	10	50	50	4,57033388	4,73661077
11	10	50	50	4,46086481	4,73661077

**Annexe III b** : valeur expérimentale et prédites de l'EAU du plan CCD pour *Pistacia*.

L'essai	X <sub>1</sub> Pourcentage du solvant(%)	Amplitude des ultrasons (%)	X <sub>3</sub> temps (seconde)	Valeur expérimentale (mg/g)	Valeur prédite (mg/g)
1	5	30	30	4,03667214	4,06579431
2	5	30	30	3,69914249	3,89012432
3	5	70	30	4,25104908	4,41946681
4	15	70	30	3,20197044	3,4775133
5	5	30	70	2,75041051	2,85209589
6	15	30	70	3,36617406	3,57498456
7	5	70	70	4,42893633	4,61518274
8	15	70	70	4,22368181	4,57178788
9	10	50	50	4,24648787	4,42162402
10	10	50	50	4,50191571	4,42162402
11	10	50	50	4,26929392	4,42162402
12	10	50	50	4,52472177	4,42162402
13	10	50	50	4,5794563	4,42162402
14	15	50	50	3,98649881	3,58271694
15	5	50	50	3,86790732	3,77330335
16	10	70	50	5,50994344	5,13209731
17	10	30	50	4,07772304	3,95718334
18	10	50	70	3,81317278	3,5120305
19	10	50	30	3,81317278	3,61592923

**Annexe IV:** pourcentages d'inhibition des radicaux libres.

L'échantillon	pourcentages d'inhibition du DPPH(%)			pourcentages d'inhibition de l'ABTS(%)		
	EAM	EAU	EC	EAM	EAU	EC
<i>Myrtus communis</i>	46,20	34,21	31,25	49,21	38,42	34,21
<i>Pistacia lentiscus</i>	46,43	45,69	40,11	48,68	48,15	39,21

**Annexe V :** Courbe d'étalonnage d'Acide gallique.**Annexe VI :** Courbe d'étalonnage de quercitine.

## Résumé

Dans cette étude, les méthodes d'extraction par micro-onde et ultrason ont été utilisées pour l'extraction des flavonoïdes à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*. L'effet des variables indépendantes : puissance du micro-onde, amplitude des ultrasons, temps, ratio (liq/sol) et pourcentage de l'éthanol sur les teneurs en flavonoïdes a été évalué en utilisant la méthodologie de surface de réponse (MSR). Les modèles polynomiaux de second ordre obtenus par MRS décrivent de manière satisfaisante l'extraction par micro-onde et ultrason des flavonoïdes. Les valeurs expérimentales sont très proches des valeurs prédites ce qui confirme la validité des modèles mathématiques. L'optimisation de l'extraction :

Par la méthode de BBD nous a donné une teneur optimale en flavonoïdes de 2,63 mg EQ/g PS pour *Pistacia* à 35 % (v/v) d'éthanol, une puissance de 500w et un ratio de 35 :1 ml/g durant 69 s. Et une teneur optimale en flavonoïde de 3,13 mg EQ/g PS pour *Myrtus* à 30 % (v/v) d'éthanol, une puissance de 500 w et un ratio de 31 :1 ml/g durant 56 s.

Par la méthode CCD nous a donné une teneur optimal en flavonoïdes de 4,13 mg EQ/g PS pour *Pistacia* à 35 % (v/v) d'éthanol, une amplitude de 28 % durant 10 min. Et une teneur optimale de 4,55 mg EQ/g pour *Myrtus* avec 70 % (v/v) d'éthanol et une amplitude de 30 % durant 15 min.

**Mots clés :** optimisation, extraction, micro-onde, ultrason, flavonoïdes, activité antioxydante, méthodologie de surface de réponse, *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis*.

## Abstract

In this study, methods of extraction by microwave and ultrasound were used for extraction of flavonoids from *Pistacia lentiscus* and *Myrtus communis* leaves. The effect of the independent variables of microwave power, amplitude of ultrasonic time, ratio (liquid/solid) and percentage of ethanol on the content of flavonoids was evaluated using response surface methodology (RSM). The second order polynomial models obtained by RSM satisfactorily describe the extraction by microwave and ultrasound flavonoids. The experimental values are very close to predicted values confirming the validity of mathematical models. The optimization of extraction:

By the method of BBD, we gave an optimal flavonoid content of 2.63 mg EQ/g DP for *Pistacia* 35% (v/v) ethanol, a power of 500W and a ratio of 35: 1 ml /g for 69 s. And an optimum content of 3.13 mg flavonoid QE/g DP for *Myrtus* to 30% (v/v) ethanol, a power of 500 W and a ratio of 31: 1 ml /g for 56 s.

By the CCD method, gave to an optimal flavonoid content of 4.13 mg QE/g DP for *Pistacia* 35% (v/v) ethanol, 28% amplitude for 10 min. And an optimum content of 4.55 mg QE/g for *Myrtus* with 70% (v/v) ethanol 30% amplitude for 15 min.

**Keywords:** optimization, flavonoids, antioxidant activity, microwave-assisted extraction, ultrasonic-assisted extraction, Response Surface Methodology, *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis*.