

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

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



Réf :.....

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

MASTER

Thème

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

Présenté par :

BELGHIAAT Saber & ABERBOUR Fahima.

Soutenu le : **20 Septembre 2021**

Devant le jury composé de :

Mme Moulaoui K.	MCB	Présidente
Mr Tacherfiout M.	MCB	Encadreur
Mr Zaidi H.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2020/2021.

REMERCIEMENTS

(قل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون)

صدق الله العظيم

Nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnée la force, la patience et la volonté d'achever ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promoteur Dr. TACHERFIOUT Mustapha, pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien, soyez assuré Docteur, de toutes notre estime et notre profond respect.

Nous exprimons nos remerciements à Mme Moulaoui K. d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Mr Zaidi H. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également Dr BOUKHALFA Farid pour son aide et ses conseils.

Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce modeste travail en particulier : Saida, Mennad.

Un grand merci à toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation, et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Saber et Fahíma

Dédicace

'كن عالما .. فإن لم تستطع فكن متعلما ، فإن لم تستطع فأحب العلماء ، فإن لم تستطع فلا تبرغمهم'

A la mémoire de mon père

A ma mère, que le tout puissant la protège

A mes frères et mes sœurs

A toute ma famille

A mes ami(e)s et collègues

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

*Que ce travail soit une part de ma reconnaissance
envers eux.*

SABER

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon très cher Père Youcef : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A ma tendre Mère Djamila: Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mes adorables sœurs : Fatima et Rima

A mes chers frères : Messaoud, Remtane et Chabaane

A mes chers petits neveux et nièces : Vita, Peter, Mehdi et Lahna.

A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses et à mes chers cousins cousines.

A tous mes amis : Walid, Moussa, Lyes, Hemza, Nadjib, Hani, Dr Moulla, Abdellah, Habib, Aïmed, Massi, Tahar, Halim...

A toutes mes amies : Dr Yala Rachida, Aldja, Halima, Salima, Sonia, Rachida, Dania, Cylia, Dilia, Mariem, samira, lamia, Djadjiga, fatima, Ahlem, Radia, Camilia, Nesrine....

A mon cher binôme Saber qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

FAHIMA

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction..... 1

Chapitre I : synthèse bibliographique

I-1- Les plans d'expérience	2
I-1-1- Définition	2
I-1-2-Principe	2
I-1-3-Terminologie	3
I-1-3-1- Réponse	3
I-1-3-2- Facteurs	3
I-1-3-3- Domaine d'un facteur	3
I-1-3-4- Espace expérimental	4
I-1-3-5- Domaine d'étude	4
I-1-3-6- Matrice d'expérience.....	4
I-1-4- Plans de surfaces et de réponse (RSM)	5
I-1-5- Plan Box-Behnken	5
I-1-5-1- Définition du plan de Box–Behnken	5
I-2- Généralité sur la plante.....	5
I-2-1- Description et classification	7
I-2-2- Nomenclature	7
I-2-3- Description botanique et habitat	7
I-2-4- Utilisation traditionnelle	8
I-2-5- Composition biochimique	8
I-2-6- Activités biologiques	8
I-2-6-1- Activité antioxydant	8
I-2-6-2- Activité antihyperlipidémique.....	9

I-2-6-3- Activité antimicrobienne	9
I-2-6-4- Activité antimutagène	9

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal	11
II-1-1- Récolte et séchage, broyage et tamisage	11
II-2- Souches microbiennes	11
II-3- Méthodes	12
II-3-1- Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux	12
II-3-1-1- Optimisation des conditions d'extraction	12
II-3-1-2- Extraction des polyphénols totaux	14
II-3-2- Dosages des polyphénols totaux	14
II-3-2-1- Principe	14
II-3-2-2- Mode opératoire	14
II-4- Détermination de l'activité antimicrobienne	15
II-4-1- Milieu de culture	15
II-4-2- Stérilisation du matériel	15
II-4-3- Préparation des dilutions d'extraits de <i>R.alaternus</i>	15
II-4-4- Inoculum bactérien	16
II-4-5- Ensemencement et dépôt des disques	16
II-4-6- Détermination du diamètre d'inhibition	16

Chapitre III : Résultats et discussion

III- Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux.....	17
III-1- Essais préliminaires	17
III-1-1- Choix du temps d'extraction	17
III-1-2- Choix de ratio (liquide/solide) d'extraction	17
III-1-3- Choix du solvant d'extraction	18
III-1-4- Choix de la puissance	18
III-1-5- Choix de la polarité	19

III-2- Plan d'expérience Box-Behnken	19
III-2-1- Analyse des résultats	19
III-2-2- Validation du model	21
III-2-2-1- Coefficient de corrélation	21
III-2-2-2-Effet des facteurs (coefficients)	22
III-2-3- Modèle mathématique.....	24
III-2-4- Solution	25
III-3-1- Pouvoir antibactérien de l'extrait	26
Conclusion	31
Références bibliographiques	32
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection

BBD : Box-Behenken Design

°C : Degré celsius

(D) : diamètre des zones d'inhibition

h : Heure

JMP14 : John's Macintosh Project 14

MAE : extraction assistée par microonde

min : Minute

ml/g MS : Millilitre par gramme de la matière sèche

mg/ml : Milligramme par millilitre.

mg Eq AG/g M.S : Milligramme équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche.

mm : Millimètre

nm : Nanomètre

R. alaternus : *Rhamnus alaternus*.

RSM : Méthodologie des surfaces de réponses

R² : Coefficient de corrélation

S : Seconde

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

TPT: polyphénols totaux

µl : Microlitre

µm : Micromètre

PPt: polyphénols totaux

W: Watt

W_{8O₂₃} : Oxydes bleus de tungstène

W_{8O₂₃} : Oxydes bleus de tungstène

X1 : Le temps d'extraction

X2 : La puissance d'extraction

X3 : Le ratio liquide/solide

X4 : La polarité du solvant

% : Pourcentage

Liste des figures

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
1	Domaine d'un facteur	3
2	L'espace expérimental	4
3	Domaine d'étude	4
4	Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	6
5	Les feuilles et les fruits de <i>Rhamnus alaternus</i>	7
6	Photographie des feuilles du <i>R. alaternus</i> (à gauche) et de la poudre obtenue (à droite)	11
7	Plan de prédiction réelle des composés phénoliques des feuilles de <i>R. alaternus</i>	21
8	Surfaces de réponse pour les interactions : (A) temps-ratio, (B) ratio-polarité	24
9	Diamètre des halos jaune claire en présence d'une concentration de 250 mg/ml de l'extrait optimisé des feuilles de <i>R. alaternus</i>	27
10	Diamètre des halos jaune claire en présence d'une concentration de 250 mg/ml de l'extrait optimisé des feuilles de <i>R. alaternus</i>	28

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Différents types des plans d'expériences	2
II	Classification botanique de <i>R. alaternus</i>	6
III	Références des souches bactériennes testées	12
IV	Niveaux des variables choisies pour l'optimisation d'extraction des polyphénols	12
V	Matrice d'expérience donnée par le plan BBD	13
VI	Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux par le plan d'expérience Box-Behnken de la poudre des feuilles de <i>R. alaternus</i>	20
VII	Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré	22
VIII	Conditions optimales d'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles de <i>R. alaternus</i>	25
IX	Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Staphylococcus aureus</i>	29
X	Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec <i>Escherichia coli</i>	29

Introduction

Introduction

Pendant des millénaires, tous les peuples ont développé des remèdes traditionnels selon leur intelligence, leur génie, ainsi que leur relation à l'environnement, l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique aussi ancienne que l'histoire de l'humanité. Il est désormais largement reconnu que les plantes sont la principale source de médecine traditionnelle, grâce à des produits dits métabolisme secondaires, et sont donc une source inépuisable de différents types de métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes, saponines...etc.) qui offrent des propriétés curatives précieuses (**Eddouks et al., 2007**).

Rhamnus alaternus est un arbuste vivace réparti le long du bassin méditerranéen, riche par différentes substances, notamment des anthraquinones, mais aussi des tanins et des flavonoïdes (**Izhaki et al., 2002**). C'est une plante médicinale traditionnelle bien connue utilisée depuis longtemps grâce à ses bienfaits, notamment pour le traitement des complications hépatiques, dermatologiques et la jaunisse.

L'extraction à partir de la matière végétale est une étape très importante dans l'isolement et l'identification des composés phénoliques, le processus d'extraction peut être influencé par de nombreux facteurs (**Telli et al., 2010**). Les études paramétriques classiques ne prennent en compte que les effets individuels (simples) des paramètres et nécessitent un nombre élevé d'expériences. Des procédures plus pratiques impliquent des plans factoriels et fournissent des modèles mathématiques ajustés grâce à un nombre réduit d'expériences (**Bodo et al., 2004**). Le développement de la méthodologie de surface de réponse a simplifié l'étude d'optimisation dans laquelle plusieurs paramètres peuvent être étudiés simultanément (**Wong et al., 2015**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux des feuilles de *Rhamnus alaternus*, en appliquant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) du plan Box-Behnken. Le premier chapitre est synthèse bibliographique sur la plante et la méthodologie des surfaces de réponses. Le 2^{ème} chapitre décrit la méthodologie utilisée pour optimiser l'extraction des composés phénoliques. Enfin, le dernier chapitre expose les résultats de l'optimisation de l'extraction ainsi que l'activité antimicrobienne de l'extrait optimisé.

Chapitre I : Synthèse bibliographique.

I-1- Les plans d'expériences

I-1-1- Définition

A l'heure actuelle, certaines méthodes de fabrication en laboratoire deviennent de plus en plus complexes, elles dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à visualiser. Seule l'expérimentation permet d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont réalisées sans méthodologie rigoureuse, elles conduiront très probablement à des impasses (modèle impossible à ajuster, résultats incohérents, etc...) ou à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la méthode des plans d'expériences est recommandée pour optimiser ce type de démarche.

Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés (**Fadil et al., 2015**). Il existe différents types de plans d'expériences, qui peuvent être regroupés en deux grandes familles (**Tableau I**) (**Goupy, 1999**).

Tableau I : Différents types des plans d'expériences.

Plans de modélisation	Plans de criblage
Plans de Box-Behnken	Plans sursaturés
Plans D-optimaux	Plans factoriels fractionnaires
Plans de Roquemoire	Plans à un facteur à la fois
Plans de mélange	Plans factoriels complets
Plan de plaquette et Burmane	
Plans factoriels complets	
Plans composites centré	
Plans non conventionnels	
Plans de Doehlert	

I-1-2-Principe

Avec la conception des expériences, on obtient le maximum de renseignements avec le minimum des essais (**Goupy, 2006**). En effet, son principe consiste à faire varier

simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs (qui sont les variables, discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci permet de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse (**Faucher, 2006**). L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : "obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences" (**Tinsson, 2010**).

I-1-3-Terminologie

Les plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie nécessaires à définir :

I-1-3-1- Réponse

La réponse est appelée grandeur d'intérêt observée dans le phénomène étudié. Elle comprend une quantification des performances du système étudié (**Goupy and Creighton, 2006**).

I-1-3-2- Facteurs

Un facteur est considéré comme toute variable obligatoirement contrôlable, susceptible de modifier le fonctionnement de la réponse observée (**Tinsson, 2010**). On distingue plusieurs types de facteurs ; facteurs continus, facteurs discrets, facteurs ordonnables et facteurs booléens (**Goopy, 2006**).

I-1-3-3- Domaine d'un facteur

Un facteur varie souvent entre deux limites, inférieure et supérieure. La limite inférieure est le niveau bas (notée le plus souvent par -1), et la limite supérieure est le niveau haut (notée le plus souvent par +1). L'ensemble des valeurs qui peuvent être factorisées entre les niveaux bas et élevé, s'appelle le domaine de facteur ou domaine de variante (**Figure 1**) (**Goupy and Creighton, 2006**).



Figure 1 : Domaine d'un facteur (**Goupy, 2006**).

I-1-3-4- Espace expérimental

Matrice réduit l'ensemble de conditions de test, appliquée aux variables pour effectuer différents essais, dans le conception du plan d'expériences choisi (**Figure 2**) (**Kamoun et al., 2011**).

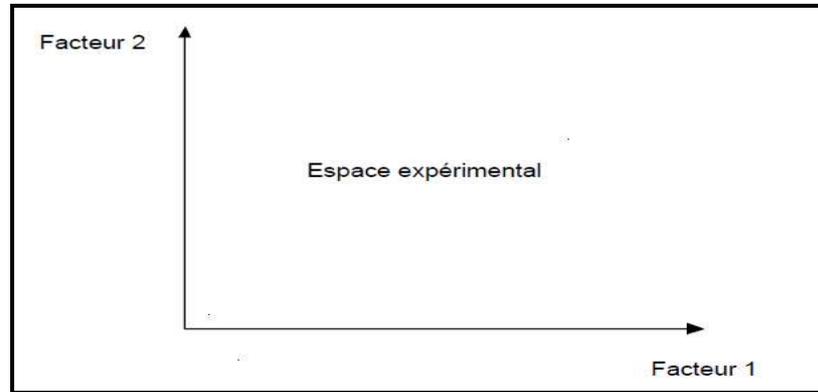


Figure 2 : L'espace expérimental (Goupy, 2006).

I-1-3-5- Domaine d'étude

Ce domaine est déterminé par les niveaux hauts et bas de tous les facteurs, et éventuellement par des contraintes entre les facteurs (**Figure 3**) (**Goupy and Creighton, 2006**).

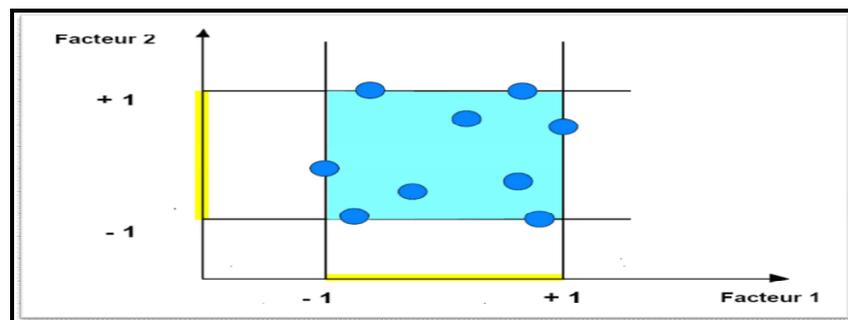


Figure 3 : Domaine d'étude (Goupy, 2006).

I-1-3-6- Matrice d'expérience

C'est un ensemble de niveaux appliqués aux variables, pour différents tests après avoir sélectionné le plan expérimental (**Goupy and Creighton, 2006**).

I-1-4- Plans de surfaces et de réponse (RSM)

La méthode des surfaces de réponse (RSM) est basée sur le plan composite de second degré, qui permet d'évaluer des relations qui peuvent exister entre les différentes réponses, ainsi que les facteurs (**Ben Slimane et al., 2015**). La méthodologie RSM fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation, il s'agit d'une technique de modélisation empirique permettant d'évaluer la relation entre un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et les résultats. Certains plans factoriels sont utilisés par cette technique pour l'analyse des résultats ; à savoir les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans composites centrés (**Fadil et al., 2015**). L'équation est donnée selon la formule suivante (**Khusro et al., 2017**).

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

Où

Y= grandeur d'intérêt

$X_i X_j$: les variables.

$\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$: les coefficients de polynôme

I-1-5- Plan Box- Behnken

I-1-5-1- Définition du plan de Box–Behnken

Le plan Box–Behnken est une conception sphérique, rotative ou presque rotative du second ordre. Il est basé sur une planification factorielle incomplète à trois niveaux, incluant un point central et des points médians des arêtes d'un cube, il peut être considéré comme trois plans factoriels imbriqués 2^2 avec un point central (**Figure 4**). Il convient de souligner que bien que le dessin puisse être dérivé d'un cube, il est sphérique, donc les sommets du cube ne sont pas couverts par le dessin et donc la prédiction de ces points est une extrapolation et doit être évitée. Le nombre de points expérimentaux (N) est déterminé par l'expression $N=2k(k+1) + C_0$, où k est le nombre de variables et C_0 est le nombre de points centraux. Il a été fréquemment utilisé pour l'optimisation finale des processus souhaités (**Zolghanein et al., 2013**). Il permet l'estimation des paramètres du modèle quadratique, la construction de conceptions séquentielles et la détection d'un manque d'ajustement du modèle (**Ferreira et al., 2007**).

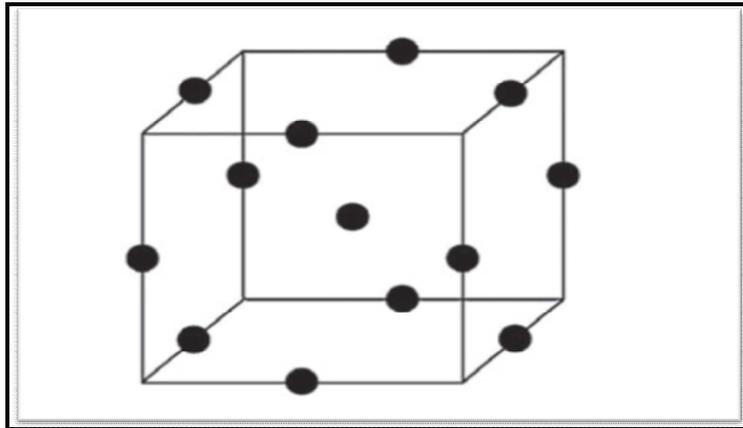


Figure 4: Plan de Box- Behnken pour trois facteurs (Zolghanein *et al.*, 2013).

I-2- Généralité sur la plante

I-2-1- Description et classification

Rhamnus alaternus appartient à la famille des *Rhamnaceae* (Cuoco *et al.*, 2014). Les plantes de cette famille ont fait l'objet de nombreuses indications thérapeutiques en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne (Benchiha *et al.*, 2017), c'est une famille endémique d'arbres, d'arbustes et de plantes herbacées contenant environ 50 genres et 900 espèces (Richardson *et al.*, 2000). En Algérie, 9 espèces végétales appartenant à 3 genres sont répertoriées dans diverses régions et classées selon leurs caractéristiques morphologiques (Harrar, 2018). La classification botanique de *R. alaternus* est représenté dans le tableau suivant :

Tableau II : Classification botanique de *R. alaternus* (Quezel and Santa 1963).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rhamnales
Famille	<i>Rhamnaceae</i>
Genre	<i>Reynosia</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>
Sous espèce	<i>R. alaternus eu-alaternus</i> Maire

I-2-2- Nomenclature

Plusieurs noms vernaculaires sont attribués à *R. alaternus*, à savoir ;

Noms arabes : oud el khir (Ben Ammar et al., 2008), Méliles, Qaced (Beloued, 2001)

Noms targuis et kabyles : Ajroudj, Khalis n'imidekh, Amliles (Beloued, 2001).

Noms français : Alaterne (Beloued, 2001), Nerprun méditerranéen (Izhaki et al., 2002).

Noms anglais : Italian Buckthorn, Mediterranean Buckthorn (Akerreta, 2009).

I-2-3- Description botanique et habitat

R. alaternus est un arbuste dioïque ou petit arbre toujours vert qui est commun dans la région méditerranéenne (Bas et al., 2009), cet arbrisseau de croissance lente peut atteindre 2 à 6 m de haut (Izhaki et al., 2002). Les feuilles sont alternes, coriaces, épaisses, à courts pétioles, et vert dans les deux côtés. Les fleurs de couleur jaunâtre, très petites, elles fleurissent aux mois de janvier jusqu'à avril des fruits de petites baies d'abord rouges puis noires ayant un diamètre de 4 à 6 mm apparaissent entre mai et septembre (Izhaki et al., 2002 ; Longo et al. 2005). Chaque fruit a 2–5 graines chacune incluse dans un endocarpe qui s'ouvre et expulse la graine de courtes distances après avoir séché, mûrissant entre mai et octobre, et elles sont dispersées par les rongeurs et oiseaux (Bas et al., 2005). (Figure 5)



Figure 5 : Les feuilles et les fruits de *Rhamnus alaternus* (Longo et al., 2005).

R. alaternus est un arbuste réparti dans le bassin méditerranéen et en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie), en Asie et en Europe (Gulias et al., 2004). *R. alaternus* grandit dans des environnements xériques et dans des conditions humides (Varone and Gratani, 2009), elle pousse sur les zones côtières, les roches nues et les lisières des ruisseaux et des forêts (Longo et al., 2015).

I-2-4- Utilisation traditionnelle

R. alaternus est une plante médicinale bien connue et utilisée depuis longtemps pour le traitement de diverses maladies, elle a été employée comme digestif, diurétique, laxatif, hypotenseur et pour le traitement des complications hépatiques et dermatologiques (Ammar et al., 2009 ; Zeouk and Bakhti, 2020).

Les fruits et les feuilles de cette plante étaient utilisées en Algérie pour soigner les maladies de la peau, en plus de l'amygdalite, la décoction de ses feuilles est considérée comme un bon remède par voie orale pour le traitement de l'hépatite (Zeouk and Bakhti, 2020).

I-2-5- Composition biochimique

La plante de *R. alaternus* est caractérisée par la présence de plusieurs substances phénoliques spécialement les tanins et les anthraquinones. Différents aglycones d'anthraquinone, tels que l'émodyne, l'alaternine, le chrysophanol et le physcion, ont été isolés de l'écorce de tige de cette plante, l'émodyne a également été isolée d'autres parties de la plante telles que les feuilles et les fruits (Longo et al., 2005).

C'est une espèce riche aussi en flavonoïdes, elle contient le kaempferol, la quercétine, l'apigénine, kaempferol 3-O-B-isorhamninoside, rhamnocitrine 3-O-B-isorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (Ammar et al., 2009). La pulpe de *R. alaternus* est composée principalement d'eau (68%), de minéraux, de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine) (Izhaki et al., 2002).

I-2-6- Activités biologiques

I-2-6-1- Activité antioxydant

Les composés actifs de *R. alaternus* tels que les anthraquinones et les flavonoïdes jouent un rôle dans le mécanisme d'action antioxydant en raison de leurs structures. Les

flavonoïdes sont considérés comme de bons donneurs d'électrons d'hydrogène, cette caractéristique arrête la terminaison de la chaîne radicalaire et convertit les radicaux libres et les ROS en composés stables (Ammar *et al.*, 2009 ; Zeouk and Bakhti, 2020).

D'après Bhourri et ses collaborateurs (2011), qui ont isolé deux flavonoïdes de *R. alaternus* à savoir kaempférol 3-O-beta isorhamminoside (K3O-ir) et isorhamnocitrin 3-O-beta, Ces deux flavonoïdes identifiés peuvent conduire à une attaque contre les radicaux libres et par la suite contre les dommages cellulaires.

Les flavonoïdes et les anthraquinones sont les familles de *R. alaternus* les plus décrites comme ayant un bon potentiel antioxydant, qui ont un impact sur l'activité antioxydante, il existe une interconnexion entre les protéines et les composés polyphénoliques augmentant la biodisponibilité des formes (Zeouk and Bekhti, 2020).

Xu *et al.* (2019) ont étudié et testé l'interaction entre trois anthraquinones ; à savoir la rhéine, le chrysophanol et l'émodine avec la protéine β LG (β -Lactoglobuline), et ils ont démontré que la complexation a significativement augmenté l'hydro-solubilité des anthraquinones, puis la capacité antioxydante.

I-2-6-2- Activité antihyperlipidémique

L'extrait brut méthanolique de feuilles de *R. alaternus* a montré un puissant effet antihyperlipidémiant chez les rats rendus hyperlipidémique par le triton WR-1339 grâce à une forte réduction des taux de lipides sanguins. Il a diminué aussi fortement l'accumulation des lipides intracellulaire dans les cellules hépatiques HepG2 en culture, en augmentant le catabolisme des acides gras (Tacherfiout *et al.*, 2018).

I-2-6-3- Activité antimicrobienne

Les extraits et les fractions de feuilles de *R. alaternus* ont un puissant effet antibactérien contre cinq bactéries pathogènes à gram positif et négatif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 et *Salmonella typhimurium* NRRLB) qui provoquent des maladies humaines graves et une altération des aliments (Zeouk and Bekhti, 2020).

L'extrait méthanolique de l'écorce de *R. alaternus* a un effet antimicrobien important contre les bactéries, les dermatophytes et les levures. Il est plus efficace contre le

dermatophyte *Microsporum gypseum* et la levure *Candida albicans*. Cette activité importante pourrait s'expliquer par la richesse de l'extrait d'écorce de *R. alaternus* en anthraquinones (Zeouk et al., 2019).

I-2-6-4- Activité antimutagène

Deux études (Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2008) ont étudié l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *R. alaternus* contre l'azoture de sodium en tant qu'agent mutagène avec l'exemple de la souche *Salmonella thyphimurium* TA1535. L'extrait aqueux de *R. alaternus* a réduit de manière significative la mutagénicité induite par l'azoture de sodium.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal

II-1-1- Récolte et séchage, broyage et tamisage

Le présent travail a été réalisé sur les feuilles de *Rhamnus alaternus*. La plante a été collectée au mois de mai 2021 dans une zone localisée dans la région de « Boukhelifa », wilaya de Bejaia où elle se développe d'une manière sauvage. Après la récolte, les feuilles ont été nettoyées et débarrassées de la poussière et d'autres impuretés, puis étalés à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière pour séchage, puis placées dans une étuve à 40°C pendant 48h pour affiner le séchage et obtenir un meilleur broyage.

Les feuilles totalement séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique en poudre fine, puis la poudre a subi un tamisage à l'aide d'un tamis de 250 µm de diamètre pour obtenir une poudre homogène. La poudre obtenue a été conservée dans une boîte en verre fermée, couverte d'aluminium et stockés à l'abri de la lumière.



Figure 6 : Photographie des feuilles du *R. alaternus* (à gauche) et de la poudre obtenue (à droite) (**Originale**).

II-2- Souches microbiennes

Les souches bactériennes utilisées sont des souches fournies par le laboratoire de recherche en génie biologique du cancer de Bejaia. Au total, six souches de référence de bactéries ont été testées pour l'activité antimicrobienne, trois souches à gram négatif (*Escherichia coli*) et trois souches à gram positif (*Staphylococcus aureus*) (**Tableau III**).

Tableau III : Références des souches bactériennes testées.

Souches	<i>Staphylococcus aureus</i> (à Gram positif)	<i>Escherichia coli</i> (à Gram négatif)
Références	306	591
	36411	850
	304	8787

II-3- Méthodes

II-3-1- Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux

II-3-1-1- Optimisation des conditions d'extraction

Le modèle expérimental est divisé en deux parties. Tout d'abord la sélection des paramètres d'optimisation, selon le model classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres, puis l'optimisation de l'extraction en fonction de la RSM (**Heinonen et al., 1998 ; Al-Farsi et al., 2005**).

Pour étudier la réponse Y, une conception de Box-Behnken a été utilisée. Des variables significatives telles que le temps, la puissance, le ratio et la polarité ont été choisies comme variables critiques et désignées respectivement par X1, X2, X3 et X4. Le niveau bas, moyen et élevé de chaque variable a été désigné dans cette étude comme (-), (0) et (+) respectivement pour optimiser l'extraction des composés phénoliques (**Tableau IV**) (**Khajeh and Sanchooli, 2010**).

Tableau IV : Niveaux des variables choisies pour l'optimisation d'extraction des polyphénols.

Paramètres	Niveau bas (-1)	Niveau centré (0)	Niveau haut (+1)
X1 (Temps en s)	40	80	120
X2 (Puissance en W)	300	600	900
X3 (Ratio : volume solvant/g échantillon)	5 ml/g	10 ml/g	15 ml/g
X4 (Polarité en %)	40	70	100

Le plan Box-Behnken choisit se compose de 27 tests dont un test centralisé (0, 0, 0) qui est répété trois fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction (Jose *et al.*, 2011). La matrice d'expérience du plan Box-Behnken est représentée dans le Tableau V.

Tableau V : Matrice d'expérience donnée par le plan BBD.

N° d'essais	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
1	0	0	-1	-1
2	+1	-1	0	0
3	-1	-1	0	0
4	+1	+1	0	0
5	0	0	+1	-1
6	0	0	+1	-1
7	0	0	0	0
8	0	0	-1	+1
9	-1	+1	0	0
10	+1	0	0	+1
11	+1	0	0	-1
12	0	+1	-1	0
13	0	-1	-1	0
14	0	-1	+1	0
15	0	+1	+1	0
16	0	0	0	0
17	-1	0	0	+1
18	-1	0	0	-1
19	-1	0	+1	0
20	0	-1	0	+1
21	-1	0	-1	0
22	0	-1	0	-1
23	0	+1	0	+1
24	+1	0	-1	0
25	0	+1	0	-1
26	0	0	0	0
27	+1	0	+1	0

Les résultats expérimentaux du plan d'expérience de box-behnken sont analysés par le logiciel JMP14 (logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience).

III-3-1-2- Extraction des polyphénols totaux

Le développement de techniques plus respectueuses de l'environnement devient un enjeu majeur. Utiliser des méthodes plus efficaces en termes de productivité, de temps et de coûts, mais aussi limiter la consommation de solvants, devient une priorité pour de nombreuses entreprises. De plus, le solvant utilisé doit également être plus vert que possible, notamment pour la protection de l'environnement et des expérimentateurs. Dans la présente étude, l'extraction assistée par micro-onde a été utilisée pour extraire les polyphénols des feuilles de *R. alaternus*, c'est une méthode d'extraction très utilisée à cause de son fort rendement, sa vitesse d'exécution ainsi que son coût réduit (**Gourguillon et al., 2016**).

Une prise d'essai de la poudre des feuilles de *R. alaternus* est mise en contact un ballon à fond plat avec un volume de solvant qui est l'éthanol, à différentes polarités (40, 70 et 100%). Le volume du solvant est soit de 5, 10 ou 15 ml par gramme de poudre des feuilles de *R. alaternus*. Le mélange est mis dans le micro-onde et l'extraction a été réalisée à différentes puissance (300, 600 et 900 Watt) pendant différents temps (40, 80 et 120 seconde). A chaque fois, le mélange a été filtré avec du papier-filtre (Whatman) puis centrifugé à une vitesse de 3000 tour/minute pendant 3 min pour éliminer les impuretés. Les extraits obtenus ont été stockés dans le réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à dosage des composés phénolique totaux..

II-3-2- Dosages des polyphénols totaux

II-3-2-1- Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisé pour obtenir une estimation brute de la quantité de composés phénoliques totaux présents dans un extrait (**Wong et al., 2006**). Il est formé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), qui lors de l'oxydation des phénols, sont réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La couleur produite a un pic d'absorbance allant jusqu'à 740 nm qui est proportionnel à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot and Charpentier, 2006**).

II-3-2-2- Mode opératoire

La teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits des feuilles de *R. alaternus* a été déterminé par spectrophotométrie selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu suivant le protocole rapporté par (Bouyahya *et al.*, 2017) avec quelques modification. A température ambiante, 0,1 ml de chaque extrait des feuilles de *R. alaternus* ont été mélangés avec 0,5 ml du réactif de folin-ciocalteu (0,1N dans de l'eau distillée). Après 5 min d'incubation, 0,4 ml d'une solution de carbonate de sodium (6%) a été ajouté, mélangé au vortex et laissé incubé pendant 90 min à l'obscurité. Les absorbances ont été mesurées à 740 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait a été remplacé par l'éthanol.

Une courbe d'étalonnage (Annexe 02) a été obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (mg Eq AG/g M.S).

II-4- Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait optimisé a été évalué par la méthode de diffusion de disques de papier (Yekhlef *et al.*, 2011), avec quelques modifications, c'est une méthode qui permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens (Mezouar *et al.*, 2014).

II-4-1- Milieu de culture

Pour réaliser ce test, le milieu Muller-Hinton a été utilisé et préparé comme suit : la poudre (38 g) de milieu de Muller-Hinton est solubilisée dans un litre d'eau distillée, Le mélange est chauffé sous agitation jusqu'à dissolution complète, puis autoclavé pendant 15 minutes à 121°C tout en évitant un surchauffement. La gélose de Muller Hinton fondue est versée dans des boîtes de Pétri de 9 cm avec une épaisseur de 4 mm.

III-4-2- Stérilisation du matériel

Le milieu de culture, l'eau distillée, les tubes à essai utilisés pour préparer les solutions bactériennes et les disques en papier Wattman enveloppé dans du papier aluminium ont été autoclavés à 121°C pendant 15 min.

II-4-3- Préparation des dilutions d'extraits de *R. alaternus*

L'extrait de *R. alaternus* a été dissous dans l'eau distillée stérile pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi où la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 50 mg/ml, Une autre solution mère différente a été réalisée pour chaque extrait avec une concentration de 250mg/ml.

II-4-4- Inoculum bactérien

Les souches bactériennes ont été ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. À l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et identiques à chaque souche bactérienne à tester ont été retiré. L'anneau a été rincé dans 1 ml d'eau physiologique, puis mélanger au vortex pour obtenir une suspension bien homogénéisée.

II-4-5- Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement se fait par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est plongé dans la suspension bactérienne, puis appuyez fermement sur la paroi interne du tube, l'écouvillon est frotté sur toute la surface gélosée de haut en bas par petites stries.

Cette opération a été répétée deux fois en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement a été terminée en passant un dernier écouvillon sur toute la surface de la gélose, l'écouvillon est rechargé à chaque ensemencement des boîtes de Pétri, les disques ont été imbibées de 15 µl d'extrait, déposées soigneusement au-dessus de la gélose ensemencée avec des pinces stériles. Enfin, les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 h à 37 ° C.

III-4-6- Détermination du diamètre d'inhibition

Après 24 heures d'incubation, une zone évidente ou un halo présent (e) autour d'un disque si l'extrait inhibe la croissance microbienne. Plus la zone d'inhibition est grande, plus les bactéries sont sensibles. Les diamètres des halos d'inhibitions autour des disques ont été mesurés.

Chapitre III

Résultats et discussion

III- Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux

Le but de la présente étude est l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus*, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses, model Box behnken. Quatre paramètres ont été étudiés : le temps d'extraction (s), la puissance (Watt), le ratio liquide/solide (ml/g) et la polarité (%).

III-1- Essais préliminaires

III-1-1- Choix du temps d'extraction

Le temps d'extraction est un paramètre très important dans le processus d'extraction des composés phénoliques. Ce paramètre correspond au temps pendant lequel le solvant et la matière végétale sont en contact l'un avec l'autre (**Mandal et al., 2007**). La durée pendant laquelle le solvant et la matière végétale sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela affecte l'efficacité de la processus d'extraction (**Michiels et al., 2012**). Quand le temps d'extraction augmente le contenu en polyphénols totaux augmente, mais la prolongation du temps d'extraction des polyphénols totaux par chaque solvant examiné, fait baisser leur rendement (**Telli et al., 2010**). La maîtrise de ce paramètre ne permet pas seulement de réduire le temps d'extraction et de limiter la consommation d'énergie de l'opération mais aussi, d'éviter d'exposer les polyphénols à un risque plus important d'oxydation en raison du temps d'extraction trop long et par conséquent, de dégrader des molécules réduisant le rendement d'extraction (**Naczka, 2004**).

III-1-2- Choix de ratio (liquide/solide) d'extraction

L'extraction liquide/solide est un phénomène qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des exemples. Il est pratiquement impossible de dissoudre un seul composé, car d'autres constituants de la phase solide seront entraînés avec lui, quelque soit le solvant utilisé. Au laboratoire, on utilise parfois des appareils plus efficaces, les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa, qui fonctionnent en continu. L'extraction est une étape très importante pour l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques, et il n'y a pas de méthode

d'extraction unique et standard. L'extraction liquide/solide des composés phénoliques avec différents solvants est parmi les techniques les plus utilisées (**Bucic-Kojic et al., 2007**). Le ratio liquide/solide affecte de façon significative la teneur en polyphénols totaux (**Telli et al., 2010**).

Pour avoir une meilleure extraction, le solvant doit pénétrer dans la matrice solide pour accéder aux solutés. Le volume de solvant doit être suffisant pour bien hydrater la phase solide, tout en permettant un transfert plus facile du soluté vers le solvant. Le volume du solvant doit être aussi suffisant afin d'éviter la saturation en soluté et permettre une bonne diffusion des solutés dans la phase liquide (**Pingret et al., 2012 ; Virot et al., 2010**).

III-1-3- Choix du solvant d'extraction

L'extraction par les solvants organiques est le procédé le plus largement utilisé pour la préparation d'extraits végétaux en raison de leurs facilités d'utilisation, et de leurs efficacités (**Xu and Chang, 2007**). Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par extraction avec des solvants organique (**Telli et al., 2010**). Le choix du solvant d'extraction est fondamental pour obtenir un processus d'extraction optimal, ce choix est déterminé par la solubilité des molécules et par les interactions solvant-matrice. L'éthanol est généralement recommandé pour l'extraction de composés bioactifs dans l'industrie agroalimentaire en raison de sa faible toxicité. De plus, il est économiquement plus accessible que les autres solvants. Il a une influence significative sur le rendement et se réchauffe plus rapidement, ce qui améliore le processus d'extraction (**Bourgou et al., 2016 ; Cacace and Mazza, 2003 ; Mandal et al., 2007**).

III-1-4- Choix de la puissance

Lorsque la MAE (extraction assistée par microonde) est employée, la puissance peut avoir une influence essentielle sur le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait (**Gourguillon et al., 2016**). En général, l'efficacité d'extraction est améliorée avec l'augmentation de la puissance de micro-onde, en rendant les membranes cellulaires plus perméables, tout en augmentant le coefficient de diffusion des composés à extraire. Elle réduit également la viscosité du solvant facilitant ainsi le passage des substrats solides. Une puissance élevée implique toujours un risque de dégradation des composés phénoliques (**Mandal et al., 2007**). La puissance doit être choisie correctement pour éviter des

températures excessives, qui pourraient entraîner une dégradation du soluté et une surpression à l'intérieur des récipients (Camel, 2000).

III-1-5- Choix de la polarité

Lors de l'extraction des polyphénols d'une source végétale, la solubilité des composés phénoliques dans l'extrait est gouvernée par la polarité du solvant utilisé (Both et al., 2014 ; Ignat et al., 2011). Le mélange de solvants permet de moduler la polarité du solvant d'extraction et de faciliter l'extraction (Spigno and De Faveri, 2007).

III-2- Plan d'expérience Box-Behnken

III-2-1- Analyse des résultats

Plusieurs études ont été réalisées pour étudier la teneur et les effets bénéfiques des composés phénoliques dans différentes matrices végétales. L'extraction est la première étape de la récupération des polyphénols. Les conditions optimales pour l'extraction des polyphénols varient selon la matière première et les facteurs physico-chimiques tels que le temps, le rapport liquide/solide, la nature et la polarité du solvant et la puissance des ondes (Abd El-Salam and Morsy, 2019). Dans la présente étude, l'influence de divers facteurs sur la réponse a été obtenue en suivant la processus de conception d'analyse du RSM. Quatre facteurs et leurs interactions ont été étudiés afin d'optimiser l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles de *R. alaternus*. Les facteurs choisis sont : - Le temps d'extraction (X1) (en seconde) (40, 80, 120) ; - La puissance d'extraction (X2) (en Watt) (300, 600, 900) ; - Le ratio liquide/solide (X3) (ml de solvant/g de poudre végétale) (5, 10, 15) ; - La polarité du solvant (X4) (en %) (40, 70, 100).

Les résultats de la présente étude (Tableau VI), ont montré que le taux d'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles de *R. alaternus* variait de 1,92 à 12,82 mg EAG/ g MS. Ceci confirme l'influence des paramètres à savoir le temps, la puissance, la polarité du solvant, et le ratio, sur la teneur en composés phénoliques extraits. Tous les résultats ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard. L'équation de la courbe d'étalonnage était $y = 0,0179x - 0,0156$, avec un $R^2 = 0,9921$ (Annexe 02).

Tableau VI : Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux par le plan d'expérience Box-Behnken de la poudre des feuilles de *R. alaternus*.

n ° d'essai	Modèle	Temps (s)	Puissance (W)	Ratio (v/p)	Polarité (%)	Valeurs réelles TPT (mg EAG/ g MS)	Valeurs prédites TPT (mg EAG/ g MS)
1	00--	80	600	15	40	7,032	7,104
2	+00	120	300	10	70	7,986	7,381
3	--00	40	300	10	70	6,880	6,452
4	++00	120	900	10	70	4,921	5,354
5	00+-	80	600	5	100	5,251	5,184
6	00+-	80	600	5	40	2,916	2,562
7	0000	80	600	10	70	5,847	5,488
8	00-+	80	600	15	100	12,827	13,187
9	-+00	40	900	10	70	5,998	6,608
10	+00+	120	600	10	100	10,157	9,857
11	+00-	120	600	10	40	5,030	5,244
12	0+-0	80	900	15	70	9,664	8,968
13	0-0	80	300	15	70	8,526	8,957
14	0-+0	80	300	5	70	2,673	3,631
15	0++0	80	900	5	70	1,920	1,749
16	0000	80	600	10	70	5,052	5,488
17	-00+	40	600	10	100	9,713	9,759
18	-00-	40	600	10	40	5,107	5,667
19	-0+0	40	600	5	70	4,096	3,652
20	0-0+	80	300	10	100	10,244	10,180
21	-0-0	40	600	15	70	8,913	8,569
22	0-0-	80	300	10	40	5,905	5,614
23	0+0+	80	900	10	100	9,007	9,031
24	+0-0	120	600	15	70	9,583	9,761
25	0+0-	80	900	10	40	5,094	4,892
26	0000	80	600	10	70	5,564	5,488
27	+0+0	120	600	5	70	2,056	2,134

III-2-2- Validation du model

Le modèle mathématique, dans les plans d'expériences relie la réponse aux facteurs qui l'influence, pour avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

III-2-2-1- Coefficient de corrélation

D'après (Goupy, 2006), le R^2 est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié. Dans ce travail, la valeur de coefficient de corrélation R^2 est de 0.98, ce qui signifie qu'uniquement 2% des variations ne sont pas expliquées par le modèle (Figure 7). De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) est d'environ de 0.95, qui est assez élevée pour confirmer la haute significativité du model. Ce terme représente la valeur du coefficient de détermination (R^2) après élimination des termes (coefficients) inutiles du model. Un model contenant beaucoup de termes inutiles (non significatifs) aura une valeur du R^2 Ajusté très inférieure à celle du coefficient de corrélation (R^2) (El-Adawi et al., 2011). L'analyse de la variance de la régression montre que le model est hautement significatif, $P < 0,001$, ce qui confirme que le model est satisfaisant (Figure 7).

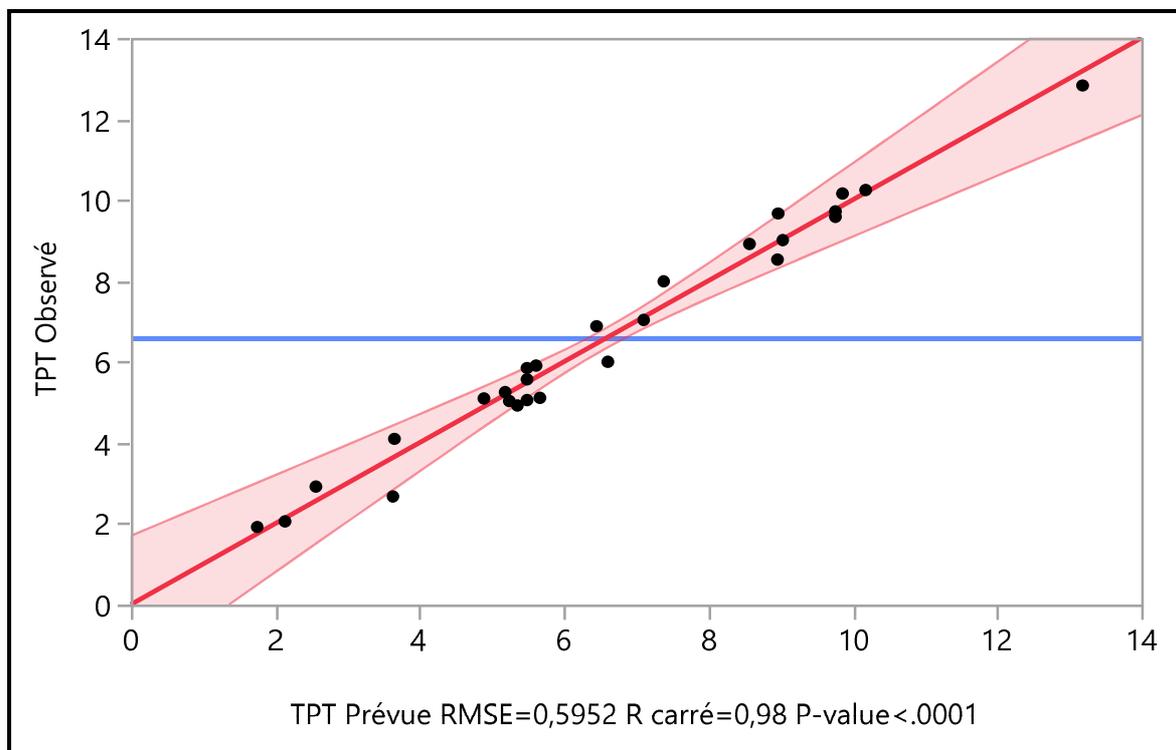


Figure 7 : Plan de prédiction réelle des composés phénoliques des feuilles de *R. alaternus*.

III-2-2-2-Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'effet des variables (X1, X2, X3 et X4) à $p < 0.05$ sur l'extraction des composés phénoliques (Uma et al., 2010). Les P-value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi les intensités d'interaction entre les paramètres. Les valeurs les plus petites indiquent la plus grande signification du facteur correspondant (Chan et al., 2009 ; Liu et al., 2010). Le tableau suivant (Tableau VII) donne l'analyse de la variance.

Tableau VII : Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
Constante	5,4883147	0,343649	15,97	<.0001*
Linéarité				
X1 (temps)	-0,081223	0,171825	-0,47	0,6449
X2 (puissance)	-0,467675	0,171825	-2,72	0,0185*
X3 (ratio)	3,136154	0,171825	18,25	<.0001*
X4 (polarité)	2,1762669	0,171825	12,67	<.0001*
Interaction				
X1 X2	-0,545824	0,297609	-1,83	0,0916
X1 X3	0,6773708	0,297609	2,28	0,0420*
X2 X3	0,472912	0,297609	1,59	0,1380
X1 X4	0,1301676	0,297609	0,44	0,6696
X2 X4	-0,106494	0,297609	-0,36	0,7267
X3 X4	0,8649983	0,297609	2,91	0,0132*
Quadratique				
X1 X1	0,5820929	0,257737	2,26	0,0433*
X2 X2	0,3791233	0,257737	1,47	0,1670
X3 X3	-0,040712	0,257737	-0,16	0,8771
X4 X4	1,5622474	0,257737	6,06	<.0001*

a) Effet linéaire

Les résultats de la présente étude, montrent que trois facteurs (X2, X3, X4, puissance, ratio, polarité, respectivement) possèdent un effet significatif sur l'extraction des polyphénols totaux de la poudre étudiée. Les paramètres, ratio (X3) et polarité du solvant (X4) ont une influence hautement significative avec une probabilité de de $P = <.0001$ et des coefficients d'estimation positifs de 3,136154; 2,1762669, respectivement (**Tableau VII**). Par contre, le facteur puissance (X2) a également un effet significatif avec une probabilité de l'ordre de $P = 0,0185$, mais avec un coefficient d'estimation négatif de l'ordre de -0,467675.

Cependant, l'effet n'est pas significatif pour le facteur temps (X1) représentant la probabilité de l'ordre de 0.6449 qui est supérieur à 0,05.

b) Effet interaction

Les résultats obtenus à partir de l'étude menée indiquent que les interactions temps-ratio (X1-X3) et ratio-polarité (X3-X4) sont significatives sur l'extraction des polyphénols totaux des feuilles de *R alternus*, avec des probabilités qui sont de l'ordre de 0,0420 ; 0,0132, respectivement, et des coefficients d'estimation positifs qui sont égales à 0,6773708 et 0,8649983, respectivement (**Tableau VII**).

A l'inverse, les interactions temps-puissance (X1-X2), puissance- ratio (X2-X3), temps-polarité (X1-X4) et ratio-polarité (X3-X4) sont non significatives, avec des probabilités égales à 0,0916, 0,1380, 0,6696 et 0,7267, respectivement (**Tableau VII**).

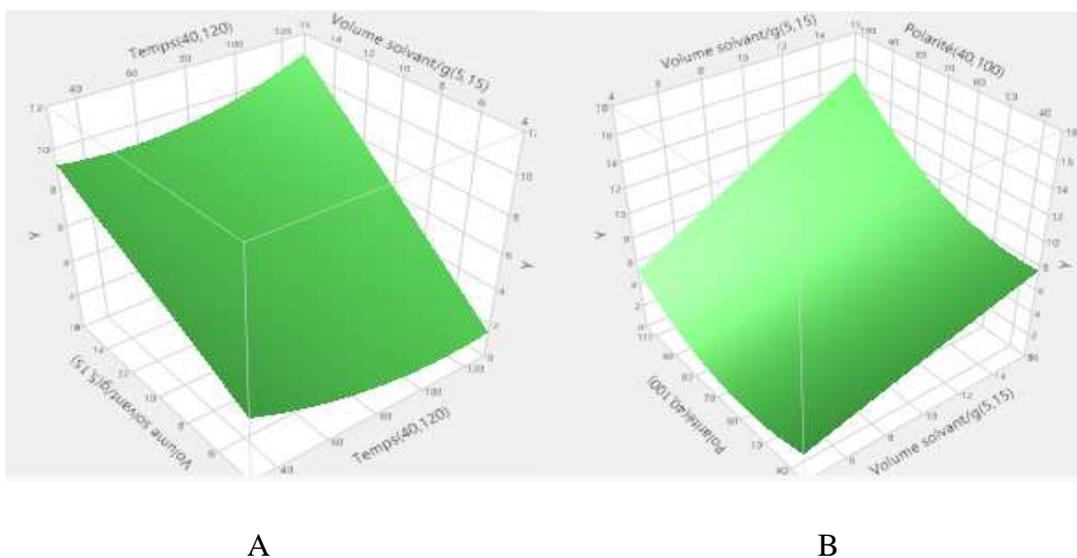


Figure 8 : Surfaces de réponse pour les interactions : (A) temps-ratio, (B) ratio-polarité.

c) Effet quadratique

Les résultats obtenus, montrent que seulement deux facteurs possèdent une influence quadratique sur l'extraction des polyphénols totaux de la poudre des feuilles de *R. alaternus*, à savoir : le temps d'extraction et la polarité du solvant. Le facteur $X1^2$ (temps – temps) montre un effet significatif avec une probabilité d'environ de $P = 0,0433$, et un coefficient d'estimation positif de l'ordre de 0,5820929. Le facteur puissance $X4^2$ (polarité-polarité) a également un effet significatif avec une probabilité de l'ordre de $P < 0,0001$, et un coefficient d'estimation positif de l'ordre de 1,5622474. Par contre, les paramètres quadratiques puissance $X2^2$ (puissance-puissance) et ratio $X3^2$ (ratio-ratio) ne présentent pas d'effet quadratique significatif sur l'extraction des polyphénols de poudre étudiée ($p > 0,05$) (**Tableau VII**).

III-2-3- Modèle mathématique

Quand les facteurs sont bien définis et que la réponse est connue, un plan d'expérience avec une liste d'expériences est suggéré pour mieux définir le phénomène étudié. En termes absolus, le choix d'un dispositif expérimental n'a pas de sens tant qu'il ne dépend pas du choix préalable du modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les polynômes (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux). Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan BBD, à quatre facteurs, est un modèle de deuxième degré classique, est intentionnellement simplifié en supprimant les effets d'interaction insignifiants dans l'analyse, ce qui permet de gérer facilement cette expression réduite tout en gardant presque la même qualité d'ajustement (**Tinsson, 2010**).

D'après les résultats obtenus, le modèle mathématique opté dans cette étude est représenté par la relation suivante :

$$Y = 5,4883147 - 0,467675 X2 + 3,136154 X3 + 2,1762669 X4 + 0,6773708 X1X3 + 0,8649983 X3X4 + 0,5820929 X1^2 + 1,5622474 X4^2$$

III-2-4- Solution

Pour tester la capacité prédictive du modèle, une vérification expérimentale des conditions optimales et des comparaisons entre les résultats prévus et les valeurs pratiques ont été mises en place par le logiciel JMP14.

Tableau VIII : Conditions optimales d'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles de *R. alaternus*.

Variables	Valeurs critiques
X1 : Temps [40-120] secondes	13,627336
X2 : Puissance [300-900] Watt	53,892367
X3 : volume solvant/g [5-15] ml/g MS	18,646988
X4 : Polarité [40-100] %	34,953743
Valeur prévue des polyphenols totaux (mg EAG/ g MS)	7,4220319

Les résultats montrent que la teneur en polyphénols totaux est beaucoup plus affectée par la polarité et le ratio, alors que la puissance de micro-onde et le temps d'extraction ne sont pas significatifs.

Les conditions optimales d'extraction des polyphénols totaux des feuilles de *R. alaternus* obtenues par le présent modèle étaient comme suit : un temps d'extraction de 13.62 seconde, une puissance de 53.89 Watt, un ratio liquide/solide de 18.64 ml de solvant/g de MS, et une polarité de l'éthanol de 34.95%. Dans ces conditions, le modèle a prévu une réponse maximale de 7.422 mg EAG/g de MS.

III-3- Etude de l'activité antibactérienne

Pour évaluer la sensibilité des bactéries à l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus*, et connaître l'effet antibactérien des polyphenols totaux extraits, la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton a été utilisée contre une série de bactéries : *Escherichia coli* (à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (à Gram positif).

L'activité antibactérienne de l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus* à différentes concentrations testée dans la présente étude, est qualitativement et quantitativement répartie par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition, ainsi que le diamètre de cette zone.

III-3-1- Pouvoir antibactérien de l'extrait

Moreira et ses collaborateurs (2005), ont classé le diamètre des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne, afin de déterminer l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne :

- Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm
- Sensible (+) : $9 \geq D \geq 14$ mm
- Très sensible (++) : $15 \geq D \geq 19$ mm
- Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés de l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus* ont été mesurées. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 9 et 10.

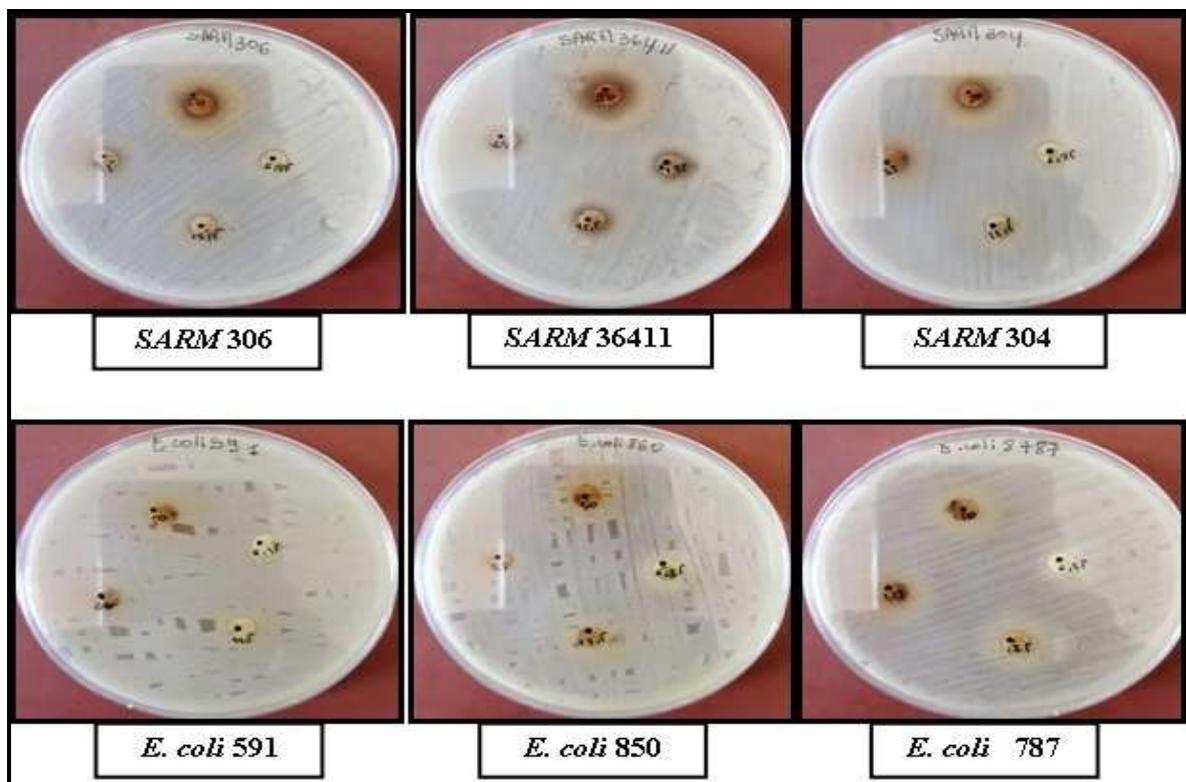


Figure 9 : Diamètre des halos jaune claire en présence de différentes concentrations (6.75, 12.5, 25 et 50 mg/ml) de l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus*.

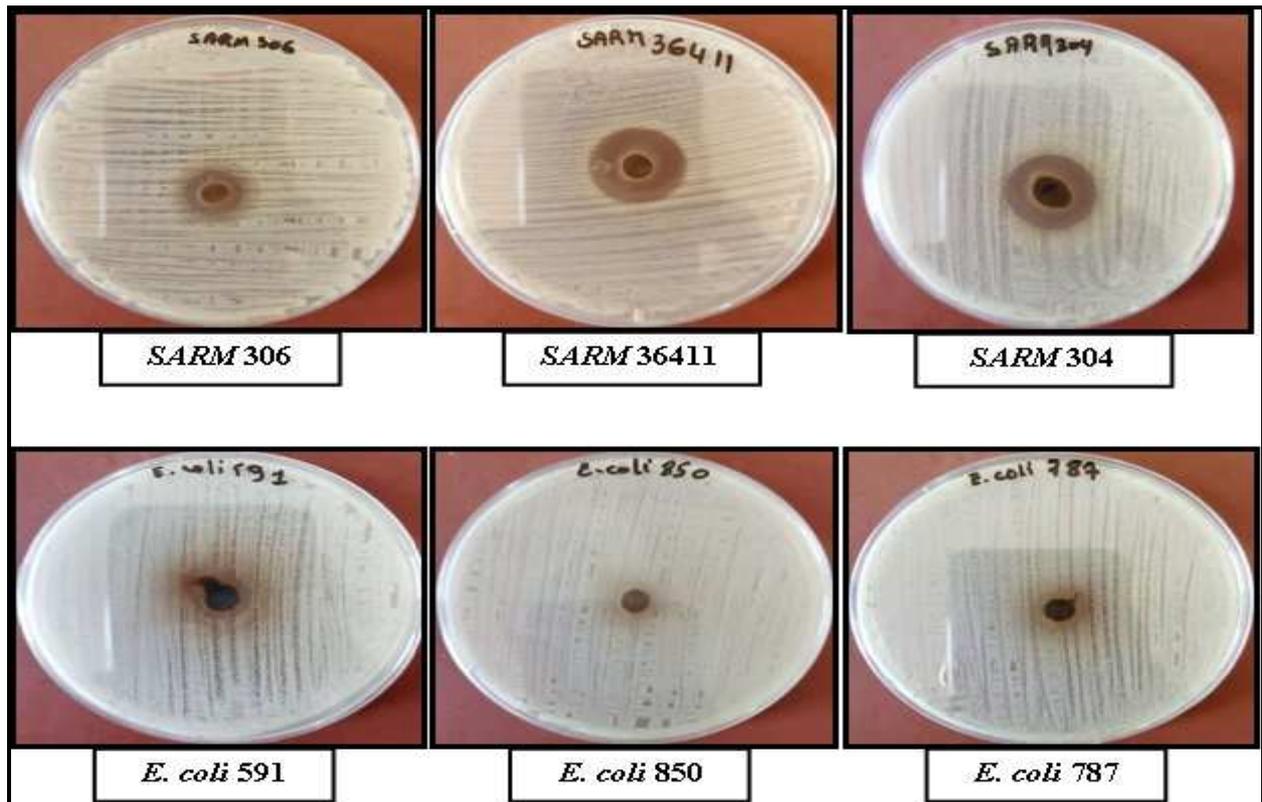


Figure 10 : Diamètre des halos jaune claire en présence d'une concentration de 250 mg/ml de l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus*.

Les tableaux IX et X regroupent les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition de l'extrait optimisé des feuilles de *R. alaternus* à différentes concentrations. Selon l'échelle donnée par (Moreira et al., 2005), les souches de la bactérie *Staphylococcus aureus* (SARM36411 et SARM304) sont extrêmement sensibles (+++), mais la souche (SARM306) est seulement sensible (+) à l'extrait à une concentration élevée de 250 mg/ml. à des concentrations faibles (6.25, 12.5, 25 et 50 mg/ml), les trois souches de la bactéries *Staphylococcus aureus* (SARM36411, SARM306 et SARM304) sont sensibles (+) à la concentration de 50 mg/ml de l'extrait mais ne sont pas sensibles (-) aux autres concentrations ; 6.25, 12.5 et 25 mg/ml.

Les souches de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*591 et *E. coli*787) sont sensibles (+), mais la souche (*E. coli*850) n'est pas sensible (-) à l'extrait à une concentration élevée de 250 mg/ml. À des concentrations faibles (6.25, 12.5, 25 et 50 mg/ml), les trois souches de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*591, *E. coli*850 et *E. coli*8787) ne sont pas sensibles (-) à toutes ces concentrations.

Tableau IX : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Staphylococcus aureus*.

Concentration (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)		
	SARM306	SARM36411	SARM304
6.25	6	7	6
12.5	6	7	6
25	6	6	6
50	10	9	9
250	14	21	22

Tableau X : Diamètre de zones d'inhibition (en mm) obtenu avec *Escherichia coli*.

Concentration (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)		
	<i>E. coli</i> 591	<i>E. coli</i> 850	<i>E. coli</i> 787
6.25	6	6	6
12.5	6	6	6
25	6	6	6
50	6	6	6
250	12	7	10

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + (*S. aureus*) par rapport aux bactéries Gram – (*E coli*) (**Hayouni et al., 2007**).

La résistance des bactéries Gram (–) « *E. coli* » pourrait probablement être attribuée à leurs membranes externes, composées de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable. Par contre, pour les bactéries Gram (+) « *S. aureus* », l'absence de cette barrière permet le contact direct des constituants avec les phospholipides bicouches de la membrane cellulaire, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et le passage des constituants (**Kontiza, Stavri et al. 2008**). Toutefois, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans notre étude avec ceux de la bibliographie. En effet, les différences de compositions des différents extraits, peuvent être attribuées à plusieurs facteurs écologiques, les variations saisonnières, la méthode d'extraction (**Turkmen et al., 2007**), la préparation de l'extrait, la sensibilité des bactéries, et enfin la concentration de l'extrait (**Loziene et al., 2007**).

Conclusion

Conclusion

La présente étude est focalisée sur l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux des feuilles de *Rhamnus alaternus* et l'évaluation du pouvoir antimicrobienne de l'extrait optimisé.

L'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* est réalisée en testant quatre facteurs : temps d'extraction, puissance de micro-onde, polarité et rapport liquide/solide en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse. Le coefficient de corrélation et les p-value ont indiqué que la polarité, le rapport liquide/solide et la puissance ($P \leq 0,05$) sont les facteurs les plus significatifs affectant l'extraction des polyphénols totaux.

Les conditions expérimentales optimales permettant d'optimiser l'extraction des polyphénols totaux de la poudre des feuilles de *R. alaternus* sont : le solvant éthanolique à une polarité de 34,95 % (v/v), une puissance de micro-onde à 53,89 Watt, un rapport solide/liquide de 18,64 ml/g de MS pendant un temps d'extraction de 13,62 s, dans ces conditions, le modèle a prévu une réponse maximale de 7,42 mg EAG/ g MS.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion des disques de l'extrait polyphénolique optimisé sur des souches bactériennes de références *Staphylococcus aureus* (à Gram positif) et *Escherichia coli* (à Gram négatif), a montré que l'extrait optimisé présente une bonne activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus*, alors qu'*Escherichia coli* s'est montré moins sensible à l'extrait optimisé.

En perspectives, Les résultats obtenus ouvrent des horizons pour réaliser la valorisation de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux des feuilles de *R. alaternus*, Il est intéressant de compléter ce travail, en optimisant d'autres paramètres influençant l'extraction tels que : le pH, la granulométrie,...etc, en déterminant les interactions existantes entre tous les facteurs afin de comprendre leur effet sur l'extraction.

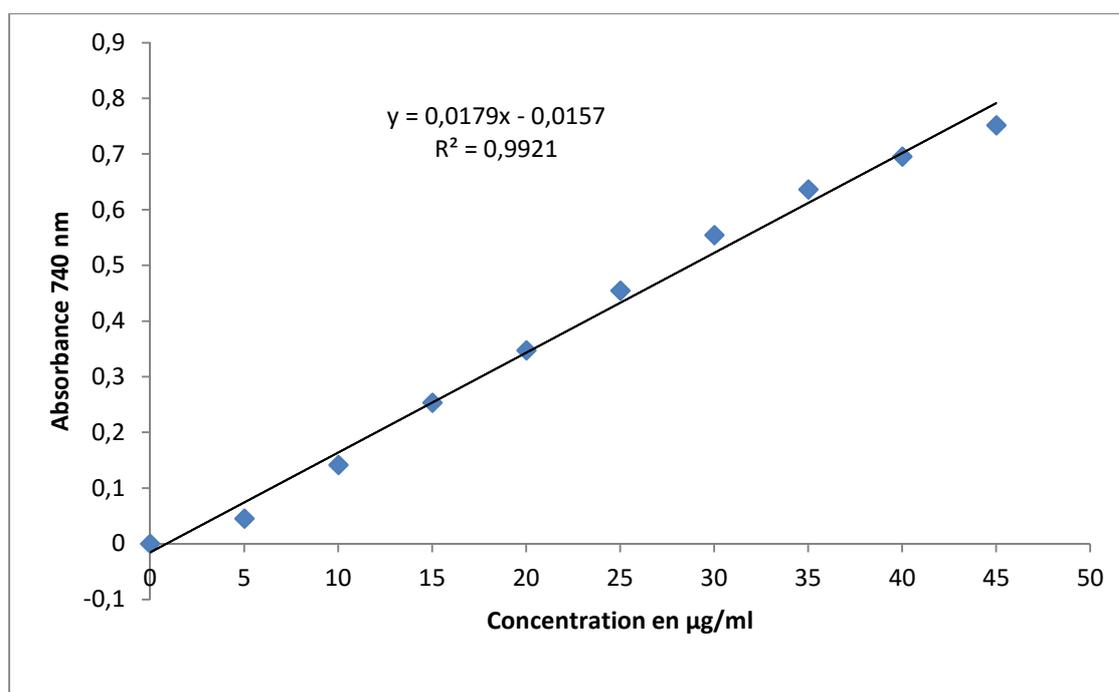
Globalement, les plantes contiennent des molécules très intéressantes, elles ont une grande variété de métabolites secondaires qui possèdent des propriétés médicinales et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques et pharmacologiques. Pour cela, il est intéressant qui d'optimiser leur extraction afin d'obtenir un meilleur rendement.

Annexes

Annexe 01 : Matériel et réactifs utilisés.

Matériel	Réactifs
-Ance de platine	-Acide gallique
-Balance	-Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
-Ballon à fond plat	-Eau distillé
-Bec benzène	-Eau physiologique
-Bécher	-Ethanol absolu ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
-Boîtes de Pétri de 9 cm	-Folin-ciocalteu
-Broyeur électrique	
-Centrifugeuse	
-Cuve	
-Disques (6mm)	
-Entonnoir	
-Eprouvette graduée	
-Etuve	
-Fioles	
-Micro-onde	
-Micropipette	
-Papier absorbant	
-Papier aluminium	
-Papier filtre wattman	
-pince	
-Pipette	
-Réfrigérateur	
-Tamiseur	
-Tubes à essais	
-Tube	
-Vortex	

Annexe 02 : La courbe d'étalonnage utilisé pour le dosage des composés phénoliques totaux.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Abd El-Salam, E. A., & Morsy, N. F. (2019). Optimization of the extraction of polyphenols and antioxidant activity from *Malva parviflora* L. leaves using Box–Behnken design.

Preparative biochemistry & biotechnology 49(9): 876-883.

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F. (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(19): 7592-7599.

Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., ... & Ghedira, K. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry* 116(1): 258-264.

Ammar, R. B., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., ... & Chekir-Ghedira, L. (2008). Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico-Biological Interactions* 174(1): 1-10.

-B-

Bas, J. M., Gómez, C., & Pons, P. (2005). Fruit production and predispersal seed fall and predation in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecologica* 27(2): 115-123.

Bas, J. M., Oliveras, J., & Gómez, C. (2009). Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica* 35(3): 380-384.

Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., ... & Ghedira, K. (2008). Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: combination with the phytochemical composition. *Drug and chemical toxicology* 31(1): 61-80.

Ben Ammar, R., Miyamoto, T., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., & Lacaille-Dubois, M. A. (2019). Isolation and identification of new anthraquinones from *Rhamnus alaternus* L and evaluation of their free radical scavenging activity. *Natural product research* 33(2): 280-286.

Benchiha, W., Mahroug, S., Aoued, L., & Bouterfas, K. (2017). Activité antihépatotoxique des extraits des feuilles de *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae). *Phytothérapie* 15(1): 10-15.

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

Bodo, R., Ahmanache, K., Hausler, R., & Azzouz, A. (2004). Optimized extraction of total proteic mass from water hyacinth dry leaves. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3(6): 529-536.

Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*: 79-82.

Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie* 15(6): 379-383.

Both, S., Chemat, F., & Strube, J. (2014). Extraction of polyphenols from black tea—conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry* 21(3): 1030-1034.

Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences* 28.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81(1): 236-242.

-C-

Cabanillas, A. G., Cáceres, M. R., Cañas, M. M., Burguillos, J. O., & Diaz, T. G. (2007). Square wave adsorptive stripping voltametric determination of the mixture of nalidixic acid and its main metabolite (7-hydroxymethylnalidixic acid) by multivariate methods and artificial neural network. *Talanta* 72(3): 932-940.

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4): 379-389.

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19(4): 229-248.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16(2).

Cuoco, G., Mathe, C., & Vieillescazes, C. (2014). Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. *Microchemical Journal* 115: 130-137.

-E-

Eddouks, M., Ouahidi, M. L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., & Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5(4): 194-203.

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

-F-

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S. (2015). Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of

Rosmarinus officinalis L. by response surface methodology. *J. Mater. Environ. Sci* 6(8): 2346-2357.

Faucher, J. (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., ... & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta* 597(2): 179-186.

-G-

Goupy, J. (2006). *Introduction aux plans d'expériences [Multimédia multisupport]*, Dunod.

Goupy, J. and L. Creighton (2006). *Introduction aux plans d'expériences*. Paris, Dunod.

Gourguillon, L., Destandau, É., Lobstein, A., & Lesellier, E. (2016). Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie* 19(9): 1133-1141.

Gulías, J., Traveset, A., Riera, N., & Mus, M. (2004). Critical stages in the recruitment process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany* 93(6): 723-731.

-H-

Harrar, A. (2018). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.

Hayouni, E.A., Abedrabba, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 14; 249-61.

Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(10): 4107-4112.

-I-

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4): 1821-1835.

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

-J-

Jose, N., Sengupta, S., & Basu, J. K. (2011). Optimization of oxidative desulfurization of thiophene using Cu/titanium silicate-1 by box-behnken design. *Fuel* 90(2): 626-632.

-K-

KAMOUN, A., CHAABOUNI, M. M., & AYEDI, H. F. (2011). Plans d'expériences et traitements de surface-Méthodologie des surfaces de réponses (MSR).

Khajeh, M., & Sanchooli, E. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and iron determination in celery by Box–Behnken design. *Food analytical methods* 3(2): 75-79.

Khusro, A., Barathikannan, K., Aarti, C., & Agastian, P. (2017). Optimization of thermo-alkali stable amylase production and biomass yield from *Bacillus* sp. under submerged cultivation. *Fermentation* 3(1): 7.

Kone, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traore, D., & Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 43-49.

Kontiza, I., Stavri, M., Zloh, M., Vagias, C., Gibbons, S., & Roussis, V. (2008). New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron* 64(8): 1696-1702.

-L-

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

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

Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailienė, A. & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* 103: 546-559p.

-M-

Martendal, E., Budziak, D., & Carasek, E. (2007). Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2, 4, 6-trichloroanisole and 2, 4, 6-tribromoanisole from wine samples. *Journal of chromatography A* 1148(2): 131-136.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews* 1(1): 7-18.

Mezouar, D., Lahfa, F. B., Abdelouahid, D. E., Adida, H., Rahmoun, N. M., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racines de *Berberis vulgaris*. *Phytothérapie* 12(6): 380-385.

Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry* 130(4): 986-993.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology* 38(5): 565-570.

-N-

Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A* 1054(1-2): 95-111.

-P-

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering* 111(1): 73-81.

-Q-

Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

-R-

Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C., Bowman, D., & Chase, M. W. (2000). A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 87(9): 1309-1324.

RSM, M. K. G. B. P., WONG, Y., TAN, Y., TAUFIQ-YAP, Y. H., & Ramli, I. (2015). An optimization study for transesterification of palm oil using response surface methodology (RSM). *Sains Malaysiana* 44(2): 281-290.

-S-

Sen Slimane, K., Sadok, S., Ben Ouada, H., & Gouja, I. (2015). Optimisation de la méthode d'extraction et de stabilisation de la phycocyanine utilisant la méthodologie de surface de réponse. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer* 42:13-16

Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78(3): 793-801.

-T-

Tacherfiout, M., Petrov, P. D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M. L., & Khettal, B. (2018). Antihyperlipidemic effect of a rhamnus alaternus leaf extract in triton-induced hyperlipidemic rats and human hepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101: 501-509.

Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des sciences et technologie* 2(2): 107-114.

Tinsson, W. (2010). La notion de plan d'expérience. *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*, Springer: 3-37.

Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F. & Polat, G. (2007). Effect of Extraction Condition on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.

-U-

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

-V-

Varone, L., & Gratani, L. (2009). Leaf expansion in *Rhamnus alaternus* L. by leaf morphological, anatomical and physiological analysis. *Trees* 23(6): 1255-1262.

Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry* 17(6): 1066-1074.

-W-

Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99(4): 775-783.

-X-

Xu, H., Lu, Y., Zhang, T., Liu, K., Liu, L., He, Z., ... & Wu, X. (2019). Characterization of binding interactions of anthraquinones and bovine β -lactoglobulin. *Food Chemistry* 281: 28-35.

Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science* 72(2): S159-S166.

-Y-

Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie* 9(4): 209-218.

-Z-

Zeouk, I., Balouiri, M., & Bekhti, K. (2019). Antistaphylococcal activity and phytochemical analysis of crude extracts of five medicinal plants used in the center of Morocco against dermatitis. *International journal of microbiology* 2019.

Zeouk, I., & Bekhti, K. (2020). A critical overview of the traditional, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhamnus alaternus*: a Mediterranean shrub. *Advances in Traditional Medicine* 20(1): 1-11.

Zhang, Y. P., Jun Zhang, Y., Jun Gong, W., Ming Wang, S., Yong Xue, H., & Pill Lee, K. (2007). Design of Experiments for Capillary Electrophoretic Enantioresolution of Tamsulosin using Sulfated- β -Cyclodextrin as Chiral Selector. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 30(2): 215-234.

Zolgharnein, J., Shahmoradi, A., & Ghasemi, J. B. (2013). Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics* 27(1-2): 12-20.

Résumé

Le présent travail s'intéresse à l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* par l'utilisation de la méthode de surface de réponse (RSM), et l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait optimisé. Le plan expérimental Box-Behnenken a été utilisé pour étudier des facteurs influençant sur la réponse, à savoir le temps d'extraction, le ratio liquide/solide, la puissance de micro-onde, et la polarité. Les meilleures conditions d'extraction sont : le temps d'extraction de 13,62 s, une puissance de 53,89 Watt, un rapport liquide/solide de 18,64 ml/g de MS, et une polarité l'éthanol de 34,95%. Le modèle a prévu une réponse maximale de 7,42 mg EAG/ g MS. L'activité antibactérienne montre que l'extrait optimisé présente une bonne activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus*. Par rapport à *Escherichia coli*

Mots clés : RSM, Box-behnenken, *Rhamnus alaternus*, polyphénols totaux, activité antimicrobienne.

Abstract

The present work focuses on optimizing the extraction of total polyphenols from *Rhamnus alaternus* leaves by using the surface response method (RSM), and studying the antimicrobial activity of the optimized extract. The Box-Behnenken experimental design was used to study factors influencing the response, namely extraction time, liquid/solid ratio, microwave power, and polarity. The best extraction conditions were: extraction time of 13.62 s, power of 53.89 Watt, liquid/solid ratio of 18.64 ml/g MS, and ethanol polarity of 34.95%. The model predicted a maximum response of 7.42 mg EAG/ g MS. Antibacterial activity shows that the optimized extract exhibits good antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus*. Compared to *Escherichia coli*

Keywords : RSM, Box-behnenken, *Rhamnus alaternus*, total polyphenols, antimicrobial activity

ملخص

يهتم هذا العمل بدراسة الظروف المثلى لاستخلاص البوليفينول الكلي من اوراق *Rhamnus alaternus* باستخدام طريقة سطح الاستجابة (RSM) ودراسة النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص المحسن، تم استخدام نظام بوكس-بانكن لدراسة العوامل التي تؤثر على الاستجابة، وهي زمن الاستخراج (ثا)، ونسبة المواد الصلبة / السائلة (ملغ / مل) وفعالية الموجة الدقيقة (WAT) وقطبية المذيب (% ح/ح)، أفضل الشروط لاستخراج البوليفينول الكلي هي: وقت الاستخراج 13.62 ثانية، وفعالية الموجة الدقيقة 53.89 وات، ونسبة الصلب / السائل 18.64 مجم / مل، وقطبية الإيثانول بنسبة 34.95%. في ظل هذه الظروف، يكون مستوى إجمالي البوليفينول المتوقع من النموذج هو 7.42 ملغ الموافق للكيرسيتين/غ من المادة الجافة.

تم تحقيق الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الأمثل على سلالات بكتيرية مختلفة. أظهرت النتائج أن المستخلص المحسن يظهر نشاطاً جيداً مضاداً للميكروبات ضد *Staphylococcus aureus*. في حين أن *Escherichia coli* ليست حساسة للمستخلص الأمثل.

كلمات مفتاحية : RSM، نموذج بوكس بانكن، *Rhamnus alaternus*، البوليفينول الكلي، الفعالية المضادة للبكتيريا.