

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

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 composés phénoliques de
l'écorce de *Rhamnus alaternus* par la méthode des surfaces de
réponse**

Présenté par :

Benaida Hiba & Bounab Katia

Soutenu le : 02 Juillet 2024

Devant le jury composé de :

Mr GHIDOUCHE A.

MCA

Président

Mr TACHERFIOUT M.

MCA

Encadreur

Mme AIT ALI D.

MCA

Examinatrice

Année universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu tout puissant, de nous avoir accordés la force, le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nous exprimons notre gratitude sincère a notre promoteur *Dr. TACHERFIOUT Mustapha* pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous exprimons nos remerciements à *Mr GHIDOUCHE A*, d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Mme *AIT ALI D*, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également Mr *AIT MERZEG F*. Directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques CRAPC de nous avoir accueilli au sein de son organisme.

Enfin, nous tenons à exprimer vivement nos remerciements et profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribuer de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Hiba et Katia

Dédicace

Je dédie ce mémoire à **Mon père**, qui m'a toujours encouragé à poursuivre mes rêves et à me dépasser. Merci infiniment

A **Ma mère**, qui a été un modèle de force et de détermination pour moi. Merci pour ton amour inconditionnel et ta patience infinie.

À **Ma famille**, pour votre soutien constant et votre présence réconfortante tout au long de mes études. Merci pour votre soutien inestimable et vos encouragements.

À **Mes amis**, pour votre soutien indéfectible et votre présence joyeuse dans ma vie. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien inestimable.

Ce mémoire est dédié à toutes les personnes qui ont été présentes pour moi, m'ont aidé et encouragé tout au long de ce parcours. Merci du fond du cœur pour votre soutien précieux

Hiba



Dédicace

Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu le tout puissant de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mes parents, Mes chères sœurs et frère, qui m'ont encouragés et aidés à arriver à ce stade de ma formation. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A tous ceux qui m'ont soutenue et aidé durant mon parcours d'étude.

Katia

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1- Généralités sur *Rhamnus alaternus*2

I-1-1- Nomenclature2

I-1-2- Classification2

I-1-3- Description botanique et répartition géographique3

I-1-4- Usage traditionnelle3

I-1-5- Composition phytochimique3

I-1-6- Activités biologiques4

I-1-6-1- Activité anti-oxydante4

I-1-6-2- Activité anti-hyperlipidémique4

I-1-6-3- Activité anti-cancéreuse4

I-1-6-4-Activité antimicrobienne4

I-2- Généralités sur les composés phénoliques5

I-3- Méthodes d'extractions des composés phénoliques7

I-3-1- Extraction par macération7

I-3-2- Extraction assisté par ultrasons7

I-3-3-Autres méthodes d'extraction8

I-4- Généralités sur les plans d'expériences9

I-4-1- Terminologie9

I-4-2-Plan de surface de réponse10

I-4-3-Le plan de Box-Behnken	11
I-4-4- Le modèle mathématique a priori	11

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal	13
II-2- Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques	14
II-2-1- Tests préliminaires	14
II-2-1-1-Choix du solvant d'extraction	14
II-2-1-2-Choix de polarité du solvant d'extraction	15
II-2-1-3- Choix de la température d'extraction	15
II-2-1-4-Choix du temps d'extraction	15
II-2-2- Application du plan de Box-Behnken	15
II-3- Dosage des composés phénoliques	17
II-4- Analyse statistique	17

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Essais préliminaires	18
III-1-1- Choix du solvant	18
III-1-2-Choix de polarité	19
III-1-3- Choix de température	21
III-1-4- Choix du temps	22
III-2- Le plan d'expérience Box-Behnken	23
III-2-1- Analyse des résultats	23
III-2-2- Validation du modèle	24
III-2-2-1- Coefficient de corrélation	25
III-2-2-2- Estimation des coefficients	25
III-2-2-3- Effet linéaire	26

III-2-2-4- Effet d'interaction	27
III-2-2-5- Effet quadratique	28
III-2-2-6- Modèle mathématique	28
III-2-2-7- Solution du modèle	28

Conclusion	30
-------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

R. alaternus : *Rhamnus alaternus*

BBD : Box-Behnken Design

RSM : *Response Surface Methodology*

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium

CPT : Composés Phénoliques Totaux

PT : Polyphénols Totaux

EQ : Equivalent Quercétine

EAG : Equivalent Acide Gallique

mg EAG/g MS : Milligramme équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche

mg EQ/g MS : Milligramme équivalent en quercétine par gramme de la matière sèche

rpm : Rotation par minutes

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

JMP 17 : John's Macintosh Project 17

Listes des figures

N°	Titre	Page
1	La Plante <i>Rhamnus alaternus</i> de la région « Ait-Smail ».	2
2	Les principales sous classes de flavonoïdes.	7
3	Les niveaux d'un domaine du facteur.	10
4	Plan de Box-Behnken pour trois facteurs.	11
5	Matériel végétal utilisé.	13
6	Effet de la nature du solvant sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>R. alaternus</i> .	18
7	Effet de la polarité du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>R. alaternus</i> .	20
8	Effet de la température sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>R. alaternus</i> .	21
9	Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>R. alaternus</i> .	22
10	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.	25
11	Graphiques des surfaces de réponses représentant les interactions de trois facteurs.	27

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Principales classes des composés phénoliques.	6
II	Les avantages et les inconvénients de quelques méthodes d'extraction	8
III	Niveaux des variables choisis pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux par macération.	16
IV	Matrice d'expérience donnée par le plan Box-Behnken appliquée à l'extraction des polyphénols totaux.	16
V	Plan expérimental de Box-Behnken et valeurs expérimentales et prédites pour le contenu phénolique total des extraits de l'écorce de <i>R. alaternus</i> .	24
VI	Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré des extraits des écorces de <i>R. alaternus</i> .	26
VII	Les conditions optimales d'extraction des CPT à partir de la poudre des écorces des tiges de <i>R. alaternus</i> .	28

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales soulignent la puissance de la nature pour nourrir et soigner l'espèce humaine depuis l'antiquité. Ces remèdes naturels ont joué un rôle central dans les anciennes formes de médecine traditionnelle en raison de leurs contenus en substances bioactives (**Sarker & Nahar, 2012**).

Rhamnus alaternus est une espèce végétale appartenant à la famille des Rhamnaceae. Elle est largement utilisée dans le bassin méditerranéen, notamment en Algérie, pour ses effets thérapeutiques contre les anomalies hépatiques et les problèmes dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2019 ; Bhourri et al., 2012 ; Zeouk et al., 2019**). De plus, ces effets sont dus à l'existence des substances bioactives dites métabolites secondaires. Ces derniers regroupent les composés phénoliques, une classe qui est largement répandue dans le règne végétal. Ces composés comprennent ainsi différentes classes avec une dissemblance au niveau des formes et des structures (**Tsao, 2010**).

Lors d'une étude phytochimique il est essentiel, de passer par une étape d'extraction qui assure la séparation des produits naturels de la matière végétale. Ce processus peut être affecté par plusieurs facteurs (**Zhang et al., 2018**). Dernièrement, des nouvelles méthodes ont été développées pour améliorer l'extraction des métabolites secondaires végétale. Parmi ces méthodes, on distingue la méthode de surface de réponse (RSM) qui est une collection de techniques statistiques et mathématiques utilisée pour développer, améliorer et optimiser des processus dans lesquels une réponse d'intérêt est influencée par plusieurs facteurs (**Radojković et al., 2012**).

Dans ce travail on cherche à déterminer est-ce que les quatre facteurs étudiés peuvent avoir un impact significatif sur l'efficacité d'extraction ? Pour cela l'étude vise à évaluer l'effet de ces facteurs sur le processus d'extraction des composés phénoliques d'écorce de *Rhamnus alaternus*, et d'optimiser les conditions d'extraction par la méthode des surfaces de réponse (RSM).

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique sur la plante, les composés phénoliques, les méthodes d'extraction ainsi que la méthode des surfaces de réponse. Le deuxième chapitre détaille la méthode suivie dans cette étude pour optimiser l'extraction des polyphénols totaux des écorces de *R. alaternus*. Enfin, la dernière partie expose et discute les résultats obtenus.

*Chapitre I : Synthèse
Bibliographique*

I-1- Généralités sur *Rhamnus alaternus*

Rhamnus alaternus, est une espèce végétale appartenant à la Famille des Rhamnacées. Celle-ci est d'une hauteur comprise entre 1-5 mètres (**Figure 1**). Elle est adaptée à l'environnement méditerranéen caractérisé par des températures élevées, un rayonnement solaire intense et des conditions de froid occasionnelles (**Ben Ammar et al., 2019 ; Canale et al., 2016**). Cette espèce est réputée pour son usage dans le domaine de la médecine traditionnelle et de la pharmacologie (**Zeouk & Bekhti, 2020**).



Figure 1 : La Plante *Rhamnus alaternus* de la région « Ait-smail » (**originale**).

I-1-1- Nomenclature

R. alaternus comprend différentes désignations selon la localité où elle se trouve. En berbère, elle est connue sous l'appellation de « Imlilisse » (**Nekkaa et al., 2021**). En arabe, elle est appelée Oud El-khir (**Ammar et al., 2009**), Buckthorns en anglais (**Canale et al., 2016**) et Alaterne en français (**Penzing, 1902**).

I-1-2- Classification

La classification botanique de *R. alaternus* est la suivante (**Nigussie et al., 2021**).

- ✓ Règne : Plantae
- ✓ Ordre : Rosales
- ✓ Famille : Rhamnacées.
- ✓ Genre : *Rhamnus*.
- ✓ Espèce : *Rhamnus alaternus L.*

I-1-3- Description botanique et répartition géographique

R. alaternus est un arbuste dioïque vivace qui peut atteindre une hauteur allant de 1-5 mètres, il fleurit tardivement en hiver, avec un pic de floraison au milieu de février (**El Aou-Ouad et al., 2015 ; Gulias et al., 2004**). Les fruits de cet arbuste sont rouges et deviennent noirs à leur maturation. Ils contiennent globalement entre 2 à 3 graines et sont recouverts d'une enveloppe dite endoscope qui s'ouvre lorsque les fruits sont secs. Ces graines pèsent en moyenne 9.1 mg et germent en 2 à 3 semaines dans un intervalle de température allant de 7.5 à 24 C° (**Bas et al., 2009 ; Mahmoodi et al., 2022**). Les feuilles de *R. alaternus* ont une marge dentelée et mesurent entre 3 à 15 cm de long et sont regroupées par paires alternées (**Mahmoodi et al., 2022**).

R. alaternus est une plante qui se trouve partout dans le bassin méditerranéen, que ce soit en Algérie, Maroc et Tunisie (**Ben Ammar et al., 2008**), mais également en Espagne et en Italie (**Gulias et al., 2004**).

I-1-4- Usage traditionnelle

R. alaternus est largement connue comme un remède traditionnel pour une grande variété de maladies. Les différentes parties de cette plante sont réputées pour leurs propriétés médicinales, par exemple, la partie aérienne et les feuilles sont utilisées comme antihypertenseur ainsi que le traitement des troubles gastro-intestinaux (**Zeouk & Bekhti, 2020**). En Algérie, cet arbuste est essentiellement utilisé comme un traitement contre la jaunisse et les maladies hépatiques (**Ballero et al., 2001 ; Nigussie et al., 2021 ; Zeouk & Bekhti, 2020**). En outre, *R. alaternus* est réputée pour d'autres usages comme le traitement des complications dermatologique (**Zeouk et al., 2019**).

I-1-5- Composition phytochimique

L'exploitation de *R. alaternus* dans la thérapie traditionnelle se fait grâce à sa richesse en composants bioactifs (**Moussi et al., 2015**). Les études phytochimiques menées sur l'ensemble des parties de *R. alaternus* ont permis de mettre en évidence plusieurs substances, notamment les flavonoïdes, qui représentent la classe la plus abondante (**Ammar et al., 2009 ; Bhourri et al., 2012**), les tanins, les anthocyanes, les flavonols (**Spigno et al., 2007**), ainsi que les polyphénols (**Ben Ammar et al., 2007**).

I-1-6- Activités biologiques

I-1-6-1- Activité anti-oxydante

Une étude menée par **Moussi et al., (2015)**, a démontré que les flavonoïdes et les polyphénols extraient des feuilles de *R. alaternus* avaient une activité antioxydant significative en raison de leurs capacités à piéger les substances radicalaires libres. De plus **Bhourri et al., (2012)** ont montrés dans leur étude réalisée sur deux composés isolés des feuilles de *R. alaternus* à savoir le kaempférol 3-O- β -isorhamninoside et le rhamnocitrine 3-O- β -isorhamninoside qu'ils présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de l'anion superoxyde. En outre, l'étude de **Boussahel et al., (2015)** a montré que les extraits de *R. alaternus* possèdent une bonne activité anti-oxydante grâce à leur capacité de réduction du DPPH.

I-1-6-2- Activité anti-hyperlipidémique

La principale action de l'activité anti hyperlipidémique est de réduire le niveau de lipides dans le sang, qui est considéré comme un facteur de progression pour diverses maladies. **Tacherfiout et al., (2018)** ont démontrés in vivo que les composés phénoliques extraient des feuilles de *R. alaternus* présentent une activité anti-hyperlipidémie.

I-1-6-3- Activité anti-cancéreuse

Des études ont été menées pour évaluer la capacité des composants naturels de *R. alaternus* à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Les extraits méthanoliques provenant des racines de *R. alaternus* ont démontrés un effet anti-prolifération vis-à-vis des lignées cellulaires de leucémie murine myéloïde chronique humaine (K562 et L1210). De plus les feuilles de cet arbuste possèdent la même propriété (**Ben Ammar et al., 2008 ; Nekkaa et al., 2021**).

I-1-6-4-Activité antimicrobienne

Des études ont démontré que les parties aériennes et les écorces de *R. alaternus* possèdent des activités antimicrobiennes efficaces contre les souches de bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*), ainsi que contre des souches de gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*) (**Ammar et al., 2009 ; Kosalec et al., 2013**).

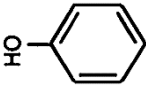
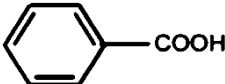
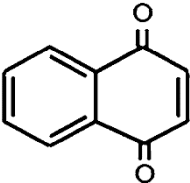
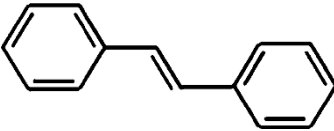
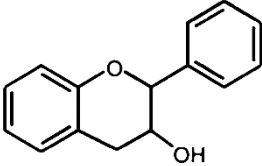
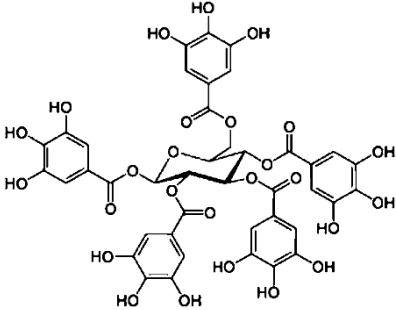
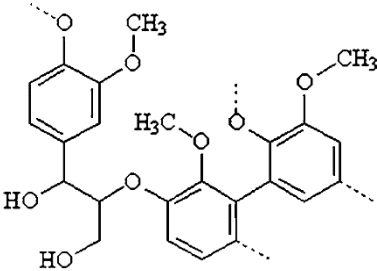
I-2- Généralités sur les composés phénoliques

Les plantes médicinales sont considérées comme une source cruciale de métabolites secondaires (**Chaouche et al., 2020**). Ces composants sont utilisés par l'Homme en raison de leurs effets bénéfiques pour la santé et leurs différentes activités pharmacologiques. De plus, les plantes utilisent également ces composés pour leurs propres besoins, tels que la protection contre les rayons ultraviolets, les invasions microbiennes et herbivores. D'autre part, les plantes produisent également ces substances pour attirer les pollinisateurs et pour assurer leurs fonctions structurales (**Pandey & Rizvi, 2009 ; Sharma et al., 2019 ; Tsao, 2010**).

Les composés phénoliques, sont les métabolites secondaires les plus abondants et les plus connus dans le règne végétal. Ils regroupent plus de 8000 structures différentes (**Pandey & Rizvi, 2009 ; Santos-Buelga et al., 2012**). Leurs formations se font par deux voies : la voie shikimique qui est un processus en sept étapes qui conduit à la formation des acides aromatiques qui servent comme précurseurs pour différentes classes de composés phénoliques tels que les acides cinnamiques et les esters. La voie acétate passe par la formation de l'acide salicylique à partir de l'acétyl-CoA et du shikimate, suivi de l'estérification de l'acide salicylique pour former de l'acide salicylique acétate (**Santos-Buelga et al., 2012 ; Santos-Sánchez et al., 2019**). Ils existent dans la nature sous une forme dite « composé », ce qui signifie qu'un ou plusieurs résidu (s) de sucre(s), qu'il soit monomère, dimère ou oligomère, est associé à un groupe hydroxyle ou même à un carbone aromatique (**Cutrim & Cortez, 2018**). Plusieurs classes sont distinguées dans cette famille (**Tableaux I**) et sont classés selon le nombre d'anneaux phénoliques qu'ils possèdent et les connexions structurales entre ces anneaux (**Pandey & Rizvi, 2009**).

La classe la plus étudiée des composés phénoliques est celle des flavonoïdes, qui ont une structure de C6-C3-C6. Les flavonoïdes sont composés de deux cycles benzoïques, soit mono, di ou trihydroxylés, liés habituellement par un hétérocycle oxygéné, généralement une pyrone (cycle C) (**Cutrim & Cortez, 2018 ; Pandey & Rizvi, 2009**). On recense plus de 4000 variétés dérivant de cette classe appartenant à 06 sous-classes qui diffèrent en termes de nombres et de types de cycle C : les flavonoles (**Figure 2/A**), les flavanones (**Figure 2/B**), les flavanols (**Figure 2/C**), les flavones (**Figure 2/D**), les anthocyanes (**Figure 2/E**), et les isoflavonoïdes (**Figure 2/F**) (**Pandey & Rizvi, 2009**).

Tableau I: Principales classes des composés phénoliques (Santos-Buelga *et al.*, 2012).

Classe	Squelette carboné	Structure de base
Phénols simple	C ₆	
Acides Hydroxycinnamique	C ₆ -C ₃	
Naphtoquinones	C ₆ -C ₄	
Stilbénes	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoïdes	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Tanins	(C ₁₅) _n	
Lignines	(C ₆ -C ₃) _n	

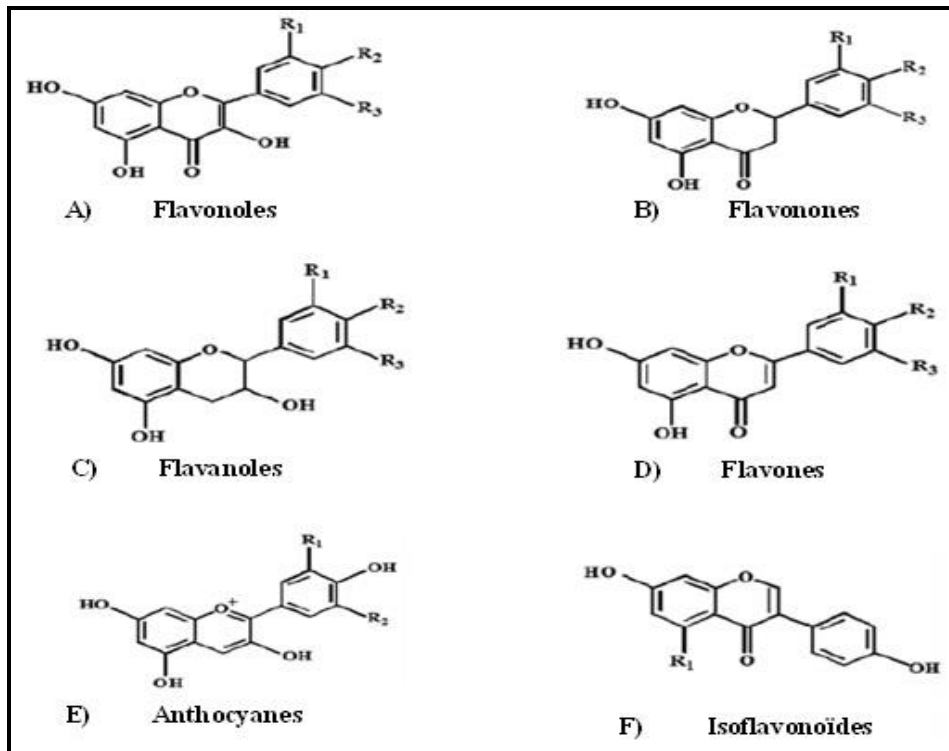


Figure 2 : Les principales sous classes des flavonoïdes (Pandey & Rizvi, 2009).

I-3- Méthodes d'extractions

I-3-1- Extraction par macération

La macération est considérée comme l'une des méthodes les plus simples et largement appliquées dans les études consacrées à l'extraction des composants biologiques à partir des plantes médicinales (Nekkaa *et al.*, 2021). Cette méthode consiste à tremper la matière végétale, sous sa forme originale ou en poudre, dans un solvant bien déterminé et choisi selon le type de substance à extraire. Le mélange reste sous agitation à une température ambiante pendant une longue durée, une fois cette durée est écoulée, le mélange passe par une filtration ou peut être pressé (Azwanida, 2015).

I-3-2- Extraction assisté par ultrasons

La méthode d'extraction assistée par ultrasons est une méthode abordable et économique pour l'extraction phytochimique et peut être utilisée à petite échelle et grande échelle (Azwanida, 2015). Le principe de cette méthode consiste à générer des ondes ultrasoniques d'une fréquence allant de 20 Hz à 200 Hz lors du processus d'extraction. Ces ondes augmentent la surface de contact entre le solvant et l'échantillon, ce qui améliore la perméabilité des parois de l'échantillon (Azwanida, 2015 ; Zhang *et al.*, 2018).

I-3-3- Autres méthodes d'extraction

Le processus d'extraction ne se limite pas seulement aux deux méthodes citées précédemment, mais il existe plusieurs autres méthodes. Les plus connues sont : la décoction, l'extraction au soxhlet, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par liquide sous pression. Le **Tableau II** présente quelques avantages et inconvénients concernant les méthodes d'extraction. (Azwanida, 2015 ; Zhang *et al.*, 2018).

Tableau II : Les avantages et les inconvénients de quelques méthodes d'extraction

Méthode	Avantages	Inconvénient
Macération	-Une méthode très simple à appliquer	-Un temps d'extraction long -Une faible efficacité d'extraction
Extraction assisté par ultrasons	-Réduit la consommation de solvant et de l'énergie électrique - l'extraction peut être réalisée à des températures réduites et dans une courte durée	-Formation des radicaux libres à des ondes ultrason supérieure à 20 KHz
Décoction	-Améliore la dissolution de quelques composés bioactifs	-Ne peut pas être utilisée pour l'extraction des substances thermolabiles
Extraction au soxhlet	-Utilisation des petites quantités de solvant	-Exposition à des solvants inflammables et de haut pureté qui pourrait augmenter le cout
Extraction par fluide supercritique	-Utilisée à des faibles températures -Une méthode non toxique	-Un cout d'équipement très élevé

Extraction assistée par micro-ondes	-Augmentation de rendement d'extrait -Réduction d'usage des solvants organiques	-Une méthode limitée aux composés phénoliques à petites molécules tels que les acides phénoliques
Extraction par liquide sous pression	-Réduit le temps d'extraction et la consommation de solvant -Une meilleure répétabilité par rapport aux d'autres méthodes	-Une méthode qui ne pourrait pas être utilisée pour l'extraction des composés thermolabile en raison d'utilisation des températures élevée

I-4- Généralités sur les plans d'expériences

Les plans d'expériences sont des méthodes statistiques introduites pour la première fois par le statisticien Ronald Fisher aux alentours 1920 (**Tinsson, 2010**). Ces outils visent à faciliter l'interprétation des résultats en réduisant le nombre d'essais expérimentaux tout en maintenant une précision optimale. Ils permettent à l'expérimentateur de mesurer et optimiser l'impact des différents facteurs sur une réponse (**Fadil et al., 2015**). Ces plans sont utilisés dans de nombreux domaines tels que l'industrie, la recherche scientifique, l'agriculture (**Tinsson, 2010**).

I-4-1- Terminologie

➤ La Réponse

Correspond à une grandeur d'intérêt à laquelle s'intéresse l'expérimentateur lors de chaque essai (**Fadil et al., 2015 ; Goupy, 2006**).

➤ Le Facteur

Un facteur signifie toute variable obligatoirement contrôlable qui peut influencer sur la réponse, celui-ci peut être quantitatif ou qualitatif (**Tinsson, 2010**).

➤ Le Niveaux d'un domaine du facteur

Chaque facteur dans ce contexte est limité par deux variables : la variable inférieure, notée -1, et la variable supérieure, notée +1 (**Figure 3**).

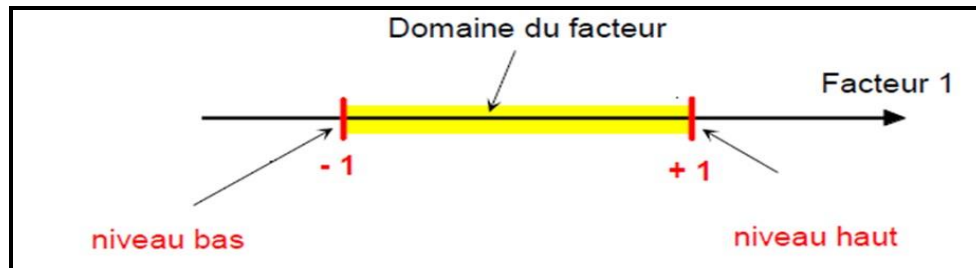


Figure 3 : Les niveaux d'un domaine du facteur (Goupy, 2006).

➤ Le Domaine expérimental

Ensemble des facteurs quantitatifs utilisés pour analyser d'une manière précise un phénomène complexe. Chaque facteur, est généralement définie dans un intervalle $[a_i, b_i]$, où a_i et b_i représentent respectivement les valeurs minimales et maximales possibles. En pratique, cet intervalle correspond simplement à la plage de variation autorisée pour chaque facteur (Tinsson, 2010).

➤ Le Domaine d'étude

Le domaine d'étude désigne la zone de l'espace expérimentale choisie par l'expérimentateur pour mener ses essais, en tenant compte du fait que l'étude comporte plusieurs zones bien définies réparties dans ce domaine d'étude (Goupy, 2006).

I-4-2- Plan de surface de réponse

La surface de réponse est une méthode utilisée dans les plans d'expériences pour optimiser les processus. Elle consiste en une modélisation empirique qui évalue la relation entre plusieurs facteurs expérimentaux contrôlés et les résultats observés (Fadil *et al.*, 2015).

I-4-3- Le plan de Box-Behnken

Le plan de Box-Behnken est conçu pour répondre à un critère spécifique d'optimisation : l'erreur de prévision des réponses est constante pour tous les points d'une sphère (ou une hyper-sphère) centrée à l'origine du domaine expérimental, selon le critère d'isovariance par rotation. Le plan de Box-Behnken le plus connu est celui permettant d'étudier trois facteurs (**Figure 4**) (**Goupy, 2006**).

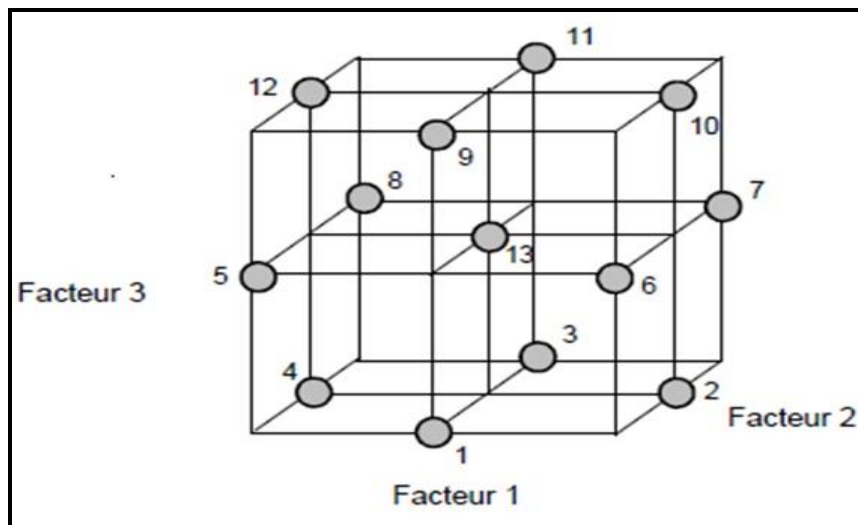


Figure 4 : Plan de Box-Behnken pour trois facteurs (**Goupy, 2006**)

I-4-4- Le modèle mathématique a priori

On opte a priori pour une fonction mathématique liant la réponse aux facteurs, en effectuant un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. On suppose que les dérivées sont constantes et que le développement se présente sous la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt.

x_i : correspond au niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai .

a_0 , a_i , a_{ij} , a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'avantage de modéliser la réponse avec un polynôme est qu'il permet de calculer toutes les réponses du domaine d'étude sans avoir besoin de réaliser des expériences. Ce modèle est également connu sous le nom de "*modèle postulé*" ou "*modèle a priori*" (Goupy, 2006).

Chapitre II :
Matériel et méthodes

II-1- Matériel végétal

Le travail réalisé porte sur l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir des écorces des tiges de *Rhamnus alaternus*, récoltée au début du mois de février 2024, dans le village « Amdoun n tkouthar », commune Ait Smail, wilaya de Bejaia où elle se développe d'une manière spontanée. Après la récolte, les écorces sont soigneusement débarrassées de leurs feuilles et leurs pédoncules puis nettoyées et lavées afin d'éliminer toutes impuretés. Ensuite, elles ont été placées dans une étuve à une température de 40°C jusqu'à séchage complet. Une fois le séchage est fait, ces écorces ont été réduites à l'aide d'un broyeur électrique en poudre très fine. Cette dernière est tamisée en utilisant un tamis de diamètre de 250 μm pour avoir un échantillon homogène. Celui-ci a été conservée dans un bocal en verre à l'abri de la lumière afin de préserver tous les composants de la poudre.

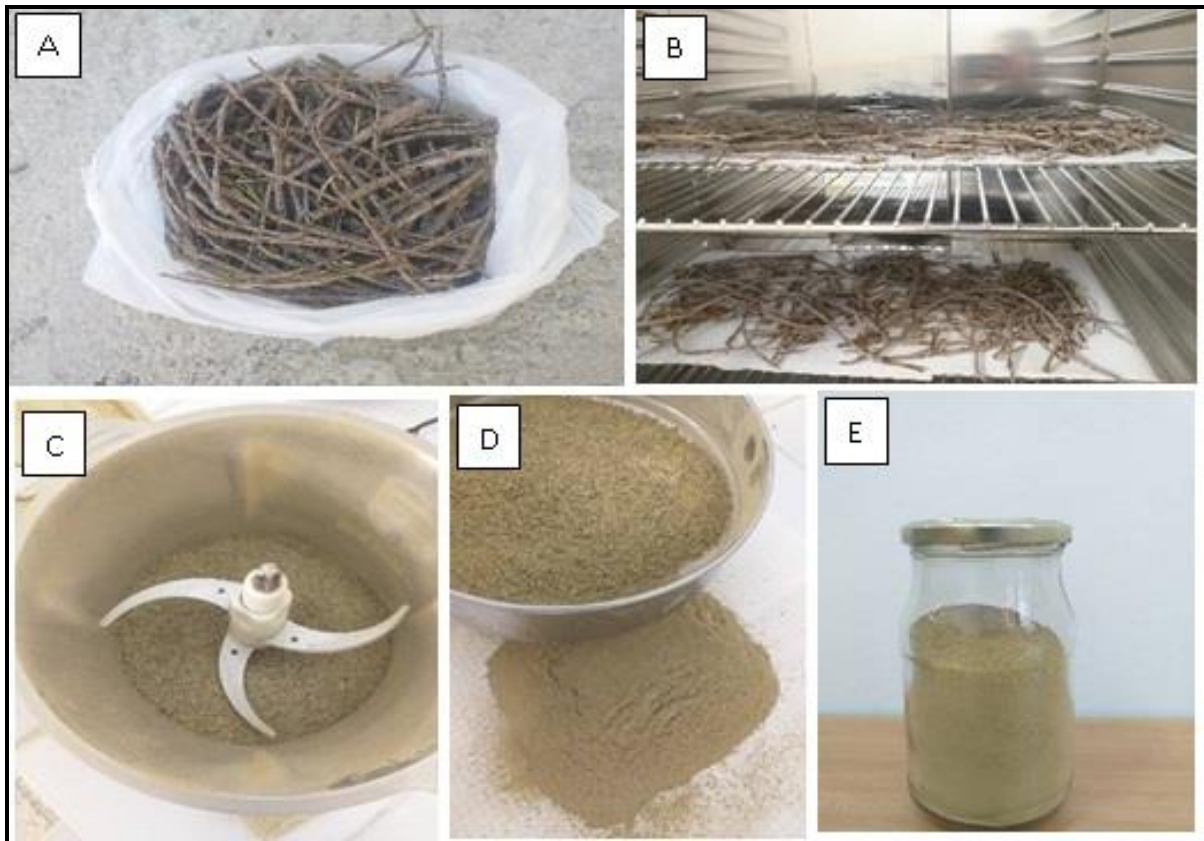


Figure 5 : Matériel végétal utilisé dans la présente étude. (A) : Récolte des tiges et séparation des écorces. (B) : Séchage des écorces. (C) : Broyage des écorces. (D) Tamisage de la poudre. (E) : Conservation de la poudre végétale.

II-2- Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques

L'extraction est la première étape permettant de séparer les composants naturels désirés des matières premières. Parmi les différentes méthodes d'extraction, l'extraction par macération avec les solvants est la plus couramment utilisée. Cette méthode implique plusieurs étapes, où le solvant pénètre dans le soluté, le soluté se dissout dans le solvant puis est extrait de la matière végétale. La facilitation de la diffusion et de la solubilité du soluté à travers ces étapes dépend entre autres de divers facteurs tels que les propriétés du solvant, la granulométrie, les matières premières et le ratio utilisé (**Zhang et al., 2018**).

En utilisant le plan de Box-Behnken, l'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques de la poudre des écorces de *R. alaternus* a été effectuée grâce à la technique d'extraction par macération, en mélangeant 0,25 g de matière sèche avec 10 ml de solvant, tout en impliquant des paramètres qui pourraient influencer l'efficacité de l'extraction tel que : la polarité du solvant, la température et le temps d'extraction. Tandis que le type du solvant reste constant.

II-2-1- Tests préliminaires

Avant de procéder à l'optimisation, une étude préliminaire a été effectuée afin de pouvoir sélectionner les meilleurs facteurs qui permettent d'extraire le maximum de composés phénoliques.

II-2-1-1-Choix du solvant d'extraction

Dans le processus d'extraction des composés phénoliques par solvant, l'éthanol, méthanol, et l'acétone sont distingués comme des solvants organiques fréquemment utilisés, ainsi que des mélanges de ces solvants avec de l'eau (**Santos-Buelga et al., 2012**).

Dans cette étude, les extraits ont été préparés en mélangeant 0,25 g de la poudre des écorces de *R. alaternus* avec 10 ml de solvant, à savoir : le méthanol (50%), l'éthanol (50%), l'acétone (50%) et l'eau distillé. L'extraction a été réalisée dans un bain-marie agitateur réglé à une température de 25°C durant 90 min. Les extraits ont été récupérés et centrifugés à 4000 rpm pendant 10 minutes pour séparer le surnageant (extrait) et le culot, le volume du surnageant a été mesuré. La teneur des polyphénols totaux des extraits a été ensuite évaluée à l'aide de la méthode du Folin-Ciocalteu. Une courbe standard préparée avec de l'acide gallique a été réalisée dans les mêmes conditions (**Annexe 02**) et les teneurs en polyphénols totaux ont

été exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (Bourgou *et al.*, 2016).

II-2-1-2-Choix de polarité du solvant d'extraction

Après avoir sélectionné le solvant qui a donné la teneur la plus élevée en polyphénols totaux. Une deuxième extraction a été réalisée pour choisir la polarité du solvant d'extraction. L'extraction a été réalisé en mélangeant 0,25 g de la poudre végétale avec 10 ml d'acétone à différentes polarités : 25%, 50%, 75% et 100%, en fixant le temps et la température à 90 min et 25°C respectivement. Les extraits ont été récupérés et centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min et la teneur des polyphénols totaux a été déterminée par la méthode du Folin-Ciocalteu comme cité précédemment et exprimés en mg EAG/g MS.

II-2-1-3- Choix de la température d'extraction

Quatre extractions ont été effectuées à des températures différentes : 25°C, 35°C, 45°C, 55°C. L'extraction a été réalisée pendant 90min d'agitation. Les extraits ont été récupérés, centrifugés, ensuite les polyphénols totaux ont été déterminés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) en se référant à la courbe standard.

II-2-1-4-Choix du temps d'extraction

Une nouvelle extraction a été réalisée en fixant les trois précédents paramètres et en faisant varier le temps d'extraction (60 min, 120 min, 180 min, 240 min) pour déterminer le meilleur temps. Après chaque durée, les extraits ont été récupérés et centrifugés à 4000 rpm pendant 10 minutes. Un dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode du Folin-Ciocalteu et exprimé en mg EAG/g de matière sèche.

II-2-2- Application du plan de Box-Behnken

La conception expérimentale de cette étude a été divisée en deux grandes parties. Tout d'abord, une partie des essais préliminaires qui a été conduite pour identifier l'influence individuelle des facteurs qui influencent l'extraction des composés phénoliques des écorces de *R. alaternus*, à savoir, le type de solvant, sa polarité, la température d'extraction ainsi que le temps d'extraction. Cette partie a été réalisée en variant un seul paramètre à la fois tout en gardant les autres constants (Chan *et al.*, 2009).

La seconde étape implique l'utilisation d'un plan d'expérience de Box-Behnken comprenant 15 expériences et trois points centraux. Cette étape vise à étudier la réponse d'intérêt Y (taux des polyphénols totaux) en fonction des variables sélectionnées (X1, X2 et X3) lors des tests préliminaires. Chaque facteur comporte trois niveaux : bas, centré et haut (-1, 0, +1) (Tableau III et IV).

Tableau III: Niveaux des variables choisis pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux par macération

Paramètres	Niveau bas (-1)	Niveau centré (0)	Niveau haut (+1)
X1 : Polarité (%)	25	50	75
X2 : Température (°C)	35	45	55
X3 : Temps (min)	120	180	240

Tableau IV : Matrice d'expérience donnée par le plan Box-Behnken appliquée à l'extraction des polyphénols totaux.

N° d'essai	Configuration	Polarité (%)	Température (°C)	Temps (min)
1	0—	50	35	120
2	+—0	75	35	180
3	0+—	50	55	120
4	—+0	25	55	180
5	0—+	50	35	240
6	0++	50	55	240
7	++0	75	55	180
8	000	50	45	180
9	+0—	75	45	120
10	—0—	25	45	120
11	—0+	25	45	240
12	000	50	45	180
13	——0	25	35	180
14	+0+	75	45	240
15	000	50	45	180

II-3- Dosage des composés phénoliques

Le dosage des teneurs en polyphénols totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est utilisé pour obtenir une estimation brute de la quantité des composés phénoliques totaux présents dans un extrait. 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 réduits 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 & Charpentier., 2006).

125 µl de l'extrait a été mélangée avec 625 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1 N dans l'eau distillé). Après agitation et incubation pendant 5 minutes, 500 µl d'une solution de carbonate de sodium à 6% ont été ajoutées. Le mélange a été incubé pendant 60 minutes à l'obscurité. L'absorbance est ensuite mesurée à 740 nm. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée à partir d'une gamme d'étalons préparée avec de l'acide gallique à différentes concentrations (0-25 µg/ml) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (Bourgou *et al.*, 2016).

II-4- Analyse statistique

L'étude a été réalisée en effectuant chaque test trois fois et en exprimant les résultats en moyenne \pm l'écart-type. Les essais préliminaires ont été analysés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6 et l'analyse statistique a été effectuée avec *One Way* ANOVA suivi du test post-hoc de Tukey's. Les résultats du plan Box-Behnken ont été analysés avec le logiciel JMP 17 pro. Le niveau de significativité des données est déterminé par la probabilité ($P \leq 0.05$).

Chapitre III :
Résultats et discussion

Dans cette étude, le modèle de Box-Behnken a été choisi pour optimiser les conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir des écorces de *R. alaternus*. Trois facteurs ont été pris en compte : la polarité du solvant (%), la température d'extraction (°C) et le temps d'extraction (min).

III-1- Essais préliminaires

III-1-1- Choix du solvant

Le choix du solvant est considéré comme une étape cruciale lors d'une extraction, Pour extraire les métabolites secondaires, les solvants généralement utilisés sont soit de l'eau, soit des solvants organiques ou des mélanges d'eau et de solvant organique (Tsao, 2010). Dans la présente étude, quatre solvants ont été utilisés pour extraire les polyphénols totaux des écorces de *R. alaternus*, à savoir l'eau ; l'éthanol (50%), le méthanol (50%) et l'acétone (50%). Les résultats sont présentés dans (Figure 6).

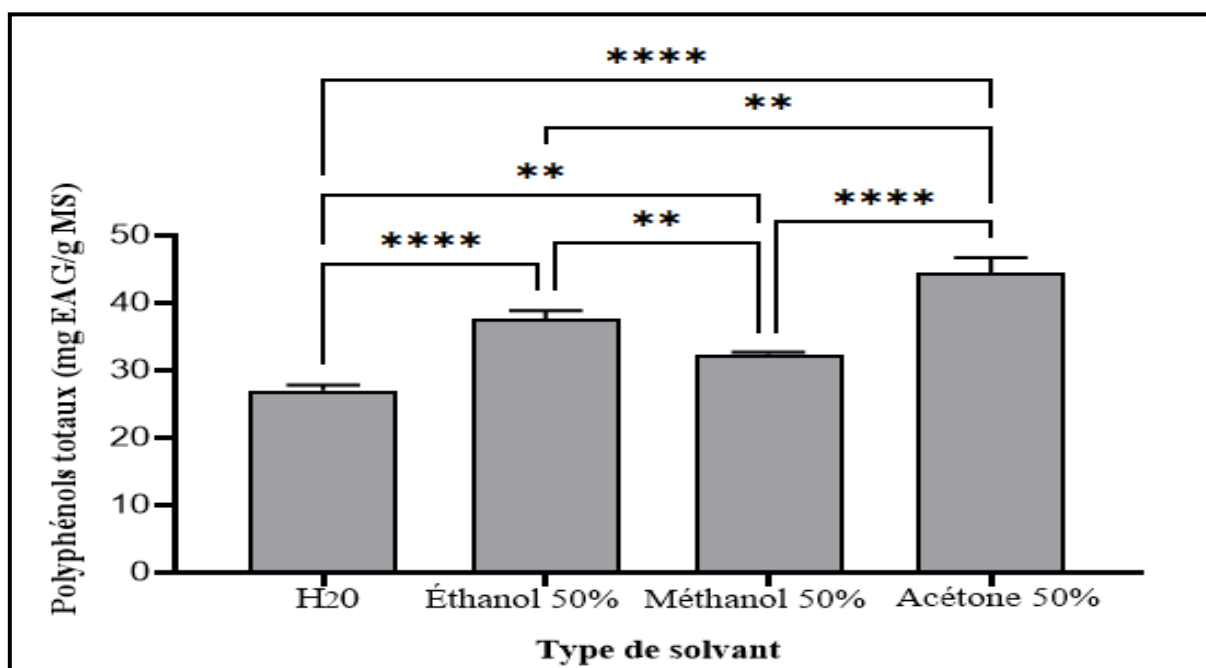


Figure 6 : Effet de la nature du solvant sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. alaternus*. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type (n=3). L'analyse des données a été réalisée par le test *One Way ANOVA*, suivi du test post hoc de Tukey's. Les résultats sont considérés significatifs à $P \leq 0.05$.

L'analyse statistique a révélé une variation significative des teneurs en polyphénols totaux extraites par les quatre solvants. Cette variation est comprise entre 27.01 ± 0.82 mg

EAG/g MS à 44.51 ± 2.20 mg EAG/ g MS. L'acétone (50%) a été distingué comme le solvant d'extraction le plus efficace comparant aux d'autres solvants.

L'extraction des polyphénols est souvent exploitée en utilisant des solvants en raison de leur nature qui leur permet d'être relativement hydrophiles. Les solvants les plus fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont habituellement le méthanol, l'éthanol et l'acétone (**Santos-Buelga et al., 2012**). En outre, les solvants ayant une valeur de polarité proche de celle du soluté sont susceptibles de mieux fonctionner et vice versa (**Zhang et al., 2018**).

Plusieurs études ont examiné l'influence du solvant sur l'extraction des polyphénols. L'étude menée par **Djeridane et al. (2007)** sur les parties aériennes de *R. alaternus* a montré que l'extrait acétonique présentait un rendement plus élevé que l'extrait méthanolique. En outre, les travaux menés par (**Bouchenak et al., 2020**) ont montré que l'acétone était le solvant le plus efficace en termes de rendement.

III-1-2- Choix de la polarité

L'efficacité de l'extraction des composés phénoliques s'améliore en utilisant un mélange du solvant et d'eau plutôt qu'un solvant mono-composant (**Uma et al., 2010**). Les résultats obtenus en utilisant l'acétone à différentes polarités sont illustrés dans la (**Figure 7**).

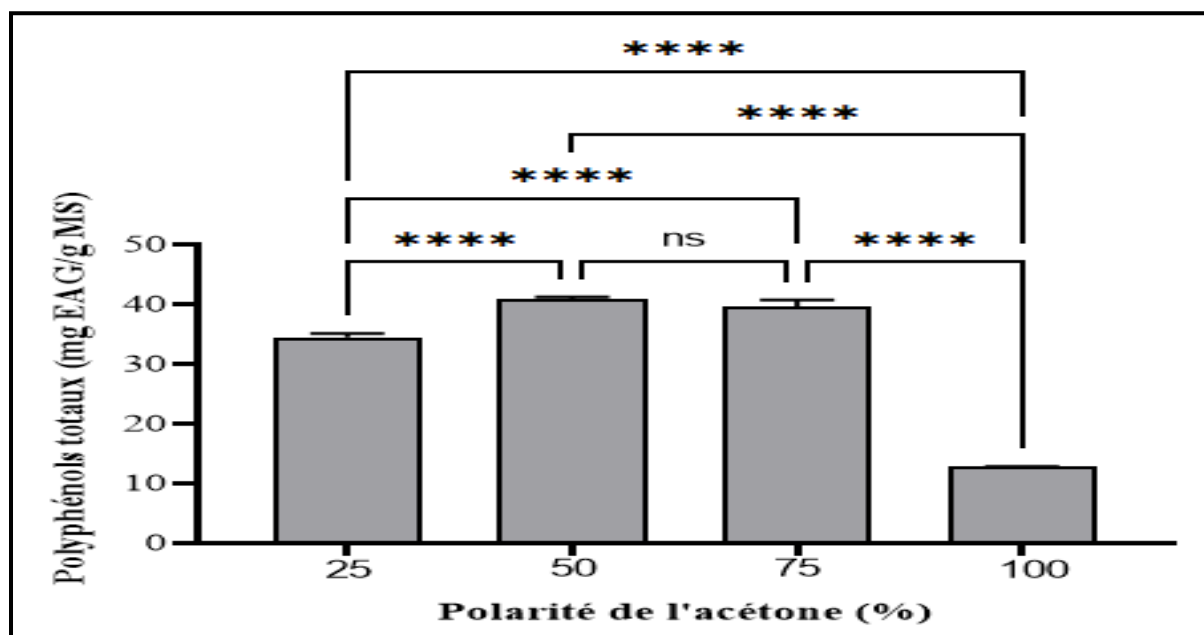


Figure 7 : Effet de la polarité du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. alaternus*. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type (n=3). L'analyse des données a été réalisée par le test *One Way* ANOVA, Suivi du test post hoc de Tukey's. Les résultats sont considérés significatifs à $P \leq 0.05$.

Les résultats de l'étude statistique montrent une différence significative entre les teneurs extraites par l'acétone à diverses polarités. Lorsque la concentration d'acétone augmente, la teneur en PT augmente également, jusqu'à atteindre une polarité de 50%, où la valeur optimale des polyphénols totaux est maximale. Ensuite, une forte diminution est observée atteignant une teneur de $12,08 \pm 0,06$ mg EAG/g MS pour une concentration de 100% d'acétone.

Le mélange des solvants organiques tels que l'acétone avec de l'eau crée généralement un milieu plus polaire facilitant l'extraction des polyphénols comme l'ont rapporté **Spigno et ses collaborateurs (2007)**. La teneur optimale en composés phénoliques totaux obtenue avec une solution d'acétone à 50%, confirme que cette polarité est la plus efficace pour l'extraction, cela a été confirmé par l'étude réalisée par **Yilmaz & Toledo (2006)**.

III-1-3- Choix de la température

Différents paramètres expérimentaux, en particulier la température d'extraction, jouent un rôle crucial dans la régulation de l'efficacité du processus d'extraction des composés phénoliques (Bouterfas *et al.*, 2014). La Figure 8 représente les teneurs en composés phénoliques totaux à différentes températures d'extraction en utilisant l'acétone à 50 %.

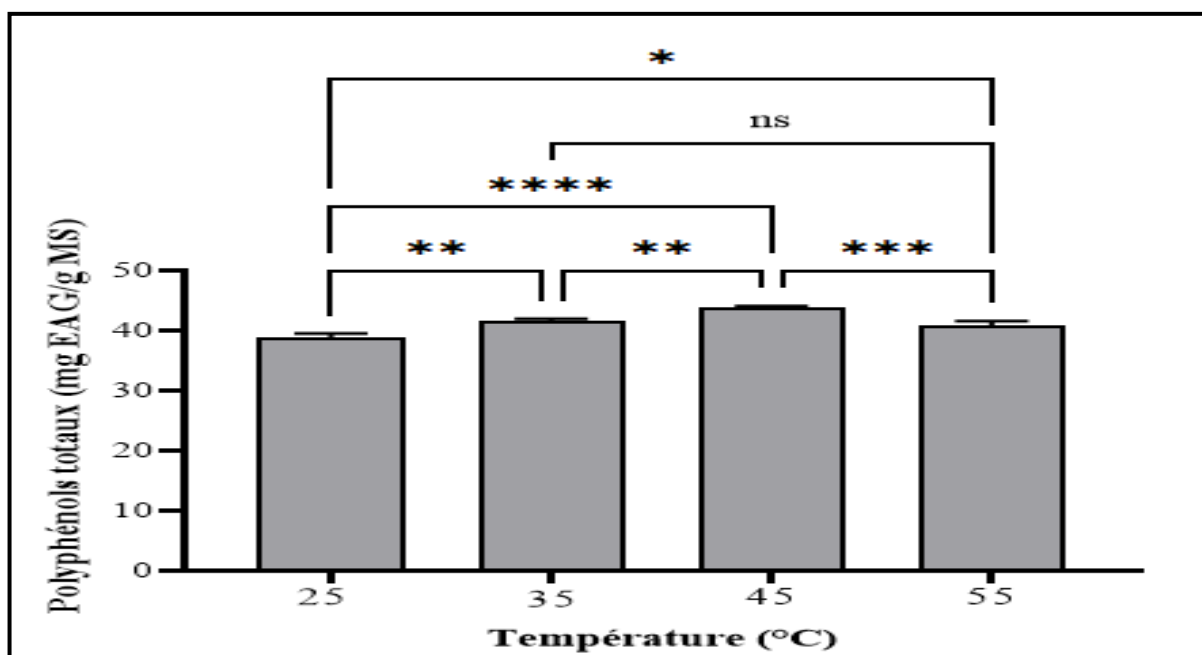


Figure 8 : Effet de la température sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. alaternus*. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type (n=3). L'analyse des données a été réalisée par le test *One Way ANOVA*, Suivi du test post hoc de Tukey's. Les résultats sont considérés significatifs à $P \leq 0.05$.

La figure ci-dessus montre que le taux des polyphénols totaux augmente avec la température jusqu'à ce qu'il atteigne son maximum à 45°C (43.85 ± 0.2 mg EAG/g MS), puis diminue légèrement à 55°C. Lors d'une extraction, la température élevée améliore la perméabilité des solvants à travers la matière sèche, ce qui entraîne une augmentation de la solubilité et des coefficients de diffusion des composés à extraire. De plus, la viscosité du solvant diminue, ce qui facilite son passage à travers la matière végétale (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Cependant, des températures supérieures à 50°C peuvent induire la décomposition des composés phénoliques (Benmeziiane *et al.*, 2014). Chan et ses collaborateurs (2009) ont rapportés que les taux optimaux des composés phénoliques sont enregistrés à une température de 45°C.

III-1-4- Choix du temps

Le temps d'extraction était un autre paramètre principal dans la procédure d'extraction (Bouterfas *et al.*, 2014), la figure suivante montre les différentes teneurs en composés phénoliques en fonction du temps.

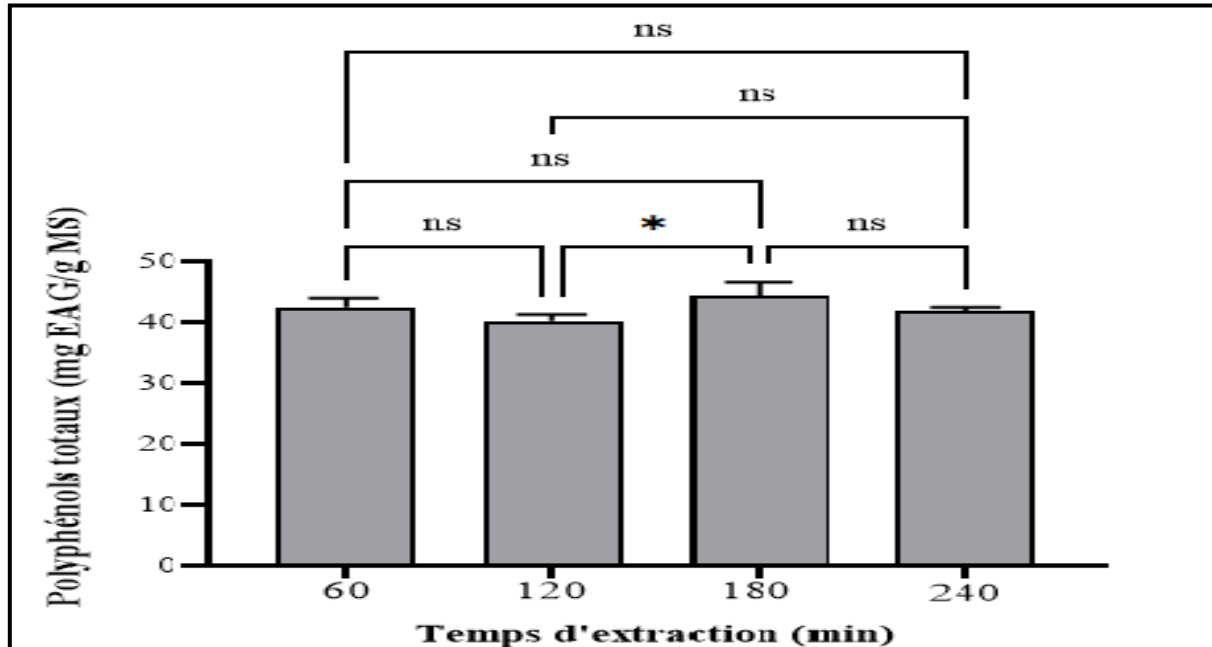


Figure 9 : Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. alaternus*. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type (n=3). L'analyse des données a été réalisée par le test *One Way ANOVA*, Suivi du test post hoc de Tukey's. Les résultats sont considérés significatifs à $P \leq 0.05$.

Ces résultats indiquent que la teneur optimale en TPC est observée à 180 min (44.26 ± 2.29 mg EAG/ g MS), tandis que à 240 minutes une légère diminution est enregistrée.

Le temps d'extraction est défini comme la durée du contact entre le solvant et le solide. Une augmentation de celle-ci mènera à une extraction optimale, tandis que sa prolongation n'améliore pas toujours l'efficacité d'extraction, mais elle pourrait entraîner une oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Les recherches menées par Bouterfas *et al.*, (2014) et Chan *et al.* (2009) ont démontrées que 180 min correspondent au meilleur temps d'extraction des composés phénoliques totaux.

III-2- Le plan d'expérience Box-Behnken

III-2-1- Analyse des résultats

L'extraction des composés naturels à partir des plantes médicinales peut être affecter par différents facteurs tels que la température, le temps d'extraction et la polarité. Dans ce travail, le model Box-Behnken a été utilisé pour étudier l'impact des trois facteurs avec leurs trois niveaux sur la teneur en polyphénols totaux. Ce model comporte 15 expériences, et les résultats sont représentés dans le **Tableau IV**. Ces trois facteurs et leurs trois niveaux sont :

- ✓ **Facteur 1 (X1)** : La polarité de l'acétone (25%, 50% et 75%).
- ✓ **Facteur 2 (X2)** : La température (35°C, 45°C et 55°C).
- ✓ **Facteur 3 (X3)** : Le temps d'extraction (120 min, 180 min et 240 min).

Selon le **Tableau V** des résultats obtenus par le plan de Box-Behnken, le taux des polyphénols totaux des extraits de l'écorce de *R. alaternus* varie entre $34,3 \pm 1.28$ mg EAG/g MS (expérience N° 11) et 47.43 ± 0.48 mg EAG/g MS (expérience N° 12), ce qui suggère une influence importante des paramètres étudiés sur les teneurs en polyphénols totaux. De plus, les valeurs réelles ont été proche des valeurs prédites, ce qui suggère que le modèle est capable de fournir des prédictions précises.

Tableau V : Plan expérimental de Box-Behnken et valeurs expérimentales et prédites pour le contenu phénolique total de l'extrait de l'écorce de *R. alaternus*.

N° du test	Configuration	Polarité (%)	Température (°C)	Temps (min)	Valeurs réelles TPC (mg EAG/g MS)	Valeurs prédites TPC (mg EAG/g MS)
1	0--	50	35	120	41,49	41,58875
2	+--0	75	35	180	44,04	43,72375
3	0+-	50	55	120	42,84	41,62875
4	--+0	25	55	180	37,83	38,14625
5	0+-	50	35	240	40,35	41,56125
6	0++	50	55	240	39,32	39,22125
7	++0	75	55	180	40,03	41,02375
8	000	50	45	180	43,76	45,11
9	+0-	75	45	120	39,51	39,7275
10	-0-	25	45	120	39,6	40,495
11	-0+	25	45	240	34,3	34,0825
12	000	50	45	180	47,43	45,11
13	--0	25	35	180	38,74	37,74625
14	+0+	75	45	240	44,6	43,705
15	000	50	45	180	44,14	45,11

III-2-2- Validation du modèle

Le modèle mathématique sert à relier la fonction de réponse et les données expérimentales. Pour garantir la fiabilité de la réponse, il est crucial de vérifier plusieurs éléments tels que la relation de linéarité entre la fonction de réponse et les données expérimentales, l'effet quadratique des variables indépendantes, leur interaction et le coefficient de régression (Chan *et al.*, 2009).

III-2-2-1- Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation (R^2) correspond au rapport de la somme des carrés des réponses prédites sur la somme des carrés des réponses mesurées. Ce coefficient permet d'évaluer la précision et l'adéquation d'un modèle, lorsque le modèle parvient à prédire exactement les valeurs des réponses observées, la somme des carrés des réponses prédites est égale à la somme des carrés des réponses mesurées, et le R^2 est égal à 1 (Chan *et al.*, 2009 ; Goupy & Creighton, 2006).

Dans cette étude, l'analyse de la variance (ANOVA) a montré un coefficient de détermination R^2 de 0.90, ce qui indique que 90% des variations sont expliquées par le modèle. D'autre part, la valeur de $P \leq 0.05$ (P -value = 0.0437), confirmant ainsi la pertinence du modèle (Figure 10).

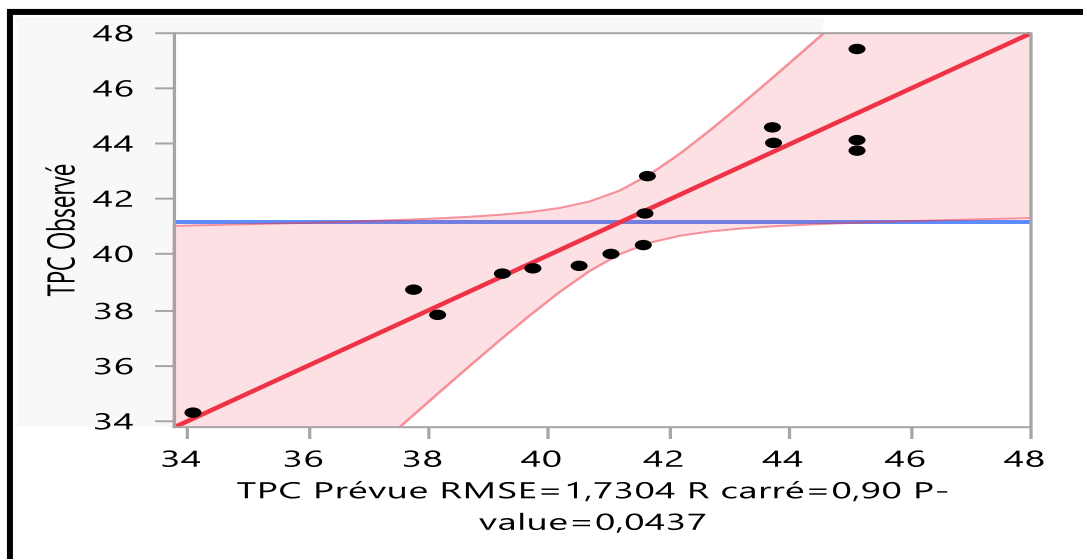


Figure 10 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.

III-2-2-2- Estimation des coefficients

Les coefficients de régression et la surface de réponse ont été exploités afin d'étudier les impacts des variables (X_1 , X_2 et X_3 : polarité, température et temps) respectivement, à une $P \leq 0.05$ sur l'extraction des polyphénols totaux. Lors de l'analyse des coefficients de régression, la P -value est un indicateur de la signification de chaque coefficient ainsi que l'intensité d'interaction entre les paramètres. Il existe une relation inversement

proportionnelle entre la P -value et la significativité, plus la P -value est petite plus le coefficient est significatif (Chan *et al.*, 2009 ; Uma *et al.*, 2010).

Tableau VI : Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré des extraits des écorces de *R. alaternus*.

Effet	Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P -value
Linéarité	Constante	45,11	0,999044	45,15	<0,0001*
	X1-Polarité (%)	2,21375	0,611787	3,62	0,0152*
	X2-Température (°C)	-0,575	0,611787	-0,94	0,3904
	X3-Temps (Min)	-0,60875	0,611787	-1,00	0,3654
Interaction	X1*X2	-0,775	0,865197	-0,90	0,4114
	X1*X3	2,5975	0,865197	3,00	0,0300*
	X2*X3	-0,595	0,865197	-0,69	0,5222
Quadratique	X1*X2	-3,22375	0,900526	-3,58	0,0159*
	X1*X3	-1,72625	0,900526	-1,92	0,1134
	X2*X3	-2,38375	0,900526	-2,65	0,0456*

III-2-2-3- Effet linéaire

Les résultats de cette étude indiquent que la polarité (X1) est le facteur ayant une influence très significative sur l'extraction des polyphénols totaux des écorces de *R. alaternus* avec une probabilité de $P=0.0152$ avec un coefficient estimé de 2,21375. En revanche, les facteurs X2 et X3, à savoir la température et le temps n'ont pas montré de significativité dans leurs impacts (**Tableau VI**).

III-2-2-4- Effet d'interaction

D'après la **Figure 11** et les résultats **Tableau VI**, une interaction significative sur l'extraction des composés phénoliques totaux a été observée entre $X1 \times X3$ (polarité*temps) avec une probabilité de $P=0,0300$ et un coefficient d'estimation positif de 2,5975. Cependant, $X1 \times X2$ (polarité*température) et $X2 \times X3$ (température*temps) n'ont pas eu un effet significatif avec des P -value de 0,4114 et 0,5222 respectivement et des coefficients d'estimation négatifs.

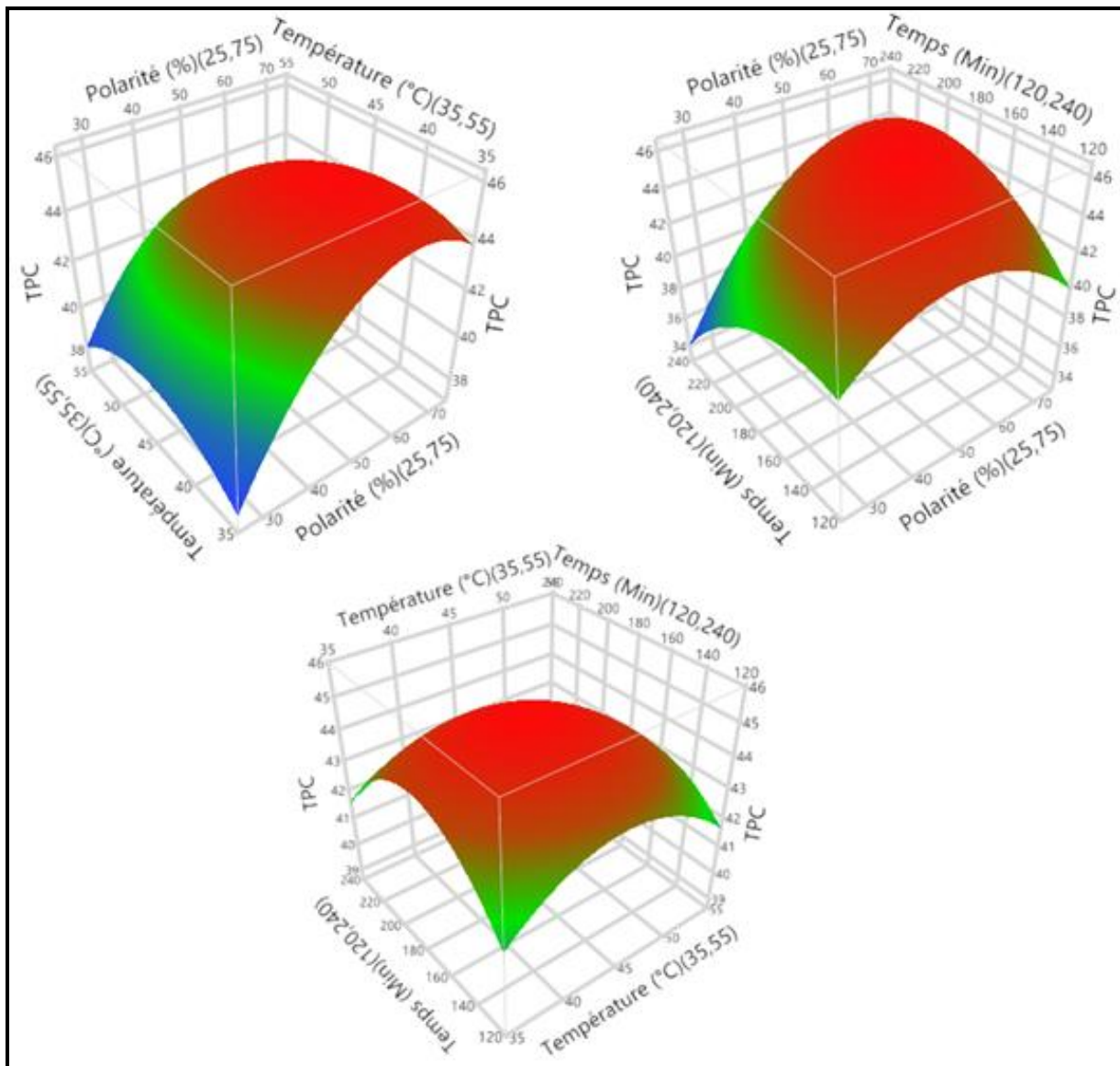


Figure 11 : Graphiques des surfaces de réponses représentent les interactions de trois facteurs.

III-2-2-5- Effet quadratique

Selon le **Tableau VI**, un seul effet quadratique (X_2^2) s'est avéré non significatif avec une $P=0,1134$. En revanche, les deux autres effets quadratiques ont montré des effets significatifs sur la teneur en polyphénols totaux avec une probabilité de $P=0,0159$ pour X_1^2 et $P=0,0456$ pour X_3^2 .

Pour conclure, les résultats obtenus indiquent que la polarité et le temps d'extraction ont un impact significatif sur l'ensemble des effets observés (**Tableau VI**).

III-2-2-6- Modèle mathématique

Suite à l'identification des facteurs ainsi que la réponse, il est important d'élaborer un modèle mathématique pour le plan d'expérience proposé incluant une série d'expérience.

L'étude d'optimisation a abouti à l'équation polynomiale finale exprimée en fonction des facteurs codés en éliminant les facteurs non significatifs

$$Y = 45,11 + 2,21375 X_1 + 2,5975 X_1 * X_3 - 3,22375 X_1^2 - 2,38375 X_3^2$$

III-2-2-7- Solution du modèle

Pour évaluer la capacité prédictive du modèle, nous avons procédé à une validation expérimentale. Celle-ci consiste à comparer les prévisions du modèle aux résultats obtenus en pratique, dans les conditions jugées optimales. Cette analyse comparative a été réalisée à l'aide du logiciel JMP17 Pro. Le **Tableau VII** présente les paramètres considérés comme optimaux pour cette étude.

Tableau VII : Les conditions optimales d'extraction des CPT à partir de la poudre des écorces des *R. alaternus*.

Variable	Valeurs critiques
X1 : Polarité (%) (25-75)	60,933
X2 : Température (°C) (35-55)	42,099
X3 : Temps (Min) (120-240)	188,807

Selon le tableau ci-dessus, les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques totaux des écorces de *R. alaternus* étaient les suivantes : une polarité de (60, 933 %), une température d'extraction de (42,099 °C) ainsi qu'un temps d'extraction de (188,807 min). Dans ces conditions, le modèle a prévu une réponse de 45,632 mg EAG/g MS, entre autres, la valeur expérimentale obtenue était $44,838 \pm 0,202$ mg EAG/g MS.

Cette étude montre que les résultats expérimentaux étaient très proches de ceux prédits, cela implique qu'il avait un degré élevé d'ajustement entre les valeurs observées dans l'expérience et la valeur prédite par le modèle. Par conséquent la modélisation de surface de réponse pourrait être appliquée efficacement pour prédire l'extraction des composés phénoliques totaux des écorces de *R. alaternus*.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales sont riches en métabolites secondaires, tels que les polyphénols, qui fournissent une variété d'activités biologiques expliquant l'usage de ces plantes comme remède depuis des milliers d'années. Le présent travail vise à optimiser l'extraction des composés phénoliques totaux présents dans les écorces des *R. alaternus*,

L'extraction des composés phénoliques totaux a été testée en étudiant l'impact individuel des quatre facteurs, notamment le solvant et sa polarité, la température et le temps d'extraction. Les résultats de ces tests ont montré que la teneur maximale en composés phénoliques totaux était observée dans l'acétone à 50% de polarité, à une température de 45°C et une durée d'extraction de 180 minutes. Ces conditions ont été identifiées comme étant les plus favorables pour obtenir une extraction maximale de ces composés naturels.

Afin d'optimiser les paramètres d'extraction, une méthode des surfaces de réponse a été mise en œuvre en utilisant le plan de Box-Behnken. Trois facteurs ont été testés : la polarité du solvant (X1), la température (X2) et le temps d'extraction (X3). Les deux facteurs polarité et temps d'extraction ont été identifiés comme les plus significatifs dans leur influence sur la réponse, avec une valeur de $P < 0,05$. Le modèle Box-Behnken a indiqué que les conditions expérimentales optimales qui permettent d'obtenir le maximum en teneur CPT sont les suivantes : une polarité d'acétone 60,93%, une température de 42,09°C pendant un temps d'extraction de 188,80 min.

Le modèle a prédit une valeur optimale de 45,632 mg EAG/g MS en composés phénoliques totaux. En outre, la valeur expérimentale obtenue à ces conditions était de $44,838 \pm 0,202$ mg EAG/g MS, montrant une très bonne concordance entre les deux valeurs.

Pour conclure, les quatre facteurs étudiés ont un impact significatif sur l'extraction des composés phénoliques et l'étude d'optimisation a montré que le modèle est capable de fournir des prédictions précises.

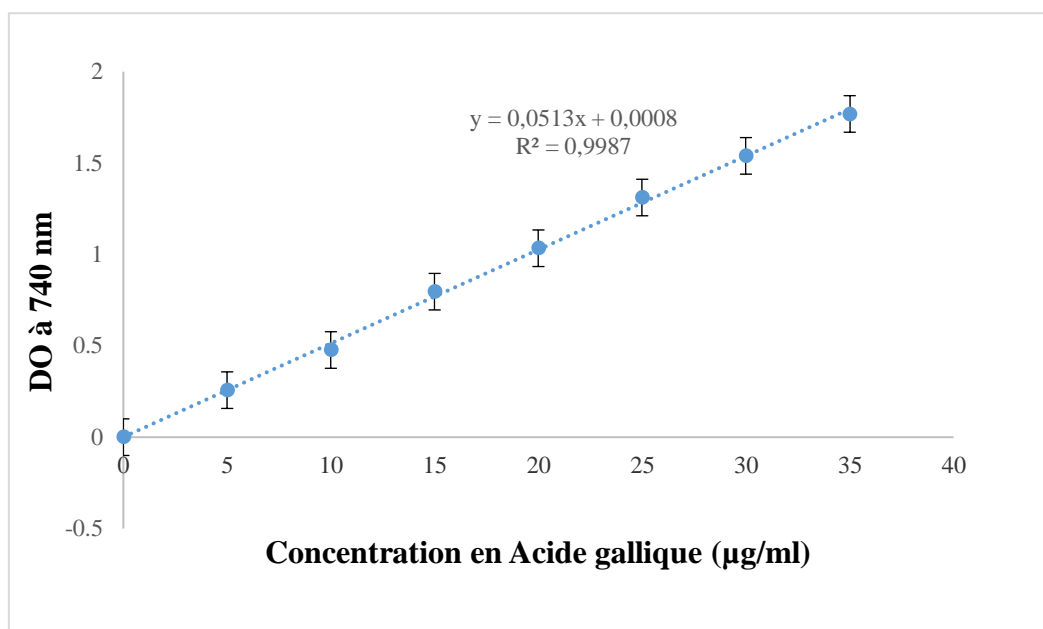
Pour approfondir cette recherche, il serait pertinent d'étendre l'étude en examinant et en optimisant d'autres variables qui influencent l'extraction des composés phénoliques totaux. Parmi ces paramètres, on pourrait considérer le ratio, la taille des particules et le pH. De plus, il serait intéressant de tester les composés phénoliques des écorces de *R. alaternus* pour diverses activités.

Annexes

Annexe (1) : Listes des matériels et produits chimiques utilisés

Matériels	Produits chimique
<ul style="list-style-type: none">• Etuve ventilée• Broyeur électrique• Tamis• Balance électrique• Agitateur bain marrie• Spectrophotomètre• Centrifugeuse• Réfrigérateur• Vortex• Papier aluminium, Papier absorbant• Spatule• Micropipettes• Tubes à 1.5 ml	<ul style="list-style-type: none">• Acide gallique ($C_6H_2(OH)_3COOH$).• Carbonate de sodium (Na_2CO_3) .• Folin-ciocalteu ($H_3PMO_{12}O_{40}$).• Méthanol (CH_3OH).• Ethanol (C_2H_6O).• Acétone (C_3H_6O).• Eau distillé (H_2O).• Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).• Acétate de sodium ($C_2H_3NaO_2$).• Quercétine ($C_{15}H_{10}O_7$).

Annexe (2) : La courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des composés phénoliques totaux.



Références bibliographiques

-A-

Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte, A.-M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M.-G., & 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.

Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03).

-B-

Ballero, M., Poli, F., Sacchetti, G., & Loi, M. C. (2001). Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore ž south-western Sardinia. *Fitoterapia*, 72 (7), 788-801.

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., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., & Ghedira, K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian)*Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57(3), 453.

Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., & 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.

Benmeziane, F., Djamai, R., Cadot, Y., & Seridi, R. (2014). Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis vinifera*). *International food research journal*, 21, 1025-1029.

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

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

Bouchenak, O., Yahaoui, K., Benhabyles, N., Laoufi, R., EL Hadad, D., Ousaid S., & Blizak, D. (2020). Criblage phytochimique et évaluation de pouvoire antioxydant des feuilles de *myrtus communis* et *Rhamnus alaternus*. *Agrobiologia* 10(1): 1749-61.

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.

Boussahel, S., Speciale, A., Ferlazzo, G., Harzallah, D., Dahamna, S., Amar, Y., Bonaccorsi, I., Cacciola, F., Cimino, F., Donato, P., & Cristani, M. (2015). Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 102.

Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Khaled, M. B., Bouterfas, M., & Latreche, A. (2014). Optimization of Extraction Conditions of Some Phenolic Compounds from White Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, 04(05), 292-308.

-C-

Canale, A., Benvenuti, S., Raspi, A., & Benelli, G. (2016). Insect pollinators of the late winter flowering *Rhamnus alaternus* L., a candidate for honeybee-friendly scrubland spots in intensively managed agricultural areas. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 150(4), 611-615.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Mustapha, W. A. W., & Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International food research journal*, 16, 203-213.

Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Boudjemai, O., & Ghellai, I. (2020). Antioxidant and hemolytic activity of *Ziziphus jujuba* Mill and *Rhamnus alaternus* L (*Rhamnaceae*) extracts from Algeria. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*, 1-14.

Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols : Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564-578.

-D-

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, Jf., & Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224(6), 801-809.

-E-

El Aou-Ouad, H., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., Medrano, H., & Gulías, J. (2015). Trade-offs between seedling growth, plant respiration and water-use efficiency in two Mediterranean shrubs *Rhamnus alaternus* and *Rhamnus ludovici-salvatoris*. *Photosynthetica*, 53(4), 537-546.

-F-

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S. (2015). Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Materials and Environmental Science*. 6. 2346-2357.

-G-

Genovese, S., Epifano, F., Curini, M., Kremer, D., Carlucci, G., & Locatelli, M. (2012). Screening for oxyprenylated anthraquinones in Mediterranean *Rhamnus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 125-127.

Goupy, J. (2006). LES PLANS D'EXPERIENCES. *Revue Modulad*, No.34, 74-116.

Goupy, J., & Creighton, L. (2006). Introduction aux plans d'expériences (3e éd). Dunod « *L'Usine nouvelle* ». 978-2-10-059297-5

Gulias, 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.

-K-

Kherbachi, S., Kheniche, M., Tacherfiout, M., (2022). Antihemolytic activity of hydroalcoholic leaves and bark extracts from *Rhamnus alaternus* against AAPH induced hemolysis on human erythrocytes. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 2(2), 210-219

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezević, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 54(1), 65–72.

Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., & Zovko Končić, M. (2013). Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry*, 136(2), 335-341.

-M-

Mahmoodi, S., Taleghani, A., Akbari, R., & Mokaber-Esfahani, M. (2022). *Rhamnus pallasii subsp. sintenisii* fruit, leaf, bark and root : Phytochemical profiles and biological activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(7), 103924.

Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L. B., Dahmoune, F., Madani, K., & Chibane, M. (2015). HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus L.* *Industrial Crops and Products*, 74, 858-866.

-N-

Nekkaa, A., Benaissa, A., Lalaouna, A. E. D., Mutelet, F., & Canabady-Rochelle, L. (2021). Optimization of the extraction process of bioactive compounds from *Rhamnus alaternus* leaves using Box-Behnken experimental design. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 100345.

Nekkaa, A., Benaissa, A., Mutelet, F., & Canabady-Rochelle, L. (2021). *Rhamnus alaternus* Plant : Extraction of Bioactive Fractions and Evaluation of Their Pharmacological and Phytochemical Properties. *Antioxidants*, 10(2), 300.

Nigussie, G., Melak, H., & Endale Annisa, M. (2021). Traditional Medicinal Uses, Phytochemicals, and Pharmacological Activities of Genus *Rhamnus*. A review. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A : Chemistry*, 8(3), 899-932.

-P-

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

Penzig, Ottone. (1902). Flore coloriée de poche du littoral méditerranéen de Gênes à Barcelone y compris la Corse. P. *Klincksieck*.

-R-

Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., & Vidović, S. (2012). Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM). *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3).

-S-

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In S. D. Sarker & L. Nahar (Éds.), *Natural Products Isolation* (Vol. 864, p. 427-464). *Humana Press*.

Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*.

Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). An Introduction to Natural Products Isolation. In S. D. Sarker & L. Nahar (Éds.), *Natural Products Isolation* (Vol. 864, p. 1-25). *Humana Press*.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, 24(13), 2452.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.

-T-

Tacherfiout, M., Petrov, P. D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M. I., & Khettal, B. (2018). 571 antihyperlipidemic effect of a rhamnus alaternus leaf extract in triton-induced hyperlipidemic 572 rats and human hepg2 cells. *biomedicine & pharmacotherapy*, 101, 501–509. 573.

Tinsson, W. (2010). Plans d'expérience : Constructions et analyses statistiques. *Springer Berlin Heidelberg*. (Vol. 67).

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

-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. *Universiti Kebangsaan Malaysia*.

-Y-

Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.

-Z-

Zeouk, I., Ouali Lalami, A. E., & Bekhti, K. (2019). In vitro antibacterial activity of medicinal plants in the central north of morocco . *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 285-292.

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, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products : A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20.

Résumé

Rhamnus alaternus, est une plante méditerranéenne réputée pour ses effets thérapeutiques et sa richesse en composés bioactifs. L'objectif de cette étude était d'optimiser l'extraction des CPT des écorces de *R.alaternus* en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) et le plan Box Behnken comme modèle. Les paramètres d'extraction optimaux pour les CPT obtenue des quatre tests préliminaires étaient successivement : L'acétone à 50%, une température de 45°C et un temps d'extraction de 180 minutes. Le résultat expérimentale 44,83 ± 0,20(mg EAG/g MS) était proche de la valeur prédite par le modèle 45,63 (mg EAG/g MS) confirmant ainsi la validité du modèle. Enfin, les quatre facteurs étudiés ont un impact significatif sur l'extraction des CPT et l'étude d'optimisation a montré que le modèle est capable de fournir des prédictions précises.

Mots clé : *R.alaternus*, Box-bhenken, composés phénoliques ,RSM.

Abstract

Rhamnus alaternus, is a Mediterranean plant known for its therapeutic effects and richness in bioactive compounds. The aim of this study was to optimize the extraction of TPC from *R. alaternus* bark using response surface methodology (RSM) and the Box Behnken design as the experimental model. The optimal extraction parameters for total phenolic compounds obtained from the four preliminary tests were: 50% acetone , 45°C temperature, and 180 minutes extraction time. The experimental result of 44.83 ± 0.20 (mg GAE/g DW) was close to the model-predicted value of 45.63 (mg GAE/g DW), confirming the validity of the model. Finally, the four factors studied have a significant impact on the extraction of TPC and the optimization study shown that the modele is capable of providing accurate predictions.

Key words : *R. alaternus*, Bux-bhenken, phenolic compounds, RSM.

ملخص

R. alaternus نبات حوض المتوسط المشهور بتأثيراته العلاجية و ثراءه بالمركبات النشطة. كان الهدف من هذه الدراسة هو تحسين استخراج المركبات الفينولية من لحاء *R.alaternus* باستخدام منهجية الاستجابة السطحية (RSM) وخطة بوكس-بانكن كنموذج تجريبي. كانت العوامل الاستخراجية المثلى للمركبات الفينولية التي تم الحصول عليها من خلال أربعة اختبارات تجريبية سابقة هي: الأسيتون بنسبة 50٪، درجة حرارة 45 درجة مئوية وزمن الاستخراج 180 دقيقة. كانت النتيجة التجريبية 44,83 ± 0.20 (ملغ الموافق لحمض الغاليك / غ من المادة الجافة) قريبة من القيمة المحتملة بواسطة النموذج 45,63 (ملغ الموافق لحمض الغاليك / غ من المادة الجافة) مما يؤكد صحة النموذج. أخيرا أظهرت العوامل الأربعة المدروسة تأثيرا كبيرا على استخراج المركبات الفينولية الكلية وأظهرت دراسة التحسين ان النموذج قادر على توفير توقعات دقيقة.

كلمات مفتاحية: *R. alaternus*, بوكس-بانكن, المركبات الفينولية, RSM.