

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

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Contrôle de Qualité et Analyse des Aliments



Réf :.....

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

MASTER

THÈME

**Optimisation de l'extraction des composés phénoliques et
étude de l'activité antioxydante de l'espèce *Smilax aspera*
en utilisant la méthodologie de surface de réponse**

Présenté par:

BENMOSTEFA Mohamed & AMRANE Aymen Oussama

Soutenu le : 18 Septembre 2024

Devant le jury composé de :

Mr. BOUDRIES Hafid	Pr	President
Mr. CHIKHOUNE Amirouche	MCA	Encadreur
Mr. BACHIR BEY Mostapha	Pr	Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024



REMERCIEMENTS

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

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, nous remercions sincèrement notre promoteur, Mr CHIKHOUNE, pour son encadrement, ses précieux conseils, et sa disponibilité tout au long de cette recherche. Son expertise et sa patience ont été indispensables à la bonne conduite de ce travail.

Nous exprimons nos remerciements à Mr BOUDRIES d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Mr BACHIR BEY d'avoir accepté d'examiner ce travail.

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.

Dédicaces

Ce projet de fin d'étude est dédié à mes parents qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Sans eux, je n'aurais certainement pas fait d'études longues. Ce travail représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigué tout au long de ma scolarité. Qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.

Je le dédie aussi à mon frère, Youcef. Ma sœur, ainsi qu'à toute ma famille.

A Imane qui a toujours été là pour m'aider et m'encourager.

*A ma famille universitaire : Djobrane, Oussama, Abdelraouf, karim, Omar,
Massi et Mohamed*

. Et finalement, à mes amis Zaki et Djalil qui n'ont jamais cessé de me soutenir.

Benmostefa Mohamed

Dédicaces

A mon père

Merci papa pour tout le soin que tu as mis à m'assurer une éducation acceptable dont le fruit aujourd'hui est le présent travail. Que Dieu vous protège et vous accorder une longue vie pour que tu en jouisses davantage.

A ma mère

Ton souhait a toujours été de nous voir prospérer dans la vie. Merci pour ton amour, ta tendresse, ta patience, tes efforts que tu déploies pour que cela se réalise. Que Dieu vous bénisse et prolonge ta vie.

Vous m'avez donné les moyens de faire ce que je voulais dans la vie sans que je ne me fasse de soucis. Je ne pourrais jamais assez-vous remercier pour ce que vous m'avez donné et appris

A mes grands parents

Pour votre affection et votre soutien. Que Dieu vous bénisse

A mon cher frère akram

et mes sœurs Imane Sara et Célia

Pour la joie et l'ambiance qu'on a passée ensemble durant cette période, pour les nombreux sacrifices consentis à mon égard, que ce mémoire soit pour vous un élément de satisfaction

Que Dieu vous protège

A mes oncles et tantes sans exception

Pour votre affection et votre soutien. Que Dieu vous bénisse.

A tous mes amis

*Et surtout mon chers amis **Benmostefa mohamed**, Pour le soutien qu'il m'a apporté durant ces années. Que Dieu vous bénisse.*

A tous mes amis de la promotion

Très bonne carrière à vous et que Dieu vous bénisse ET tous ceux qui me sont chers.

Oussama

Table des Matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Synthèse Bibliographique	2
I Généralités sur la plante : <i>Smilax aspera</i>	3
I.1 Description botanique	3
I.2 Classification botanique	3
I.3 Distribution géographique	4
I.4 Compositions chimiques	4
I.4.1 Glycosides	4
I.4.2 Flavonoïdes	4
I.4.3 Saponines	4
I.4.4 Alcaloïdes	5
I.5 Utilisations de la plante étudiée	5
II Les composés phénoliques et l'activité antioxydante	6
II.1 Les composés phénoliques	6
II.1.1 Définition	6
II.1.2 Propriétés des polyphénols	6
II.1.2.1 Utilisations alimentaires	6
II.1.2.2 Propriétés médicales	6
II.1.2.3 Propriété antioxydante	6
II.2 Les antioxydants	7
II.2.1 Définition	7
II.2.2 Les antioxydants endogènes	7
II.2.3 Les antioxydants enzymatiques	7
II.2.4 Les antioxydants exogènes	7
II.2.5 Les antioxydants non enzymatiques métaboliques	7
III Plans d'expérience	8
III.1 Définition	8
III.2 Types de plans	8
III.3 Plan de Box-Behnken	8
III.3.1 Caractéristiques	9

III.3.2	Avantages du Plan.....	9
	Matériel et Méthodes.....	3
I	Matériel végétal.....	10
I.1	Séchage.....	10
I.2	Broyage.....	10
II	Optimisation d'extraction des composés phénoliques par ultrasons	11
II.1	Application du plan de Box-Benhken	11
II.2	Dosage des composés phénoliques	13
II.3	Dosage des flavonoïdes totaux	14
II.4	Dosage des anthocyane et flavanols.....	14
II.5	Dosage des proanthocyanidines	14
II.6	Dosage des chlorophylles et caroténoïdes.....	14
III	Activité antioxydante	15
III.1	Activité de piégeage du radical DPPH.....	15
III.2	Pouvoir réducteur	15
IV	Analyse statistique.....	15
	<i>Résultats et Discussion</i>	16
I.1	Analyse des résultats	17
I.2	Cas des feuilles de <i>S. aspera</i>	17
I.2.1	Estimation des coefficients	18
I.3	Cas des racines de <i>S. aspera</i>	20
I.3.1	Estimation des coefficients.....	21
II	Modèles mathématiques.....	23
II.1	Conditions d'extraction optimales pour les feuilles.....	24
II.2	Conditions d'extraction optimales pour les racines	25
III	Teneur totale en polyphénols.....	27
IV	Teneurs en flavonoïdes totaux et flavonols	27
V	Teneurs en chlorophylles, proanthocyanidines, anthocyanidines et le pouvoir réducteur	28
	<i>Conclusion et Perspectives</i>	17
	<i>Références Bibliographiques</i>	29
	<i>ANNEXES</i>	33

Liste des abréviations

AA : antioxydants

BBD : Box–Behnken design

CPT : Composés Phénoliques Totaux

DF : degrés de liberté

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EQr : équivalents quercétine

Mg EAG : milligrammes d'équivalents acide gallique

Mg EC : milligrammes d'équivalents catéchine

PS : poids sèche

ROS : ‘‘Reactive Oxygen Species’’ soit ‘‘espèces réactives de l'oxygène’’

Liste des figures

Figure 1 :	Photographies des feuilles, fleurs et Baies rouges de <i>Smilax Aspera</i>	3
Figure 2 :	Distribution géographique mondiale de <i>Smilax aspera</i>	4
Figure 3 :	Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	9
Figure 4 :	Carte de localisation géographique du lieu de récolte de <i>Smilax aspera</i>	10
Figure 5 :	Poudres des racines et des feuilles de <i>S. aspera</i>	11
Figure 6 :	Profil de prédiction des valeurs prédites et la fonction de désirabilité pour les feuilles de <i>Smilax aspera</i>	24
Figure 7 :	Profils pour les valeurs prédites et la fonction de désirabilité de poudre des racines de <i>Smilax aspera</i>	26

Liste des tableaux

Tableau I :	Classifications botaniques de <i>Smilax aspera</i>	3
Tableau II :	Principaux constituants chimiques de <i>Smilax aspera</i>	5
Tableau III :	Domaine de variation des paramètres pour le plan de Box-Behnken pour les essais sur feuilles	11
Tableau IV :	Domaine de variation des paramètres pour le plan de Box-Behnken pour les essais sur racines	12
Tableau V :	La matrice d'expérience donnée par le plan BBD (cas des feuilles)	12
Tableau VI :	La matrice d'expérience donnée par le plan BBD (cas des racines)	13
Tableau VII :	Matrice d'essais et de valeurs expérimentales et calculées pour le CPT et le DPPH des feuilles de <i>Smilax aspera</i>	18
Tableau VIII :	Estimation des paramètres des modèles CPT et DPPH pour les feuilles	19
Tableau IX :	Matrice d'essais et de valeurs expérimentales et calculées pour le CPT et le DPPH des racines de <i>Smilax aspera</i>	21
Tableau X :	Estimation des paramètres des modèles CPT et DPPH pour les racines	22
Tableau XI :	Conditions optimales d'extraction, valeurs prédites et résultats expérimentaux pour le CPT et le DPPH des feuilles de <i>Smilax aspera</i>	25
Tableau XII :	Conditions optimales d'extraction, valeurs prédites et résultats expérimentaux pour le CPT et le DPPH des racines de <i>Smilax aspera</i>	27
Tableau XIII :	Teneurs totales en polyphénols des racines et des feuilles de <i>S. aspera</i>	27
Tableau XIV :	Teneur totale en flavonoïdes et flavonols	28
Tableau XV :	Résultats des dosages phytochimiques de l'extrait des feuilles et racines de <i>Smilax aspera</i>	29
Tableau XVI :	Pouvoir réducteur des extraits de feuilles et de racines de <i>Smilax aspera</i>	29

INTRODUCTION

Introduction

Les traditions thérapeutiques des plantes sont profondément ancrées dans toutes les cultures. Depuis les temps anciens, les plantes ont été employées comme remèdes pour traiter de nombreuses maladies, et les individus de tous les continents, notamment en Afrique, ont cette tradition ancestrale (Abd El-Ghani, 2016). Elles renferment des combinaisons de divers composés phytochimiques, qui peuvent agir de manière individuelle, additive ou en synergie afin d'améliorer la santé.

Les polyphénols sont des composés bioactifs largement connus pour leurs propriétés antioxydantes et leurs avantages pour la santé. On les retrouve dans différentes plantes, y compris *Smilax aspera*. Ces substances attirent de plus en plus l'attention dans les secteurs de l'alimentation, de la pharmacie et de la cosmétique en raison de leurs effets positifs sur la santé humaine. Toutefois, il demeure un défi de les extraire de manière efficace à partir de sources végétales, ce qui demande des méthodes novatrices et optimisées (Scalbert et al., 2005).

Le processus d'oxydation, provoqué par les radicaux libres, a un impact sur l'organisme humain ainsi que sur les divers groupes alimentaires existants. Il peut y avoir un déséquilibre dans la balance entre les oxydants et les antioxydants, causé par une production excessive de radicaux libres ou une diminution des défenses antioxydantes (Durante et al., 2006).

L'amélioration du rendement et de la qualité des extraits polyphénoliques nécessite une optimisation des paramètres opérationnels tels que la puissance ultrasonique, le temps d'exposition et la concentration en éthanol.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux de *Smilax aspera* par ultrasons.

Le plan de travail adopté pour cette étude est subdivisé en deux grandes parties : la première est une synthèse bibliographique présentant des généralités sur la plante étudiée, à savoir *Smilax aspera*, son utilisation et sa composition, suivie d'un aperçu sur les polyphénols, et enfin quelques notions de base sur les plans d'expériences. La deuxième partie expérimentale décrit la méthodologie utilisée pour optimiser l'extraction des composés phénoliques. Enfin, le dernier volet expose les résultats de l'optimisation de l'extraction ainsi que l'activité antioxydante des extraits optimisés.

Synthèse Bibliographique

I Généralités sur la plante : *Smilax aspera*

I.1 Description botanique

La Salsepareille d'Europe est une liane vivace mesurant ou dépassant 1 mètre de hauteur, et pouvant atteindre jusqu'à 6 mètres (figure 1). Son port est rampant ou grimpant, et elle est très ramifiée. Elle se propage principalement par rhizomes, car la plante est très robuste et peut repousser à partir de ses rhizomes après avoir été coupée ou ravagée par les incendies (Ghédira & Goetz, 2016).

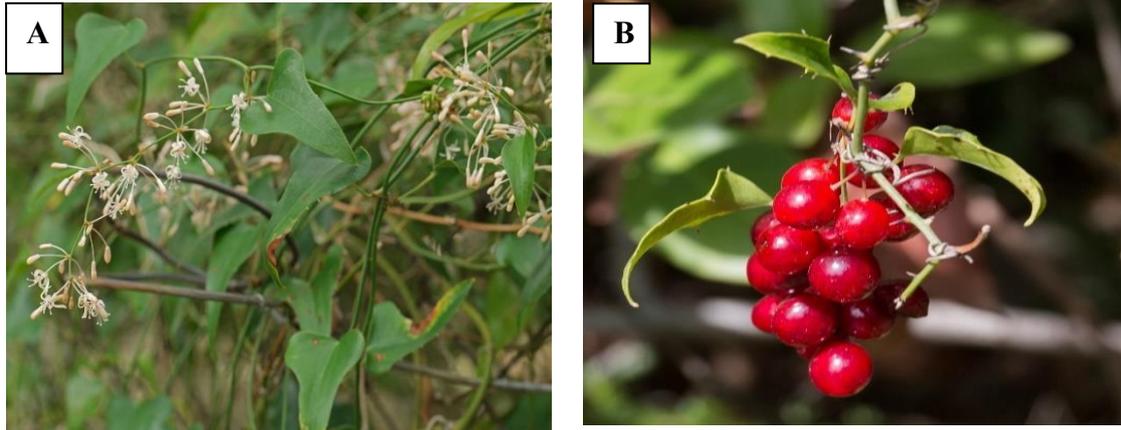


Figure 1 : Photographies des feuilles, fleurs (A) et Baies rougeâtres de *Smilax Aspera* (B)

(Frau-Doktor., 2024)

I.2 Classification botanique

La classification botanique de la salsepareille est résumée dans le tableau I.

Tableau I : Classifications botanique de *Smilax Aspera*

Règne	<i>Plantae</i>
Superdivision	Embryophytes
Division	Trachéophytes
Subdivision	Spermatophyte
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	Liliales
Famille	Smilacacées
Genre	<i>Smilax</i>
Espèce	<i>Smilax aspera</i> L.

I.3 Distribution géographique

Smilax aspera est présente dans quatre régions du monde : sur l'ensemble du pourtour de la mer Méditerranée (incluant par extension la Macaronésie), en Afrique de l'Est, au Moyen-Orient, ainsi qu'en Asie du Sud, comme l'illustre la figure 2.

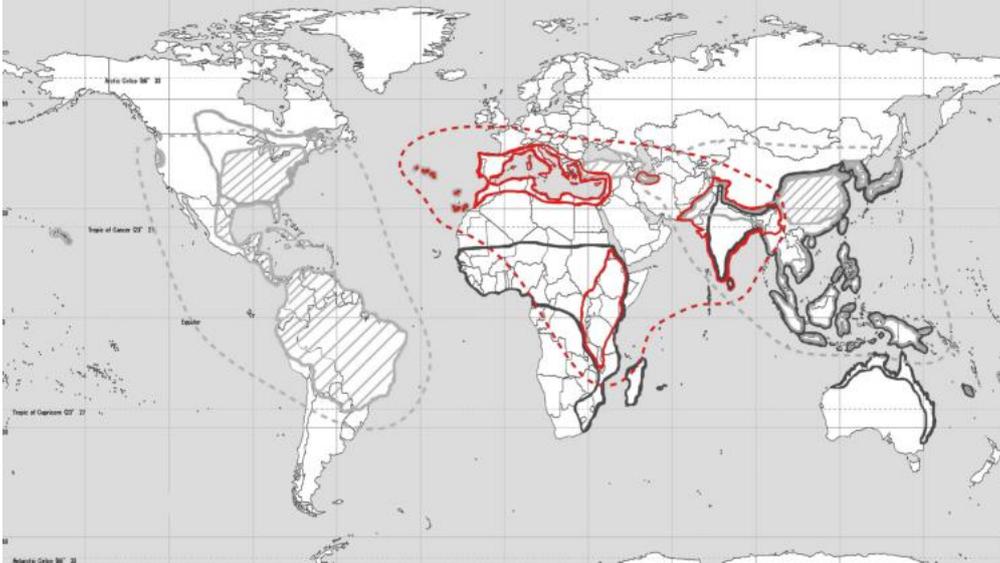


Figure 2 : Distribution géographique mondiale de *Smilax aspera* L d'après (Qi et al., 2013)

Les traits pleins rouges indiquent l'aire de répartition de *Smilax aspera*. Les autres traits pleins en gris correspondent à d'autres lignées génétiques.

I.4 Compositions chimiques

Le *Smilax Aspera* contient une variété de composés chimiques, notamment :

I.4.1 Glycosides

Les glycosides sont des molécules composées d'une partie sucrée (glycose) liée à une partie non sucrière. Dans le cas de cette espèce, les glycosides sont responsables de ses propriétés médicinales.

I.4.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules flavoniques qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Ils sont présents dans les feuilles et les tiges de *Smilax aspera*.

I.4.3 Saponines

Les saponines sont des molécules amphiphiles qui ont des propriétés surfactantes et des effets anti-inflammatoires. Elles sont présentes dans les racines de *Smilax aspera*.

I.4.4 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules alcalines ayant des propriétés médicinales variées. Dans le cas de *Smilax aspera*, ces molécules sont responsables de ses propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques.

Les principaux constituants chimiques recensés au niveau de *Smilax aspera* sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Principaux constituants chimiques des feuilles *Smilax Aspera* (Ghédira & Goetz, 2016)

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques individuels
Les saponines de structure stéroïdique	curilline G, asperagoside E, asparoside A,
Phénols	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Smiglabrone A, smiglabrone B, smilachromanone, smiglastilbene, smiglactone, smiglabrol ➤ Resvératrol ➤ (+) catéchine et (-) épicatechine
Anthocyanosides	élargonidine 3-O-rutinoside, cyanidine 3-Orutinoside
Caroténoïdes	β-carotène, β-cryptoxanthine
Phytostérols	Alpha- et bêtasitostérols, stigmastérol
Acides gras	Acides palmitique, stéarique, linoléique
Sels minéraux	Sels de K (1,25 %), Ca et Mg (0,3 à 0,4 %)
Autres	Acide sarsapique, acide ascorbique

I.5 Utilisations de la plante étudiée

Le rhizome de *Smilax aspera* est riche en saponines, en trans-resvératrol et en anthocyanines. Il renferme des propriétés dépuratives, diaphorétiques, diurétiques, stimulantes et toniques. La médecine traditionnelle l'utilise également pour ajouter des saveurs aux boissons et aux liqueurs (Ivanova, 2011).

II Les composés phénoliques et l'activité antioxydante

II.1 Les composés phénoliques

II.1.1 Définition

Les polyphénols (8 000 composés identifiés) constituent un ensemble de métabolites secondaires complexes, exclusivement fabriqués dans les plantes. Selon Silva & Pogačnik (2020), le phénol est un micronutriment naturel qui se trouve dans de nombreuses sources alimentaires. On le distingue par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques qui possèdent une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH). Les polyphénols sont des antioxydants naturels qui agissent comme une barrière contre le stress oxydatif dû aux espèces réactives d'oxygène. Ils sont classés en deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (D Archivio et al., 2007).

II.1.2 Propriétés des polyphénols

Les chercheurs et les industriels s'intéressent de plus en plus aux polyphénols en raison de leur importance et de leurs nombreux effets positifs sur la santé. Les flavonoïdes, en particulier, présentent des propriétés préventives contre les maladies et sont des composants sûrs, avec une action biologique très variée (Edeas, 2007).

II.1.2.1 Utilisations alimentaires

Les polyphénols, molécules antioxydantes naturelles, présentent un intérêt pour la conservation des aliments, offrant ainsi une alternative aux conservateurs artificiels. Ils sont essentiels pour définir les caractéristiques sensorielles. Outre leur influence sur la couleur et l'arôme, ils jouent un rôle crucial dans l'évaluation du goût, en particulier dans la perception de l'astringence et de l'acidité (Shahidi, 2003)

II.1.2.2 Propriétés médicales

Les infections et les parasites constituent un enjeu majeur pour la santé publique. En raison de leur fréquence et de leur gravité, les polyphénols jouent un rôle crucial dans la prévention des maladies dégénératives, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires, ainsi que dans les maladies inflammatoires et neurodégénératives. Les flavonoïdes sont donc reconnus pour leur effet anti-allergique (Remila et al., 2015).

II.1.2.3 Propriété antioxydante

On considère les polyphénols comme des molécules « signal » qui pourraient favoriser les défenses antioxydantes, d'une part en inhibant les activités enzymatiques pro-oxydantes, et d'autre part en modulant les voies de signalisation intracellulaires régulant l'expression des

enzymes antioxydantes. Ils sont sensibles à une multitude de protéines, y compris certaines enzymes et récepteurs (Ghédira & Goetz, 2016)

II.2 Les antioxydants

II.2.1 Définition

Un antioxydant est une substance présente à de faibles concentrations qui retarde ou empêche considérablement l'oxydation du substrat oxydable. Les antioxydants sont efficaces car ils peuvent donner leurs propres électrons aux ROS et ainsi neutraliser les effets néfastes de ces derniers.

II.2.2 Les antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes, selon Haleng (2007), regroupent les antioxydants enzymatiques, les protéines et les systèmes de réparation des dommages oxydatifs, tels que les endonucléases.

II.2.3 Les antioxydants enzymatiques

L'organisme utilise diverses enzymes pour combattre les radicaux libres et prévenir les dommages causés par ces derniers. Les superoxydes dismutases (SOD), qui sont des métalloprotéines, jouent un rôle essentiel dans la défense contre le stress oxydant en éliminant l'anion superoxyde (O_2^-) (Haleng, 2007)

II.2.4 Les antioxydants exogènes

Les composés antioxydants d'origine exogène, c'est-à-dire alimentaire, incluent les vitamines A, C et E ; les caroténoïdes comme le lycopène et la lutéine ; la taurine ; les polyphénols ; ainsi que certains minéraux et oligoéléments comme le magnésium, le zinc, le sélénium et le manganèse. Ces systèmes antioxydants interviennent en protégeant les cellules des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (Pastre & Priymenko, 2007)

II.2.5 Les antioxydants non enzymatiques métaboliques

Ce sont des substances résultant du métabolisme interne de l'organisme. Les AA jouent un rôle essentiel dans la neutralisation et la prévention du stress oxydatif (Pastre & Priymenko, 2007).

III Plans d'expérience

III.1 Définition

Un plan d'expériences, ou Design of Experiments (DoE), est une méthode systématique de planification et d'organisation des expériences scientifiques et industrielles. Son objectif est de maximiser les informations obtenues avec un minimum d'expérimentations (Tinsson, 2010), en fonction des objectifs fixés. Les plans d'expériences sont largement utilisés dans divers domaines scientifiques tels que l'agronomie, la biologie, le calcul numérique et la chimie. Un plan d'expérience se compose d'une série de combinaisons entre les différents niveaux de facteurs à tester (essais élémentaires), créant ainsi une structure de données optimale pour obtenir un modèle statistiquement de qualité.

La compréhension de la méthode des plans d'expérience repose sur deux notions essentielles (Tinsson, 2010)

- Espace expérimental
- Modélisation mathématique des grandeurs étudiées

III.2 Types de plans

Selon Montgomery, 2017 et Box, 2005

Il existe différents types de modèles expérimentaux, répartis en deux grandes familles.

La première série est Screening Design, qui comprend :

- Un plan factoriel partiel
- Un plan sursaturé
- Un plan factoriel complet.

Ces modèles sont conçus pour identifier les facteurs les plus influents parmi un grand nombre de variables. La deuxième famille est le Modeling Design, qui comprend :

- Le plan non conventionnel,
- Le plan composite central,
- Le plan de Doehlert,
- Le plan de Box-Behnken,

III.3 Plan de Box-Behnken

Le modèle de Box-Behnken est un modèle d'expériences qui permet d'améliorer les conditions expérimentales et d'adapter des modèles quadratiques. En tant que membre des méthodologies de surfaces de réponse (Response Surface Methodology, RSM), il convient particulièrement à

l'analyse des liens entre plusieurs variables indépendantes et une ou plusieurs réponses dépendantes (Box, 2005).

Donc un plan de Box-Behnken à trois facteurs possède $12 + 3$ essais, soit 15 essais. On pourra remarquer qu'avec 4 points au centre au lieu de 3, on obtient un plan qui répond au critère de presque-orthogonalité.(Goupy & Creighton, 2006)

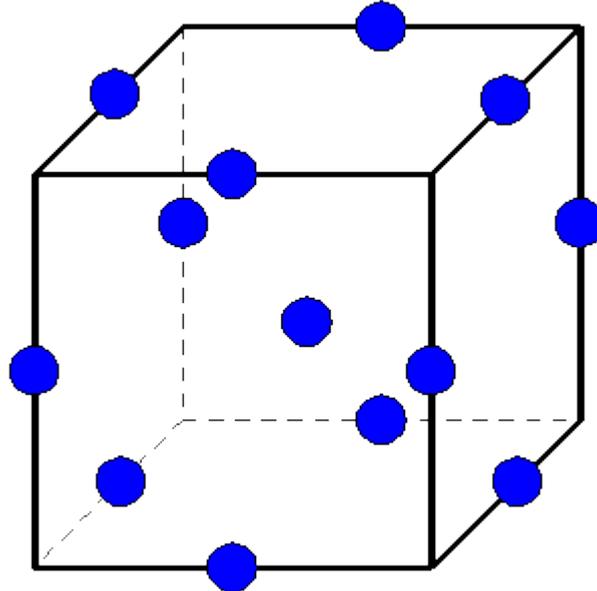


Figure 3 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs (researchgate, s.d.)

III.3.1 Caractéristiques

Selon Box, 2005 et Montgomery, 2017

Le plan de Box-Behnken optimise les combinaisons des niveaux de facteurs en plaçant les points expérimentaux au centre des arêtes et dans le cube formé par ces niveaux. Il permet de réduire le nombre d'essais par rapport à un plan factoriel complet tout en offrant des données suffisantes pour analyser les effets principaux, les interactions et les termes quadratiques. Ce plan est à la fois efficace et économique, ce qui le rend idéal pour les études d'optimisation.

III.3.2 Avantages du Plan

Réduction de la quantité d'expériences : Selon le plan de Box-Behnken, le nombre d'essais nécessaires est considérablement réduit par rapport à un plan factoriel complet, ce qui est particulièrement avantageux en cas de ressources limitées. L'efficacité de ce plan pour les modèles quadratiques est remarquable, ce qui en fait un choix idéal pour les études d'optimisation de processus (Box, 2005) (Wu & Hamada, 2011).

Matériel et Méthodes

I Matériel végétal

L'étude est réalisée sur les feuilles et les racines de *Smilax aspera* cueillies au mois de mars 2024 dans la région de Sidi Ayad, située à 45 KM de la wilaya de Béjaïa, où cette plante pousse à l'état sauvage (figure 4).



Figure 4 : Carte de localisation géographique du lieu de récolte de *Smilax aspera*

I.1 Séchage

Après la récolte, les feuilles et les racines ont été soigneusement nettoyées et lavées à l'eau courante pour se débarrasser de toute poussière et de matières étrangères, comme le sable, le sol et d'autres impuretés. Une fois lavées et nettoyées, les échantillons sont séchés à l'étuve à une température de 40 °C pendant quelques jours jusqu'à stabilisation de leur poids, afin d'uniformiser le taux d'humidité et de faciliter le broyage pour améliorer l'extraction.

I.2 Broyage

Les feuilles et les racines ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine, puis tamisées à l'aide d'un tamis d'un diamètre inférieur à 500 μm (figure 5). La poudre récupérée est ensuite conservée dans des boîtes en plastique au réfrigérateur jusqu'à son utilisation ultérieure.



Figure 5 : Poudres des racines et des feuilles de *S. aspera* (Photo original)

II Optimisation d'extraction des composés phénoliques par ultrasons

L'extraction par ultrasons implique le traitement d'un solide, qu'il soit sec ou humide, en contact avec un solvant à l'aide d'une sonde ultrasonique. L'effet des ultrasons engendre la formation de bulles de cavitation dans le solvant, ce qui entraîne une dégradation de la paroi des cellules végétales. Grâce aux ultrasons, l'extraction peut être accélérée et le rapport solvant/soluté réduit, ce qui améliore l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs.

II.1 Application du plan de Box-Behnken

Après avoir choisi les paramètres d'extraction, l'optimisation a été réalisée à l'aide d'un plan factoriel complet à trois facteurs (X_1 , X_2 , X_3), et à trois niveaux (-1, 0, +1), qui est appliqué pour étudier l'influence de ces paramètres sur le taux d'extraction des polyphénols. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont représentés dans les tableaux III et IV.

Tableau III : Domaine de variation des paramètres pour le plan de Box-Behnken pour les essais sur feuilles

Variables	Niveau bas (-1)	Niveau centré (0)	Niveau haut (+1)
X_1 : Concentration du solvant (%)	20	60	100
X_2 : Temps (min)	0,5	5,0	9,5
X_3 : Amplitude (%)	20	60	100

Tableau IV : Domaine de variation des paramètres pour le plan de Box-Behnken pour les essais sur racines

Variables	Niveau bas (-1)	Niveau centré (0)	Niveau haut (+1)
X₁ : Concentration du solvant (%)	20	60	100
X₂ : Temps (min)	1	8	15
X₃ : Amplitude (%)	20	60	100

Le modèle mathématique polynomial développé pour l'optimisation est un modèle du second degré, et les matrices d'expérience du plan Box-Behnken sont présentées dans les tableaux V et VI.

Tableau V : La matrice d'expérience donnée par le plan BBD (cas des feuilles)

N° d'essai	Solvant	Amplitude	Temps
1	100	100	5
2	100	60	9,5
3	100	60	0,5
4	100	20	5
5	60	100	0,5
6	60	100	9,5
7	60	60	5
8	60	60	5
9	60	60	5
10	60	20	0,5
11	60	20	9,5
12	20	100	5
13	20	60	0,5
14	20	60	9,5
15	20	20	5

Tableau VI : La matrice d'expérience donnée par le plan BBD (cas des racines)

N° d'essai	Solvant	Amplitude	Temps
1	100	100	8
2	100	60	15
3	100	60	1
4	100	20	8
5	60	100	1
6	60	100	15
7	60	60	8
8	60	60	8
9	60	60	8
10	60	20	1
11	60	20	15
12	20	100	8
13	20	60	1
14	20	60	15
15	20	20	8

II.2 Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, décrite par Rossi & Singleton, 1966.

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot & Charpentier, 2006) Un volume de 200 μ l d'extrait est additionné de 750 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu et de 400 μ l de carbonate de sodium (7,5 %). L'absorbance est mesurée à 720 nm après 60 minutes d'incubation. Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide gallique (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/100g MS.

II.3 Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes totaux a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe stable entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika, 2005).

Cette quantification est réalisée en mélangeant 500 μ l d'extrait dilué avec 500 μ l d' AlCl_3 à 2 %. Après 15 minutes d'incubation, la densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.4 Dosage des anthocyane et flavanols

Les concentrations en anthocyanines et en flavanols des extraits étudiés (feuille et racine) sont déterminées en utilisant la méthode décrite par Djeridane et al., 2006. Pour quantifier les anthocyanines, il est nécessaire d'ajouter 900 μ l d'extrait à 900 μ l de méthanol-HCl (0,1 N). La mesure de l'absorbance à 530 nm permet de quantifier la couleur rouge des anthocyanines en milieu acide. La loi de Beer-Lambert permet de déterminer la quantité d'anthocyanines en se basant sur le coefficient d'extinction molaire de la cyanidine 3-glucoside (PM = 449,2g/mol ; ϵ = 26900l.mol⁻¹.cm⁻¹). Les résultats sont exprimés en mg de cyanidine 3-glucoside (ECyG)/100g deMS.

Les teneurs en flavonols sont déterminées par spectrophotométrie à 360 nm ; les concentrations sont calculées selon la loi de Beer-Lambert en utilisant la quercétine 3-glucoside comme standard (PM = 464,38g/mol ; ϵ = 20000l.mol⁻¹.cm⁻¹). Les teneurs sont exprimées en mg équivalent quercétine 3-glucoside (EQG)/100g MS.

II.5 Dosage des proanthocyanidines

On évalue la quantité de proanthocyanidines en utilisant la méthode décrite par Škerget et al., 2005. On ajoute 0,5 ml d'extrait à 2 ml du réactif butanol-HCl (77 mg de FeSO_4 dissous dans 500 ml de HCl-butanol dans un rapport de 2:3). Le mélange est incubé à 95 °C pendant 15 minutes. Les proanthocyanidines se dissocient lorsqu'elles sont chauffées dans un milieu acide, entraînant une coloration absorbante à 530 nm. La loi de Beer-Lambert est utilisée pour calculer les résultats en utilisant la cyanidine comme standard (PM = 287,24g/mol ; ϵ = 34700l.mol⁻¹.cm⁻¹). Les concentrations sont mesurées en mg EC/100g MS.

II.6 Dosage des chlorophylles et caroténoïdes

Les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylles des feuilles et racines de *Smilax aspera* sont déterminées selon la méthode décrite par Wellburn, 1994. L'extraction est réalisée en mélangeant 400 μ g de poudre avec 10 ml d'éther diéthylique, suivie d'une agitation magnétique

de 30 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 5000 tours par minute (tpm) pendant 10 minutes. Enfin, l'absorbance est mesurée à différentes longueurs d'onde : 470, 644 et 662 nm. Les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylles a et b des extraits sont déterminées selon les formules suivantes, et les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/100$ g de matière sèche (MS) :

- **Chlorophylle a** (Chl.a en $\mu\text{g}/\text{L}$) = $10,05 A_{662} - 0,776 A_{644}$
- **Chlorophylle b** (Chl.b en $\mu\text{g}/\text{L}$) = $16,37 A_{644} - 3,14 A_{662}$
- **Caroténoïdes** (mg/L) = $1000 A_{470} - 1,28 \text{ Chl.a} - 56,7 \text{ Chl.b}/230$

III Activité antioxydante

III.1 Activité de piégeage du radical DPPH

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune (Shimada et al., 1992). Pour l'évaluation, un volume de 200 μl d'extraits à différentes concentrations est ajouté à 1000 μl de la solution méthanolique de DPPH. Le mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes, après quoi l'absorbance est mesurée à 517 nm. La décoloration de la solution est quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre à cette longueur d'onde. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (EAG) par 100 g de matière sèche (MS), en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe 2).

III.2 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est évalué selon la méthode décrite par Yıldırım et al., 2001. À 1 ml d'extrait, on ajoute 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 mol/l, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1 %). Après une incubation à 50 °C pendant 20 minutes, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %) sont ajoutés au mélange. Ensuite, 2,5 ml de ce mélange sont transférés dans un tube à essai, suivis de l'ajout de 2,5 ml d'eau distillée et de 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1 %). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Les résultats sont déterminés en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (voir Annexe, figure 7) et sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (EAG) par 100 g de matière sèche (MS).

IV Analyse statistique

Les mesures ont été réalisées en triplicata ($n = 3$) et les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. Les résultats expérimentaux du plan de Box-Behnken, ainsi que la création des graphiques, ont été analysés à l'aide du logiciel JMP Pro 10 (version 10.0, SAS Institute Inc.). Un niveau de signification de $P < 0,05$ a été retenu.

Résultats et Discussion

I Résultats et Discussion

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 & Morsy, 2019). Le but de la présente étude est l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles et racines de *S. aspera*, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses, modèle Box-Behnken. Trois paramètres ont été étudiés : le temps d'extraction (min), la puissance ultrasonique (%), concentration d'éthanol (%).

I.1 Analyse des résultats

Avant de procéder à l'optimisation, une analyse préliminaire a été effectuée pour pouvoir établir les effets des facteurs étudiés et fixer les intervalles à explorer pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques par le plan d'expérience. Cette étape a été réalisée en suivant le modèle classique, qui consiste à faire varier un seul paramètre et fixer les autres. La réponse suivie dans cette étape est la mesure des teneurs en composés phénoliques.

Le choix de la concentration d'éthanol adéquate est déterminé selon la teneur en polyphénols totaux extraite. Puis, on joue sur l'amplitude en gardant les mêmes conditions, et de la même façon on détermine la meilleure concentration et la meilleure amplitude. Après avoir identifié les paramètres précédents, le temps et l'amplitude pour l'extraction ont été déterminés.

Les résultats de l'analyse des effets de ces facteurs ainsi que leurs interactions sur le taux des CPT ont été examinés par BBD. Quinze extractions ont été réalisées et les trois facteurs étudiés ainsi que leurs trois niveaux sont comme suit :

- Facteur 1 (X_1) : Concentrations en éthanol (20, 60 et 100%)
- Facteur 2 (X_2) : Amplitude des ultrasons (20, 60 et 100%)
- Facteur 3 (X_3) : Temps d'extraction feuilles (0.5, 5 et 9.5min) et racines (1, 8 et 15min)

I.2 Cas des feuilles de *S. aspera*

Les résultats de cette analyse sont compilés dans le tableau VII. D'après les résultats obtenus par le BBD, des variations considérables dans les teneurs en composés phénoliques, allant de

8,04 à 30,86 mg EAG/g PS, ainsi que dans le DPPH (1,86 et 10,66 mg EAG/g PS) ont été observées. Cela montre l'influence significative des facteurs sur le rendement d'extraction de ces composés bioactifs des feuilles. Ces résultats expérimentaux sont étroitement proches des valeurs prédites.

Tableau VII : Matrice d'essais et de valeurs expérimentales et calculées pour le CPT et le DPPH des feuilles de *Smilax aspera*

N°	Variables			Valeurs expérimentales		Valeurs prédites	
	x_1	x_2	x_3	CPT	DPPH	CPT	DPPH
1	100	100	5	18.02	5.53	19.04	5.72
2	100	60	9.5	14.80	4.68	13.06	4.04
3	100	60	0.5	8.04	1.86	9.82	2.47
4	100	20	5	11.91	2.00	10.86	1.85
5	60	100	0.5	22.35	7.57	19.56	6.77
6	60	100	9.5	30.86	10.66	31.59	11.12
7	60	60	5	27.80	9.71	28.35	9.74
8	60	60	5	28.25	9.60	28.35	9.74
9	60	60	5	29.01	9.92	28.35	9.74
10	60	20	0.5	14.71	5.28	13.98	4.82
11	60	20	9.5	11.48	4.15	14.28	4.95
12	20	100	5	32.51	9.70	33.56	9.86
13	20	60	0.5	16.40	5.10	18.15	5.75
14	20	60	9.5	29.02	9.28	27.24	8.66
15	20	20	5	19.86	5.80	18.85	5.61

x_1 , concentration d'éthanol (%) ; x_2 , amplitude des ultrasons (%) ; x_3 , Temps (min) ; CPT, composés phénoliques totaux (mg EAG/g PS) ; DPPH, activité de piégeage des radicaux libres DPPH (mg EAG/g PS).

I.2.1 Estimation des coefficients

Les valeurs P ont été utilisées comme mesure pour vérifier la signification de chaque coefficient. Lorsque P est faible, le coefficient correspondant est plus significatif (Bey et al., 2013). Le tableau VIII récapitule les coefficients de régression du modèle de prédiction des CPT et du DPPH pour les feuilles.

Tableau VIII : Estimation des paramètres des modèles CPT et DPPH pour les feuilles.

Terme	Coefficient	SE	t-Ratio	Prob> t
Composés phénoliques totaux (mg EAG/g PS)				
Constante	28.353	1.509	18.790	<0,0001 *
Linéaire				
x_1	-5.628	0.924	-6.090	0.0017*
x_2	5.722	0.924	6.190	0.0016*
x_3	3.083	0.924	3.340	0.0206*
Interaction				
$x_1 * x_2$	-1.634	1.307	-1.250	0.2663
$x_1 * x_3$	-1.465	1.307	-1.120	0.3132
$x_2 * x_3$	2.933	1.307	2.240	0.0748
Quadratique				
$x_1 * x_1$	-5.281	1.360	-3.880	0.0116*
$x_2 * x_2$	-2.495	1.360	-1.830	0.126*
$x_3 * x_3$	-6.006	1.360	-4.420	0.0069*
DPPH (mg EAG/g PS)				
Constante	9.743	0.482	20.22	<0,0001 *
Linéaire				
x_1	-1.976	0.295	-6.7	0.0011*
x_2	2.030	0.295	6.88	0.001*
x_3	1.120	0.295	3.8	0.0127*
Interaction				
$x_1 * x_2$	-0.092	0.417	-0.22	0.8342
$x_1 * x_3$	-0.337	0.417	-0.81	0.4555
$x_2 * x_3$	1.056	0.417	2.53	0.0525
Quadratique				
$x_1 * x_1$	-2.835	0.434	-6.53	0.0013*
$x_2 * x_2$	-1.147	0.434	-2.64	0.0459*
$x_3 * x_3$	-1.680	0.434	-3.87	0.0118*

x_1 , Concentration d'éthanol (%) ; x_2 , amplitude des ultrasons (%) ; x_3 , Temps (min) ; SE, erreur standard;

* Valeurs statistiquement significatives ($p < 0,05$).

1. Effets Linéaires

- **Concentration d'éthanol (x_1)** : Le coefficient négatif et significatif dans les deux modèles ($p < 0.05$) indique que l'augmentation de la concentration d'éthanol réduit à la fois la teneur en phénols et l'activité antioxydante.
- **Amplitude des ultrasons (x_2)** : Le coefficient positif et significatif indique que l'augmentation de l'amplitude des ultrasons favorise l'extraction des composés phénoliques et des antioxydants.
- **Temps (x_3)** : De manière similaire, le temps d'exposition (x_3) a un effet positif et significatif, indiquant que des temps d'extraction plus longs sont bénéfiques pour maximiser la teneur en phénols et l'activité antioxydante.

2. Interactions

Les interactions entre les facteurs ($x_1 * x_2$ et $x_1 * x_3$ et $x_2 * x_3$) n'ont pas montré d'effets significatifs ($p > 0.05$). Cela suggère que les interactions entre ces facteurs n'influencent pas les réponses, et que les effets individuels des variables sont les principaux contributeurs.

3. Effets Quadratiques

Les effets quadratiques ($x_1 * x_1$, $x_2 * x_2$ et $x_3 * x_3$) sont significatifs dans les deux modèles, Concentration d'éthanol - Concentration d'éthanol ($x_1 * x_1$) avec une avec une probabilité de 0.0116 et même sur l'activité antioxydante avec une probabilité de 0.0013 et Amplitude ultrasons- Amplitude ultrasons ($x_2 * x_2$) est également significatif avec une avec une probabilité de 0.126 et de 0.0459 même Temps- Temps ($x_3 * x_3$) avec une avec une probabilité 0.0069 et 0.0118.

I.3 Cas des racines de *S. aspera*

D'après les résultats obtenus par le BBD (Tableau IX), des variations importantes dans les teneurs en composés phénoliques (2.10 à 8.62 mg EAG/g PS) ainsi que dans le DPPH allant de 10.43 et 3.40 mg EAG/g PS, ont été enregistrées. Cela montre l'effet significative des facteurs optimisés sur les CPT et l'activité antioxydante des racines. Les résultats expérimentaux montrent une adéquation très élevée avec les données calculées.

Tableau IX : Matrice d'essais et de valeurs expérimentales et calculées pour le CPT et le DPPH des racines de *Smilax aspera*

N°	Variables			Expérimental		Prédit	
	x_1	x_2	x_3	CPT	DPPH	CPT	DPPH
1	100	100	8	5.12	1.95	5.34	2.03
2	100	60	15	3.63	1.23	3.92	1.36
3	100	60	1	3.29	0.83	3.05	0.79
4	100	20	8	2.10	0.43	1.84	0.25
5	60	100	1	4.95	1.97	4.98	1.93
6	60	100	15	8.62	3.40	8.11	3.19
7	60	60	8	8.23	3.36	7.26	2.97
8	60	60	8	6.51	2.70	7.26	2.97
9	60	60	8	7.05	2.85	7.26	2.97
10	60	20	1	2.54	1.05	3.05	1.27
11	60	20	15	3.20	1.15	3.17	1.20
12	20	100	8	6.82	2.05	7.09	2.23
13	20	60	1	4.40	1.55	4.11	1.42
14	20	60	15	6.25	2.00	6.49	2.04
15	20	20	8	3.94	1.44	3.72	1.36

x_1 , concentration d'éthanol (%) ; x_2 , amplitude des ultrasons (%) ; x_3 , Temps (min) ; CPT, composés phénoliques totaux (mg EAG/g PS) ; DPPH, activité de piégeage des radicaux libres DPPH (mg EAG/g PS).

I.3.1 Estimation des coefficients

Les valeurs P ont été utilisées comme mesure pour vérifier la signification de chaque coefficient. Lorsque P est faible le coefficient correspondant est plus significatif et l'effet d'interaction est grand (Bey et al., 2013). Le tableau X récapitule les coefficients de régression du model de prédiction des CPT et de DPPH pour les racines.

Tableau X : Estimation des paramètres des modèles CPT et DPPH pour les racines

Terme	Coefficient	SE	t-Ratio	Prob> t
Composés phénoliques totaux (mg EAG/g PS)				
Constante	7.263	0.416	17.48	<0,0001 *
Linéaire				
x_1	-0.909	0.254	-3.57	0.016*
x_2	1.716	0.254	6.74	0.0011*
x_3	0.815	0.254	3.2	0.0239*
Interaction				
x_1 - x_2	0.035	0.360	0.1	0.9263
x_1 - x_3	-0.378	0.360	-1.05	0.3422
x_2 - x_3	0.753	0.360	2.09	0.0908
Quadratique				
$x_1^* x_1$	-1.602	0.375	-4.28	0.0079*
$x_2^* x_2$	-1.167	0.375	-3.11	0.0264*
$x_3^* x_3$	-1.269	0.375	-3.39	0.0195*
DPPH (mg EAG/g PS)				
Constante	2.97	0.173292	17.14	<0,0001 *
Linéaire				
x_1	-0.325	0.106119	-3.06	0.028*
x_2	0.6625	0.106119	6.24	0.0015*
x_3	0.2975	0.106119	2.8	0.0378*
Interaction				
x_1 - x_2	0.2275	0.150075	1.52	0.19
x_1 - x_3	-0.0125	0.150075	-0.08	0.9369
x_2 - x_3	0.3325	0.150075	2.22	0.0776
Quadratique				
$x_1^* x_1$	-0.99625	0.156203	-6.38	0.0014*
$x_2^* x_2$	-0.50625	0.156203	-3.24	0.0229*
$x_3^* x_3$	-0.57125	0.156203	-3.66	0.0146*

x_1 , concentration d'éthanol (%) ; x_2 , amplitude des ultrasons (%) ; x_3 , Temps (min) ; SE, erreur standard ; * Valeurs statistiquement significatives ($p < 0,05$).

1. Effets Linéaires

- **Concentration d'éthanol (x_1)** : Le coefficient négatif et significatif ($p < 0.05$) indique que l'augmentation de la concentration d'éthanol réduit la teneur en phénols avec une probabilité de 0.016 et même sur l'activité antioxydante avec une probabilité de 0.028.
- **Amplitude des ultrasons (x_2)** : Le coefficient positif et significatif montre que l'augmentation de l'amplitude des ultrasons améliore l'extraction des composés phénoliques et des antioxydants avec une probabilité de 0.0011 et même sur l'activité antioxydante avec une probabilité de 0.0015.
- **Temps (x_3)** : Le coefficient positif et significatif indique que des temps d'extraction plus longs sont bénéfiques pour maximiser la teneur en phénols et l'activité antioxydante avec une probabilité de 0.0239 et même sur l'activité antioxydante avec une probabilité de 0.0378.

2. Effet d'interaction

Toutes les interactions entre les trois facteurs ($x_1 * x_2$, $x_1 * x_3$, et $x_2 * x_3$) ne sont pas significatives ($p > 0.05$).

3. Effets Quadratiques

Les effets quadratiques ($x_1 * x_1$, $x_2 * x_2$, $x_3 * x_3$) sont significatifs avec des coefficients négatifs, indiquant une relation non linéaire, influencent significativement sur le taux des polyphénols extraits, avec des probabilités de 0.0079 et 0.0264 et 0.0195 et même sur l'activité antioxydante avec des probabilités de 0.0014 et 0.022 et 0.0146, respectivement.

II Modèles mathématiques

Dans un système impliquant trois facteurs indépendants X_1 , X_2 et X_3 , la relation mathématique quadratique de la réponse sur ces variables peut être approximée par l'équation polynomiale de second degré (Annadurai & Sheeja, 1998). Les modèles mathématiques de la teneur en phénols et l'activité antioxydante (DPPH) sont établis sur la base des coefficients des constantes, linéaires, interactions, quadratiques déterminés dans l'analyse des effets.

1. Modèles mathématiques pour l'extrait des antioxydants des feuilles de *S.aspera* :

$$y_{CPT} = 28.353 - 5.628x_1 + 5.722x_2 + 3.083x_3 - 1.634x_1x_2 - 1.465x_1x_3 + 2.933x_2x_3 - 5.281x_1^2 - 2.495x_2^2 - 6.006x_3^2$$

$$y_{DPPH} = 9.743 - 1.976x_1 + 2.030x_2 + 1.120x_3 - 0.092x_1x_2 - 0.337x_1x_3 + 1.056x_2x_3 - 2.835x_1^2 - 1.147x_2^2 - 1.680x_3^2$$

2. Modèle mathématique de l'extrait des racines de *S.aspera* :

$$y_{CPT} = 7.263 - 0.909x_1 + 1.716x_2 + 0.815x_3 + 0.035x_1x_2 - 0.378x_1x_3 + 0.753x_2x_3 - 1.602x_1^2 - 1.167x_2^2 - 1.269x_3^2$$

$$y_{DPPH} = 2.97 - 0.325x_1 + 0.6625x_2 + 0.2975x_3 + 0.2275x_1x_2 - 0.0125x_1x_3 + 0.3325x_2x_3 - 0.99625x_1^2 - 0.50625x_2^2 - 0.57125x_3^2$$

II.1 Conditions d'extraction optimales pour les feuilles

En utilisant un modèle quadratique pour décrire l'expérience, nous avons optimisé trois variables expérimentales pour une extraction maximale des composés phénoliques et de DPPH de poudre des feuilles de *Smilax aspera*.

L'optimisation à l'aide de la fonction de désirabilité (figure 6) a indiqué que les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques et de DPPH concernant les feuilles montrent une désirabilité de 0,99. Les conditions optimales établies sont comme suit :

- **Concentration d'éthanol** : 33.82%.
- **Amplitude des ultrasons** : 99.40 %.
- **Temps d'extraction** : 7.45 min.

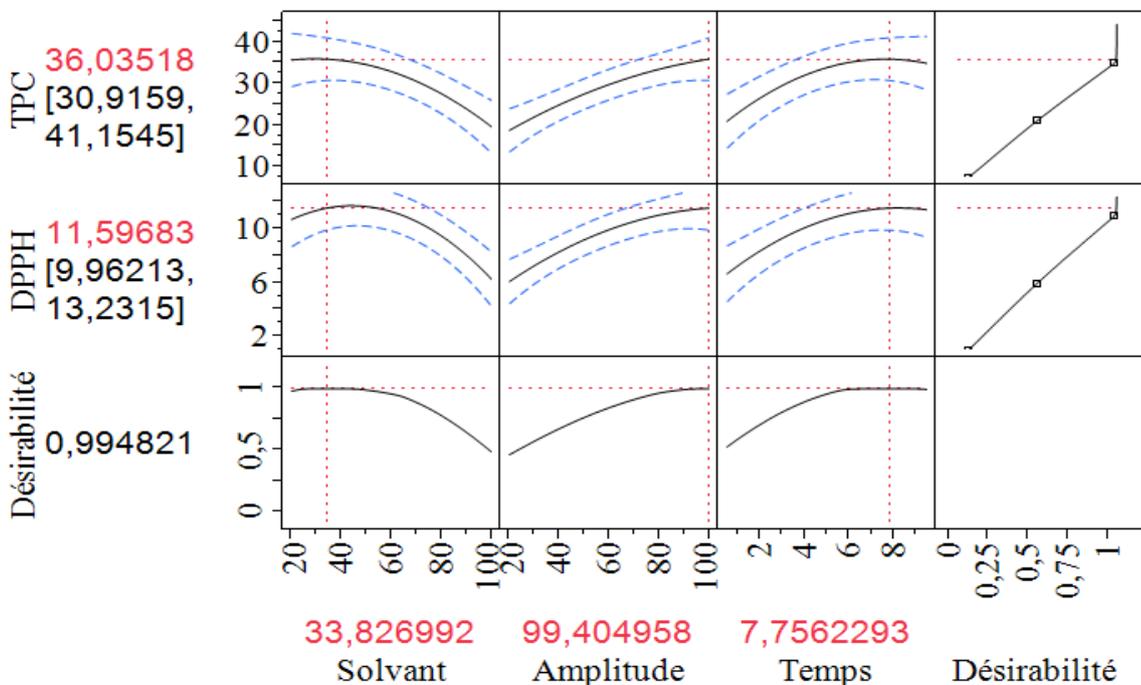


Figure 6 : Profiler de prédiction des valeurs prédites et la fonction de désirabilité pour les feuilles de *Smilax aspera*.

Les conditions optimales obtenues par le BBD ont été utilisées afin de valider le modèle d'extraction des CPT et l'activité antioxydante à partir de la poudre des feuilles de *Smilax aspera*.

Le tableau XI montre que les valeurs expérimentales sont proches des valeurs calculées, et l'analyse statistique ne montre pas de différences significatives entre la valeur prédite et la valeur expérimentale, confirmant la validité et l'adéquation du modèle développé.

Tableau XI : Conditions optimales d'extraction, valeurs prédites et résultats expérimentaux pour le CPT et le DPPH des feuilles de *Smilax aspera*.

Paramètres	Valeurs optimales
Paramètres optimisés	
Concentration d'éthanol (% v/v)	33.83
Amplitude des ultrasons (%)	99.40
Temps (min)	7.76
Variables optimisées	
CPT estimé (mg EAG/g PS)	36.04
CPT expérimental (mg EAG/g PS)	32,75 ± 0,48
DPPH estimé (mg EAG/g PS)	11.60
DPPH expérimentale (mg EAG/g PS)	10,47 ± 0,07

II.2 Conditions d'extraction optimales pour les racines

En utilisant un modèle quadratique pour décrire l'expérience, nous avons optimisé trois variables expérimentales pour une extraction maximale des composés phénoliques et de DPPH de poudre des racines de *Smilax aspera*.

L'optimisation à l'aide de la fonction de désirabilité (figure 7) a indiqué que les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques et de DPPH, avec une désirabilité de 0,91, étaient les suivantes :

- **Concentration d'éthanol :** 53%.
- **Amplitude des ultrasons :** 94%.
- **Temps d'extraction :** 11.90 min.

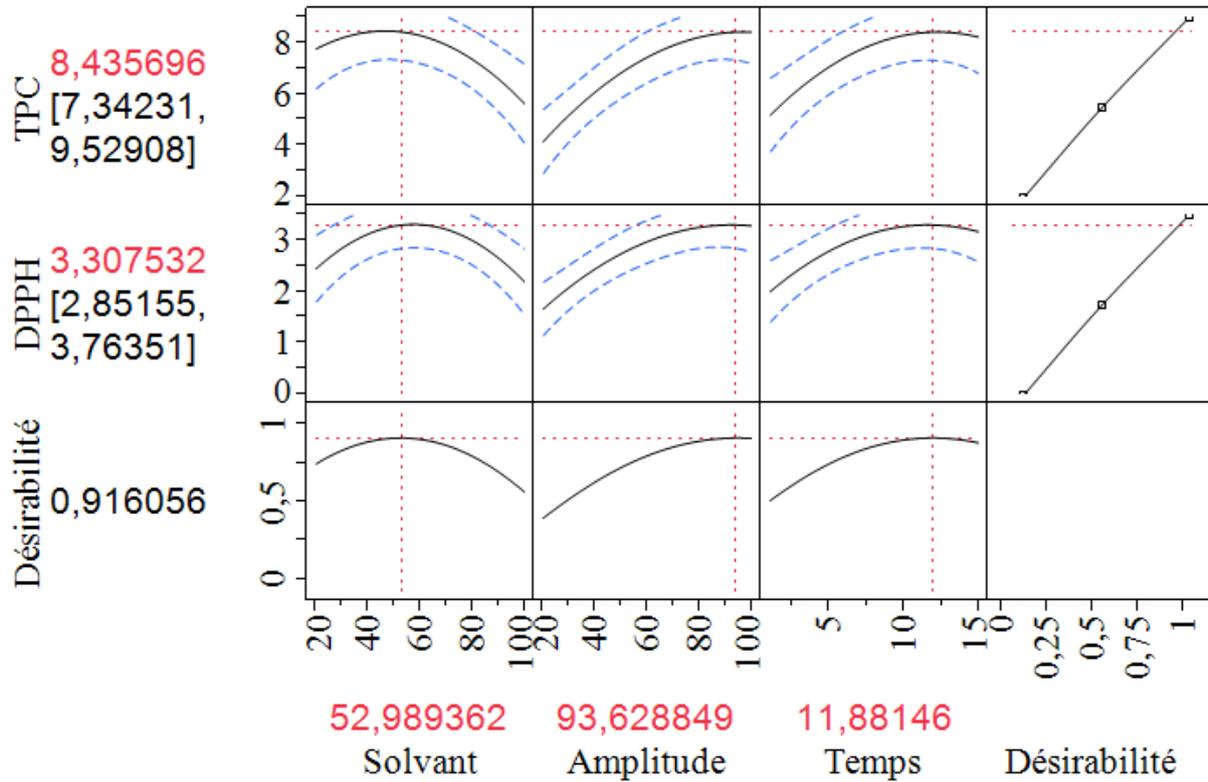


Figure 7 : Profils pour les valeurs prédites et la fonction de désirabilité de poudre des racines de *Smilax aspera*.

Les conditions optimales obtenues par le BBD ont été testées afin de vérifier la validité du modèle quadratique d'extraction des CPT et du DPPH à partir de la poudre des racines de *Smilax aspera*.

Le tableau XII montre que les valeurs expérimentales sont étroitement proches des valeurs prévues et l'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales, ce qui confirme la validité et l'adéquation des modèles prévus.

Tableau XII : Conditions optimales d'extraction, valeurs prédites et résultats expérimentaux pour le CPT et le DPPH des racines de *Smilax aspera*.

Paramètres	Valeurs optimales
Paramètres optimisés	
Concentration d'éthanol (% v/v)	52.99
Amplitude des ultrasons (%)	93.63
Temps (min)	11.88
Variables optimisées	
CPT estimé (mg EAG/g PS)	8.44
CPT expérimental (mg EAG/g PS)	8,51 ± 0,08
DPPH estimé (mg EAG/g PS)	3.31
DPPH expérimentale (mg EAG/g PS)	3,42 ± 0,09

III Teneur totale en polyphénols

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard. Les résultats des teneurs totales en polyphénols des extraits obtenus de l'espèce *Smilax aspera* (racines et feuilles) sont représentés dans le tableau XIII. Une teneur élevée en polyphénols a été observée dans les feuilles avec $32,75 \pm 0,48$ mg EAG/g PS, alors que les racines contiennent un niveau plus faible ($8,51 \pm 0,08$ mg EAG/g PS).

Tableau XIII : Teneurs totales en polyphénols des racines et des feuilles de *S. aspera*.

Partie	Teneur totale en polyphénols (mg EAG/g PS)
Feuilles	$32,75 \pm 0,48$
Racines	$8,51 \pm 0,08$

IV Teneurs en flavonoïdes totaux et flavonols

Les fractions représentant les flavonoïdes totaux (FT) et les flavonols dans l'espèce *S. aspera* (racines et feuilles) sont déterminées en mg équivalent de quercétine par gramme de poids sec, et les résultats sont regroupés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Teneur totale en flavonoïdes et flavonols

		Teneur (mg/g PS)
Feuilles	Flavonoïdes totaux	12,18±0,28
	Flavonols	18,57±0,08
Racines	Flavonoïdes totaux	1,11±0,01
	Flavonols	2,54±0,16

Une teneur considérable en flavonoïdes est constatée dans les feuilles (12,18±0,28 EQ/g PS), tandis que les racines ont donné des teneurs de 1,11±0,01 mg EQ/g PS. La même observation par rapport à la teneur en flavonols a été observée dans les feuilles (18,57±0,08 EQ/g PS), tandis que les racines ont donné des teneurs basses (2,54±0,16 mg EQ/g PS). En comparant les résultats obtenus, nous pouvons dire que les meilleures teneurs en flavonoïdes totaux et flavonols dans l'espèce *S. aspera* sont observées dans les feuilles.

V Teneurs en chlorophylles, proanthocyanidines, anthocyanidines et caroténoïdes et le pouvoir réducteur

Les teneurs en chlorophylles, proanthocyanidines, anthocyanidines et caroténoïdes, ainsi que le pouvoir réducteur des feuilles et des racines de *S. aspera*, sont regroupés dans les tableaux XV et XVI. Les résultats mettent en évidence des disparités significatives entre la composition chimique des feuilles et des racines de *S. aspera*. Selon Yeshe et al., 2022, les concentrations de chlorophylles et de caroténoïdes sont nettement plus élevées dans les feuilles, ce qui est en accord avec leur rôle dans la photosynthèse et leur fonction de capture de la lumière. En revanche, les niveaux d'anthocyanidines sont légèrement plus élevés dans les racines, ce qui pourrait suggérer un rôle plus important dans la protection contre les stress environnementaux ou les dommages oxydatifs. En outre, l'amélioration du pouvoir réducteur observée dans les feuilles laisse entendre une capacité antioxydante accrue, ce qui renforce leur potentiel en tant que source de composés organiques. Il est probable que ces différences témoignent des fonctions biologiques différentes des feuilles et des racines, chacune étant adaptée à ses propres fonctions.

Tableau XV : Résultats des dosages phytochimiques de l'extrait des feuilles et racines de *Smilax aspera*

Teneurs totales	Feuilles	Racines
Chlorophylle A (µg/g PS)	687,84±57,30	-
Chlorophylle B (µg/g PS)	204,89±77,34	-
Caroténoïdes (µg/g PS)	2116,56±24,26	-
Proanthocyanidines (µg/g PS)	4.59±0.10	1.48±0.02
Anthocyanidines mg/g	1.05±0.01	1,12±0,02

Tableau XVI : Pouvoir réducteur des extraits de feuilles et de racines de *Smilax aspera*

Partie	Pouvoir réducteur (mg EAG/g PS /100g PS)
Feuilles	1.13±0.02
Racines	0,64±0,01

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

La présente étude est focalisée sur l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux des feuilles et racines de *Smilax aspera* par la technique des ultrasons et l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits optimisés.

L'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir de la poudre des feuilles et racines de *Smilax aspera* a été réalisée en testant trois facteurs principaux : la concentration en éthanol, la puissance ultrasonique et le temps d'extraction, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse.

Les conditions expérimentales optimales permettant d'optimiser l'extraction des polyphénols totaux et l'évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles de *Smilax aspera*. Les résultats d'optimisation ont donné une teneur en polyphénols totaux de $32,75 \pm 0,48$ mg EAG/g de PS et une activité de DPPH de $10,47 \pm 0,07$ mg GAE/g PS, et ce, en utilisant une concentration en éthanol de 33,82 %, une amplitude ultrasonique de 99,40 % et un temps d'extraction de 7,45 minutes.

Pour les racines, les conditions optimales étaient : une concentration en éthanol de 53 %, une amplitude ultrasonique de 94 % et un temps d'extraction de 11,90 minutes. La teneur en polyphénols enregistrée est de $8,51 \pm 0,08$ mg EAG/g de PS et l'activité antioxydante du test DPPH est de $3,42 \pm 0,09$ EAG/g MS. Les résultats obtenus sont très proches des valeurs prédites par BBD.

L'analyse phytochimique des extraits optimisés des feuilles a permis d'enregistrer une teneur en flavonoïdes de $12,18 \pm 0,28$ mg EAG/g MS, en flavanols de $18,57 \pm 0,08$ mg EAG/g MS et en anthocyanidines de $4,59 \pm 0,10$ EAG/g MS. Pour ce qui concerne les racines, l'analyse a montré des teneurs de $1,11 \pm 0,01$ mg EAG/g MS en flavonoïdes, de $1,11 \pm 0,01$ mg EAG/g MS en flavanols et de $1,05 \pm 0,01$ EAG/g MS en anthocyanidines.

Les résultats du pouvoir réducteur pour les extraits de feuilles et de racines de *Smilax aspera* ont montré des capacités plus faibles ($1,13 \pm 0,02$ et $0,64 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ PS) respectivement pour les extraits de feuilles et racines.

Cette étude pourrait être complétée par l'optimisation d'autres paramètres qui influencent l'extraction, comme la température d'extraction, le pH du solvant ou encore la granulométrie de la matière végétale.

Enfin, *Smilax aspera* se démarque par sa capacité à être une ressource végétale polyvalente, ce qui mérite une étude plus approfondie afin de mettre en valeur ses propriétés thérapeutiques. Et en tant qu'une source importante de polyphénols et de ses propriétés antioxydantes, ce qui pourrait être utilisé dans l'industrie agroalimentaire et pour le développement de compléments alimentaires.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A-

- Abd El-Ghani, M. M. (2016). Traditional medicinal plants of Nigeria: an overview. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 7(5), 220-247.
- 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.
- Annadurai, G., & Sheeja, R. (1998). Use of Box-Behnken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer. *Bioprocess engineering*, 18, 463-466.

-B-

- Bey, M., Zhou, S., Poidevin, L., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Berrin, J.-G., & Sigoillot, J.-C. (2013). Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospira anserina*. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 488-496.
- 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, In: Numéro spécial*, 79-82.
- Box, e. a. (2005). Statistics for experimenters. In *Wiley series in probability and statistics*. Wiley Hoboken, NJ.

-D-

- D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- Durante, C., Haddy, N., Baudin, E., Leboulleux, S., Hartl, D., Travagli, J., Caillou, B., Ricard, M., Lumbroso, J., & De Vathaire, F. (2006). Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(8), 2892-2899.

-E-

- Edeas, M. (2007). Citroflavonoïdes. *Phytothérapie*, 5(4), 210-211.

-G-

Ghédira, K., & Goetz, P. (2016). Salsepareille *Smilax sarsaparilla* L.(syn. *Smilax aspera* L.)[Smilacaceae]. *Phytothérapie*, 14(5), 330-333.

Goupy, J., & Creighton, L. (2006). Introduction aux plans d'expériences Dunod. *L'usine nouvelle*, 2(10).

-H-

Haleng, J. (2007). Oxidative stress. *Revue médicale de liege*, 62(10), 628-638.

-I-

Ivanova, E. A. (2011). New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. *Fitoterapia*, 82(2), 282-287.

-K-

Kunwar, E. A. (2011). Differential antioxidant/pro-oxidant activity of dimethoxycurcumin, a synthetic analogue of curcumin. *Free Radical Research*, 45(8), 959-965.

-L-

Lagnika. (2005). *Latifou Lagnika Etude Phytochimique Et Activite Biologique De Substances Naturelles Isolees De Plantes Beninoises* Universite D'abomey-Calavi].

-M-

Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(3), S253-S260.

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John wiley & sons.

-P-

Pastre, J., & Priymenko, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.

-Q-

Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183.

-R-

Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J.-L., Azib, L., Richard, T., & Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(3), 274-286.

Rolland, Y. M., Cesari, M., Miller, M. E., Penninx, B. W., Atkinson, H. H., & Pahor, M. (2004). Reliability of the 400-m usual-pace walk test as an assessment of mobility limitation in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52(6), 972-976.

Rossi, J. A., & Singleton, V. L. (1966). Flavor effects and adsorptive properties of purified fractions of grape-seed phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17(4), 240-246.

-S-

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.

Shahidi, E. A. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.

Silva, R. F., & Pogačnik, L. (2020). Polyphenols from food and natural products: Neuroprotection and safety. *Antioxidants*, 9(1), 61.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89(2), 191-198.

-T-

Tinsson, W. (2010). Plans d'expériences. *Constructions et analyses statistiques*.

-W-

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.

Wu, C. J., & Hamada, M. S. (2011). *Experiments: planning, analysis, and optimization*. John Wiley & Sons.

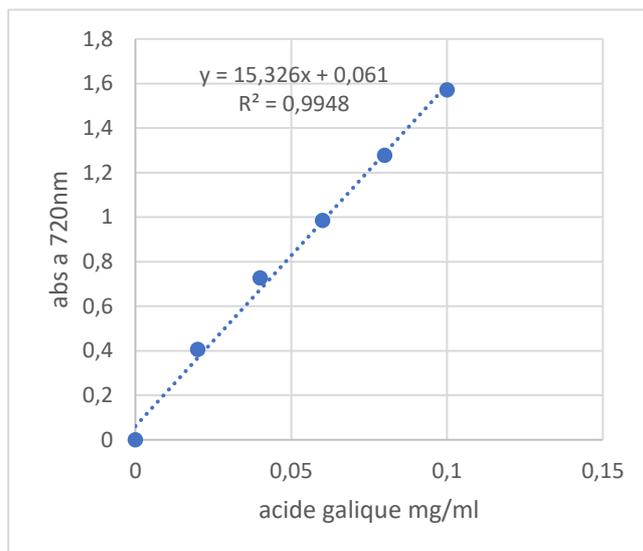
-Y-

Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerjytė, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. *Molecules*, 27(1), 313.

Yıldırım, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4083-4089.

ANNEXES

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques



Résumé

Ce travail porte sur l'optimisation de l'extraction par ultrasons des composés phénoliques totaux (CPT) et du pouvoir du piégeage du radical DPPH à partir des feuilles et des racines de *Smilax aspera*, une plante médicinale locale, en utilisant la méthodologie de surface de réponse du plan de Box-Behnken. L'étude a permis d'obtenir une teneur totale en polyphénols de 32,75 mg EAG/g MS et un pouvoir du piégeage du radical DPPH de 10,47 mg EAG/g MS pour les feuilles. Pour les racines, les conditions optimales ont donné une teneur en polyphénols de 8,51 mg EAG/g MS et une activité antioxydante de 3,42 mg EAG/g MS, suggérant un potentiel d'application dans les industries alimentaires et cosmétiques.

Mots clés : Composés phénoliques totaux, *Smilax aspera*, Box-Behnken, Activité antioxydante, Ultrasons.

Abstract

This work focuses on optimizing the ultrasonic extraction of total phenolic compounds (TPC) and DPPH radical scavenging activity from the leaves and roots of *Smilax aspera*, a local medicinal plant, using the Box-Behnken response surface methodology. The study resulted in a total polyphenol content of 32.75 mg GAE/g DW and a DPPH radical scavenging activity of 10.47 mg GAE/g DW for the leaves. For the roots, optimal conditions yielded a polyphenol content of 8.51 mg GAE/g DW and antioxidant activity of 3.42 mg GAE/g DW, suggesting potential applications in the food and cosmetic industries.

Keywords: Total Phenolic compounds, *Smilax aspera*, Box-Behnken, Antioxidant activity, Ultrasound.