

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Alimentaires
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Mémoire de Fin de Cycle
Pour l'obtention du diplôme de
MASTER

Thème

**Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles
de *Crataegus monogyna* (aubépine)**

Présenté par :

DEHAS Dounia

Soutenue le : **12 Septembre 2022**

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade			
Mr BACHIR BEY Mostapha	MCA	U.A/MIRA	Bejaia	Président
Mr NABET Nacim	MCA	U.A/MIRA	Bejaia	Promoteur
Mme BOUARROUDJ Khalida	MCB	U.A/MIRA	Bejaia	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie Allah tout puissant de m'avoir donné le courage et la santé pour réaliser cette étude

Je tiens à remercier vivement Monsieur NABET Nacim pour m'avoir encadrée, pour ses précieuses remarques constructives et son suivi pour mener à terme cette étude.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire 3 BS pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à remercier chacun des membres de jury Mme BOUARROUDJ Khalida et Mr BACHIR BEY Mostapha pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail et pour m'avoir accordé un peu de leur temps pour l'examiner et l'enrichir de leurs suggestions et commentaires

En dernier lieu, mes remerciements sont aussi pour tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à élaborer cette modeste étude

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à

Mes très chers parents qui m'ont soutenu jours et nuits durant tout mon parcours. Que dieu vous bénisse et vous garde en bonne santé

A mon cher frère et mes chères sœurs

A toute ma famille de près ou de loin

A tous mes amis

TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Glossaire.....	VI
Introduction	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR *CRATAEGUS MONOGYNA* ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE

1. Présentation de la plante <i>Crataegus monogyna</i>.....	3
1.1. Etymologie.....	3
1.2. Historique et Origine.....	4
1.3. Classification botanique.....	4
1.4. Exigence de l'espèce.....	5
1.5. Utilisations de <i>C. monogyna</i>	5
1.5.1. Utilisations alimentaires.....	5
1.5.2. Utilisations médicinales.....	5
1.6. Propriétés pharmacologiques	6
1.6.1. Cardiotonique.....	6
1.6.2. Action sédative sur le système nerveux central.....	6
1.6.3. Autres actions.....	6
1.7. Composition biochimique.....	7
1.7.1. Composition en métabolites primaires.....	7
1.7.2. Composition en métabolites secondaires.....	7
1.8. Toxicité.....	8
2. Activité antioxydante.....	8
2.1. Radicaux libre.....	9
2.1.1. Définitions.....	9

2.1.2. Principaux radicaux libres.....	9
2.2. Les antioxydants.....	9
2.2.1. Définition.....	10
2.2.2. Classification des antioxydants.....	10
2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	11

CHAPITRE II : METHODES D'EXTRACTION ASSISTEE AUX ULTRASONS

1. Définition	13
2. Principe	13
3. Paramètres influents l'extraction assisté par ultrason.....	15
3.1. Fréquence ultrasonore.....	15
3.2. Puissance acoustique.....	15
3.3. Nature du solvant.....	16
3.4. Influence de la température.....	16
3.5. Pression du milieu.....	16
3.6. Présence de gaz dissous.....	16
3.7. Temps d'extraction.....	17
4. Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrason.....	17
5. Applications des ultrasons.....	17
5.1. Ultrasons en technologie de transformation.....	17
5.2. Ultrasons en technologie de préservation.....	18
5.3. Ultrasons en technologies d'extraction.....	18
5.3.1. Extraction des huiles essentielles.....	18
5.3.2. Extraction des antioxydants.....	19

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal.....	20
1.1. Récolte.....	20
1.2. Lavage et Séchage.....	20
1.3. Broyage et Tamisage	20
2. Analyses phyto-chimiques.....	21
2.1. Détermination de l'humidité	21
2.2. Taux de cendres.....	21

2.3. Dosage des caroténoïdes.....	22
3. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques.....	23
3.1. Model expérimental	23
3.2. Extraction des composés phénoliques par ultrason.....	24
3.2.1. Principe.....	24
3.2.2. Mode opératoire.....	24
3.3. Dosage des polyphénols totaux.....	25
3.3.1. Principe.....	25
3.3.2. Mode opératoire	25
4. Détermination de l'activité antioxydante.....	26
4.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH.....	26
4.1.1. Principe.....	26
4.1.2. Mode opératoire.....	26
4.2. Test de piégeage des radicaux cationiques ABTS ⁺	27
4.1.1. Principe.....	27
4.2.2. Mode opératoire.....	27
5. Dosage des flavonoïdes.....	28
5.1. Principe.....	28
5.2. Mode opératoire.....	28
6. Dosage des tannins condensés.....	29
6.1. Principe.....	29
6.2. Mode opératoire.....	29

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Détermination de l'humidité.....	31
2. Taux de cendres.....	32
3. Teneur en caroténoïdes.....	33
4. Résultats d'optimisation des extraits de <i>Crataegus monogyna</i>obtenus par ultrason..	34
4.1. Teneur en polyphénols totaux	35
4.2. L'effet sur le piégeage du radical libre DPPH.....	37
4.3. L'effet sur le piégeage du radical libre ABTS.....	39
4.4. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de <i>C. monogyna</i>	41

5. Teneur en flavonoïdes.....	43
6. Teneur en tannins condensés.....	44
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	47
Annexes.....	59

Liste des figures

Figure 1 : Présentation de l'espèce <i>C. monogyna</i> , (a, b) : au moment de floraison, (c): aumoment de fructification.....	3
Figure 2 : les structures chimique des : (a) flavonoïdes, (b)proanthocyanidines, (c) Acide triterpénique, (d) acides organiques représentatifs de <i>C. monogyna</i>	8
Figure 3: Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une cellule végétale.....	14
Figure 4 : Feuilles de <i>C. monogyna</i>	20
Figure 5 : Extraction des composés phénoliques par le bain à ultrason.....	25
Figure 6 : Forme radicalaire et réduite du DPPH.....	27
Figure 7: Structure de base des flavonoïdes etmécanisme de réaction d' Al^{3+} avec les flavonoïdes.....	28
Figure 8 : Teneur en humidité de <i>C. monogyna</i>	31
Figure 9 : Teneur en cendres de <i>C. monogyna</i>	32
Figure 10 : Teneur en caroténoïdes de <i>C. monogyna</i>	33
Figure 11 : Diagramme de Pareto des polyphénols de <i>C. monogyna</i>	35
Figure 12: Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	37
Figure 13: Interaction entre le temps et la température et leur effet sur le piégeage du radical DPPH de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	38
Figure 14 : Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	39
Figure 15 : Interaction entre le temps et la température et leurs effets sur le piégeage du radical ABTS.....	40
Figure 16 : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets de température et de temps sur la désirabilité de l'extrait de <i>C. monogyna</i> obtenu par extraction assistée par ultrason.....	42

Figure 17: Teneur en flavonoïdes de <i>C. monogyna</i>	43
Figure 18: Teneur en tannins condensés de <i>C. monogyna</i>	44

Liste des tableaux

Tableau I : Plan d'expérience utilisé pour l'extraction des composés phénoliques de <i>C.monogyna</i>	2
3	
Tableau II : Plan d'expérience à trois variables et les résultats de trois réponses étudiées des extraits de <i>C. monogyna</i> obtenus par ultrasons.....	34
Tableau III : Résultats préditset les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dansles conditions optimales d'extraction de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	41

Liste des abréviations

ABTS•+ : Acide 2, 2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AMPc : adinosine monophosphate cyclique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAG : Equivalents de l'acide gallique.

ECG :électro-cardio-gramme.

ET : Equivalent de Trolox.

EtOH : éthanol.

HPLC :chromatographie liquide haute pression.

kHz : kilohertz.

MS : Matière sèche.

nm : Nanomètre.

rpm : rotation par minute.

TPT : Teneur en polyphénols totaux.

Trolox : Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylique.

UV-Vis: Ultraviolet-visible.

W/m² : watt par mètre carré.

Glossaire

chronotrope: Est un adjectif, qui associe à un facteur, peut être positif ou négatif. Il représente la variation de la fréquence cardiaque et utilisé essentiellement pour qualifier un médicament.

Inotrope: Se dit de la puissance de contraction des muscles.

Sonochimique : Est un domaine de la chimie qui étudie les effets des ondes ultrasonores sur les réactions chimiques.

In vivo : Est une expression latine qualifiant des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant.

Pharmacologiques : Branche des sciences médicales qui étudie les propriétés chimiques des médicaments et leur classification.

Segment-ST :Correspond à la phase de la repolarisation ventriculaire pendant laquelle les cellules ventriculaire sont toutes dépolarisées.

Tonicardiaque: Renforce la tonicité du muscle cardiaque.

Introduction

Introduction

Depuis très longtemps, les plantes jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité (**Gourguillon et al., 2016**). Aujourd'hui, les plantes médicinales sont devenues des produits industriels grâce à la demande accrue des formulations de soins, de santé, des produits nutraceutiques et cosmétiques à base des plantes. Les récents développements industriels des produits à base des plantes médicinales et l'envie de consommer des produits bio et naturels sont plus qu'encourageant pour une exploration des applications potentielles nutraceutiques, cosmétiques et pharmaceutiques des plantes médicinales ou de leurs substances naturelles (**Mathé, 2015**).

Les plantes médicinales telles que *Crataegus azarulus* et *Crataegus oxyacantha* représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité des structures chimiques et elles possèdent un très large éventail d'activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, et antioxydante qui sont attribuées à ses différentes composantes actives : les coumarines, les flavonoïdes et les tanins ...etc (**Bahri-Sahloul et al., 2014; Kostic et al., 2012**).

En effet, les antioxydants naturels, et particulièrement les composés phénoliques, font l'objet de nombreuses recherches. Ces composés sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques (**Chanwitheesuk et al., 2005**). Ils sont utilisés dans la chimiothérapie et dans le traitement de plusieurs types de cancer (**He et al., 2010**). Les composés phénoliques présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation des lipides dans le domaine alimentaire. En cosmétologie, ils sont présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (**Joshi et al., 2015**).

L'extraction des composés phénoliques à partir d'un matériel végétal est une étape très importante pour leurs identification et quantification. L'extraction assistée par ultrasons et par micro-ondes sont des techniques vertes connues pour leurs avantages tels que augmenter le rendement d'extraction, l'utilisation de faible volume de solvant, utilisation de temps d'extraction court et une faible consommation d'énergie (**Azmir et al., 2013**). Par contre, les

techniques d'extraction classiques telles que la macération, l'extraction par Soxhlet, l'extraction solide liquide sont des techniques qui requièrent généralement une consommation importante en solvant et l'utilisation des températures élevées durant un temps de traitement long (**Pradal, 2016**).

L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (**Aberkane, 2006**). Parmi la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à l'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna*), qui est une plante médicinale appartenant à la famille des rosacées, utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédatives, vasculoprotectrices et antioxydantes (**Bahorun, 1997**). Elle est aussi utilisée comme plante ornementale (**Mohand, 2006**).

L'objectif visé par notre étude, consiste à optimiser les conditions d'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques des feuilles de *C. monogyna* et l'étude de l'activité antioxydante. L'optimisation est réalisée à l'aide d'un plan d'expérience (Box-Behnken) à trois variables qui sont la température (20, 40 et 60 °C), la concentration du solvant (0, 50 et 100%) et le temps d'extraction (10, 35 et 60 min) et l'étude de trois réponses qui sont la teneur en composés phénoliques totaux et l'étude de l'activité antioxydante par le piégeage du radical ABTS et le radical libre DPPH.

Ce mémoire est scindé en deux parties qui sont la synthèse bibliographique et la partie expérimentale.

➤ La partie synthèse bibliographique se compose de deux chapitres:

- Chapitre I : Généralités sur *Crataegus monogyna* et activité antioxydante,
- Chapitre II : Généralités sur les ultrasons.

➤ La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres :

- Chapitre III : Matériel et méthodes,

Il résume les différentes méthodes utilisées dans la réalisation de ce travail.

- Chapitre IV : Résultats et discussion.

Il regroupe les résultats obtenus de chaque expérience et enfin une conclusion et des perspectives.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur Crataegus monogyna et activité antioxydante

Chapitre I : Généralités sur *Crataegus monogyna* et activité antioxydante

1. Présentation de la plante *Crataegus monogyna*

Le nom du genre *Crataegus* est dérivé d'un mot grec qui signifie la dureté du bois. *Crataegus* est un grand genre des arbustes de la famille des rosacées avec 200 à 1200 espèces, actuellement reconnues indigènes des régions tempérées du nord (**Kashyap et al., 2012**).

L'une des espèces les plus utiles de cette famille, *monogyna*, dérivée du mot grec « *monogynus* » signifiant fleur à un seul pistil.

Plusieurs noms ont été attribués à l'aubépine dans différents pays du monde et parfois même au sein de la même région, nous en citons quelques-uns :

- **Le nom scientifique :** *Crataegus monogyna*,
- **Le nom Anglais:** hawthorn,
- **Le nom Français:** Épine blanche,
- **Le nom arabe:** Zaârour el barri,
- **Le nom Berbère :** Idhmim (**Djerroumi et Nacef., 2004 ; Zhang, 2002**).



Figure 01 : Présentation de l'espèce *C. monogyna*, (a, b) : au moment de floraison, (c): au moment de fructification (**Hamlaoui, 2016**).

1.1. Etymologie

Le nom de *crataegus* est le nom générique des aubépines (rosacées) désignant en latin (*crataegon*) ou (*crataegos*). Il provient du mot grec « *cratos* » signifiant la dureté de bois (**brosse, 2000**).

C. monogyna nommée aussi aubépine monogyne, épine blanche, noble épine se différencie de *Crataegus azarolus*. Par sa couleur de fruit rouge foncé (**Fernandez, 2003**).

L'aubépine monogyne est un nom féminin, du latin « *alba Spina* », « épine blanche », en raison de sa fleur blanche et des épines à la base (Somon, 1985; Zhang, 2002).

1.2. Origine

Au début de 19 siècle, on a commencé à étudier curieusement ses propriétés pharmacologiques. L'efficacité de l'aubépine sur les fonctions cardiaques a été découverte en 1896 (Bruneton, 1996; Pizarro, 1966).

L'aubépine est originaire d'Europe du sud (Chypre, Malte, Sicile...), et d'Asie et est répandue dans les zones tempérées de l'hémisphère nord. Sa floraison abondante arrive au mois de mai (Sprichegeret *al.*, 2001).

En Algérie, *Crataegus monogyna* appelée « *zaârour el barri* » est spontanée dans le Tell Méridionale Est, en particulier en zone de montagne (Abdelgherfi, 2003). Elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien (Bouزيد, 2008).

1.3. Classification botanique

La classification botanique de l'espèce *C. monogyna* donnée selon (Martinelliet *al.*, 2021).

Règne : Plantes,

Sous règne : Plantes vasculaires,

Embranchement : Spermaphytes,

Sous-embranchement : Angiospermes,

Classe : Dicotylédones,

Sous classe : Rosidae,

Ordre : Rosales,

Famille : Rosaceae,

Genre : *Crataegus*,

Espèce : *crataegus monogyna*,

1.4. Exigence de l'espèce

C. monogyna préfère les sols calcaires, elle s'accommode de tous les terrains. Cette espèce préfère les emplacements ensoleillés à terre légère qui ne contient pas beaucoup d'argile. Elle peut se développer dans les sols acides, neutres et même alcalins (**Brosse, 2000**).

1.5. Utilisations de *C. monogyna*

1.5.1. Utilisations alimentaires

➤ **Fruits:**utilisés soit frais ou cuits, utilisés principalement comme un aliment de famine. Les farines, les jus, les marmelades peut être extrait à partir de fruit (**Vivar-Vera et al., 2005 ;koyncuet al., 2007**).

En Europe centrale et orientale la cenelle ou le fruit de l'aubépine souvent dénommés "poires d'oiseau" ou "poires à Bon Dieu", est largement réduit en farine qui est utilisée pour la fabrication du pain de disette, mais également pour la fabrication d'une boisson fermentée très enivrante et agréable différente peu du poiré (**Djerroumi et Nacef, 2004 ; Messegue, 1975**).

Les cenelles peuvent être transformées en purée et ajoutées à de la farine pour confectionner des biscuits, des galettes et des bouillies (**Uphof, 1959**)

Le jus fruit de l'espèce de monogyna est aussi utilisé comme des boissons sans alcool et devinaigre, ainsi les grains de fruit de l'aubépine sont torréfiés et remplacent le café (**koyncuet al., 2006 ; Vivar –Vera et al., 2005**)

➤ **Feuilles:** Les toutes jeunes feuilles vert clair peuvent être ajoutées aux salades composées. Ainsipour la préparation de thé(**Kunkel, 1984; Lust, 1983;Uphof, 1959**).

➤ **Fleurs:** sont utilisées pour l'aromatisation des sirops et les desserts (**Keser, 2014**).

1.5.2. Utilisations médicinales

En médecine l'aubépine est l'une des meilleures substances phytopharmaceutiques ;les fruits sont utilisés en infusion ou en décoction contre les fièvres, les spasmes nerveux et diarrhée (**Djerroumi et Nacef, 2004 ; Kroll, 2005; Messegue, 1975;Spinoliet al., 1999 ; Veveriset al., 2004**). Les fruits sont aussi connus pour leur action diurétique et utilisés pour traiter les problèmes rénaux. (**Boudraa, 2008**).

Les infusions préparées à partir des sommités fleuries sont principalement utilisées comme régulateur du rythme cardiaque (Trobin, 2001). Grâce aux propriétés tonicardiaques de fruit de *Crataegus monogyna*. Il favorise la circulation coronaire et régularise la tension artérielle. Il permet également d'atténuer la diarrhée (Beloued, 1998; Garcia *et al.*, 1997; Guvenet *al.*, 2006; Ody, 1995). L'aubépine possède un usage interne contre les troubles cardiaques d'origine nerveuse, la tachycardie et l'anxiété, l'insomnie, et les calculs rénaux et biliaires (Garcia *et al.*, 1997; Sparska *et al.*, 1999).

Les fruits de *Crataegus monogyna* sont légèrement astringents et s'emploient en gargarisme contre les maux de gorge (Beloued, 1998). Ainsi il protège contre les arythmies (Garcia *et al.*, 1997).

1.6. Propriétés pharmacologiques

1.6.1. Cardiotonique

Des études cliniques ont mis en évidence que des extraits (feuilles et fleurs) d'aubépine étaient efficaces dans le traitement des insuffisances cardiaques de stade I et II (Pittler *et al.*, 2003; Schroder *et al.*, 2003; Zapfe, 2001).

Elle exerce un effet inotrope positif et chronotrope négatif par diminution notamment de l'AMPc phosphodiesterase (Wichtl *et Anton*, 1999), l'extrait des feuilles et des fleurs d'aubépine augmentent l'amplitude des contractions de cardiomyocytes isolés avec une dépense d'énergie modérée en bloquant la repolarisation des courants K^+ (Muller *et al.*, 1999; Popping *et al.*, 1995).

Les fruits de L'aubépine réduit la formation de lactate lors de l'ischémie chez le rat (Nasa *et al.*, 1993). Elle a été mis en évidence, *in vivo* que l'aubépine lors d'une ischémie prolongée atténue considérablement l'élévation du segment-ST (mesurée par un ECG) et supprime la diminution du rythme cardiaque. Elle diminue également de façon dose-dépendante l'incidence de la tachycardie et de la fibrillation ventriculaire (Veveris *et al.*, 2004).

1.6.2. Action sédatrice sur le système nerveux central

Les extrait des feuilles de l'aubépine exerce une action sédatrice, anxiolytique et diminue l'agressivité (Paris, 1983). En effet, l'administration d'aubépine chez des patients

hypertendus diminue l'anxiété (**Walker et al., 2002**). L'aubépine diminue également la température corporelle et de ce fait prépare le sommeil (**Paris, 1983**).

1.6.3. Autres actions

En outre, les extraits à base de procyanidines de l'aubépine aident à réduire le niveau du cholestérol et à diminuer le taux des triglycérides (**Chang et al., 2002; Svedstromaet al., 2006; Zhang et al., 2006**). L'extrait hydroalcoolique de *Crataegus* empêche également l'accumulation du cholestérol dans le foie en augmentant la dégradation de cholestérol en acides biliaires et simultanément par suppression de la biosynthèse du cholestérol (**Rajendran et al., 1996**). Les fruits et les feuilles de l'aubépine ont été considérés comme de bons remèdes pour les douleurs de l'appareil digestif et urinaire (**Rose et Readway, 1999**).

1.7. Composition biochimique

1.7.1. Composition en métabolites primaires

Le fruit de *C. monogyna* est riche en glucide notamment les polysaccharides, contient et des traces d'huile 2,3 % de matière sèche, et renferme des protéines d'une teneur de 2,5% de matière sèche. Le fruit contient généralement sont des acides aminés aromatique, et aussi très riche en vitamines E et C et également en minéraux comme le K, ça. (**Herrara, 1984 ; Simon, 1999**). Le fruit de *C. monogyna* Jacq contient beaucoup d'acides aminés, acides maliques, tartriques et acides citriques, avec un totale de 3-6% dans les fruits séchés (**Bruneton, 1999 ; Chang et al., 2006**).

1.7.2. Composition en métabolites secondaires

Chang et al. (2002) ont identifié dans leur étude que les fruits, les feuilles et les fleurs de *C. monogyna* contiennent un certain nombre de constituants chimiques, tels que les flavonoïdes (0,1% -1% dans les fruits, 1% -2% dans les feuilles et fleurs), proanthocyanidines (1% -3% dans les fruits ou les feuilles avec fleurs), acides triterpéniques (0,5 % -1,4 % dans les fruits), acides organiques (2%-6%) (**Figure 2**).

Abuashwashiet al. (2016) ont isolé cinq acides phénoliques par la méthode HPLC de l'extrait méthanolique des fruits de *C. monogyna* qui sont 3,5- acide dihydroxybenzoïque,

addit homovanillique, acide gentisique, acide chlorogénique, acide ursolique. Les flavonoïdes isolés du même extrait sont l'apigénine, le kaempférol, la myricétine, la quercétine, la rutine, l'hydroquinone, l'arbutine.

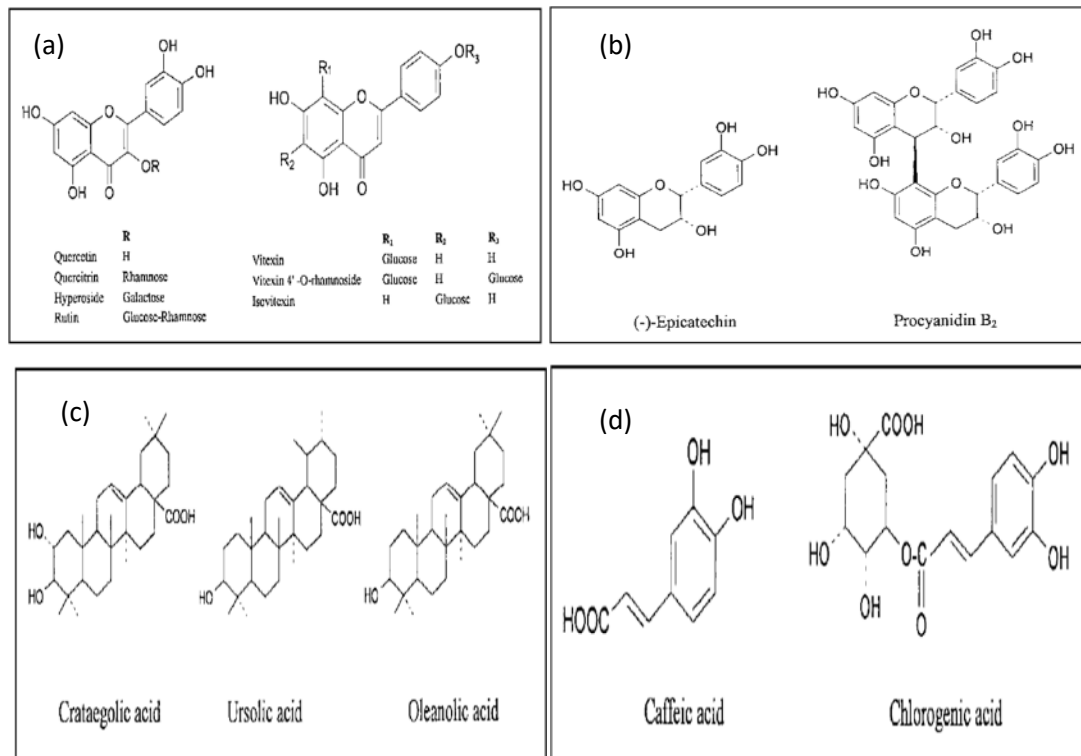


Figure 2 : les structures chimiques des : (a) flavonoïdes, (b) proanthocyanidines, (c) Acide triterpénique, (d) acides phénoliques représentatifs de *C. monogyna* (Chang *et al.* 2002).

1.8. Toxicité

Chez l'homme, de trop fortes doses provoquent des troubles cardiaques, respiratoires (dépression), des troubles digestifs bénins et de légères allergies cutanées. Une consommation excessive de fruits par de jeunes enfants pourrait produire une hypotension sévère. D'autre part, il s'agit d'une plante allergisante par son pollen (Girre, 2000; Pierre, 2004).

2. Activité antioxydante

Radicaux libres et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, les deux biologistes R. Gerschman et D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la théorie des radicaux

libre pour expliquer le processus du vieillissement. La protection contre les effets délétères induits par les radicaux (**Harman, 1992; Gerschman, 1981**).

2.1. Radicaux libres

2.1.1. Définitions

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc(**Oueslati, 2017**).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines. L'appellation " dérivés réactifs de l'oxygène " n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde nitrite ($ONOO\bullet$) (**Meister, 1983**).

2.1.2. Principaux radicaux libres

✓ *L'anion superoxyde($O_2\bullet$)*: La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.

✓ *Le radical hydroxyle ($OH\bullet$)*: Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.

✓ *Le radical peroxyde($ROO\bullet$)*: sont des radicaux secondaires issus de l'oxydation de substance organiques, initiée par l'oxygène singlet ou le radical hydroxyle.

✓ *L'oxygène singlet(O_2)*: c'est la forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité(**Bensakhria, 2018; Haleng, 2007**).

2.2. Les antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action.

2.2.1. Définition

Un agent antioxydant Il peut être défini comme toute substance ayant une concentration relativement faible et qui est capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Meister, 1983). C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

2.2.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

➤ Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution (Lisuet *al.*, 2003).

➤ Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide

ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Svoboda et Hampson, 1999).

➤ **Antioxydants primaires**

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques (L•, LOO•, LO•) en produits plus stables (LH, LOOH, LOH) grâce à leur propriété de donneurs de protons actifs (Kim et Lee, 2004).

➤ **Antioxydants secondaires**

Selon Gordon, (1990), les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- Absorption des radiations ultraviolettes.
- Inactivation de l'oxygène singulet.
- Chélation des métaux.
- Décomposition des hydroperoxydes.

2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire (Marc *et al.*, 2004).

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (Li *et al.*, 1999).

Une autre méthode a été proposée par (Glavind et Holmer, 1967) qui combinent la méthode précédente avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de piégeage de

radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. Parmi ces méthodes la méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao *et al.*,1993**); la méthode d'ABTS (piégeage du radical 2,2-azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) (**Maamri ,2008**); la méthode du radical DPPH• (piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Himed, 2011 ; Uchiyama *et al.*, 1968**); la méthode de DMPD (du radical N, N'-p di-méthylphénylènediamine) (**Li *et al.*,1994**) et la méthode de Photochemiluminescence (PLC) (**Maginet *al.*, 2000**).

Chapitre II :
Méthode d'extraction assistée aux ultrasons

Chapitre II : Méthode d'extraction assistée aux ultrasons

L'extraction des composés bioactifs par les ultrasons (20-100kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie (**Chemat et al., 2008**). Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (**Bousbia, 2011; Vinatoru, 2001**). Cette technique a été utilisée pour extraire les polyphénols à partir de *C. monogyna*. (**Tahirović et al., 2014**).

1. Définition

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 20 à 100 kHz utilisés pour l'extraction des composés bioactives (**Ghitescu et al., 2015**). Pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (**Michles, 2011**)

2. Principe

Les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse, ce phénomène est appelé la cavitation acoustique (**Benamor, 2008**). Les ultrasons perturbent la structure de la paroi cellulaire induisant ainsi la lyse des cellules et accélérant la diffusion des molécules à travers les membranes et en brisant les membranes cellulaires (**figure 3**) (**Bourgou et al., 2016**). Autrement dit, les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires et améliorent le transfert de masse. Les ultrasons dans l'extraction peuvent également perturber les parois cellulaires Facilitant la libération de leur contenu. Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique (**Ghitescu et al., 2015**).

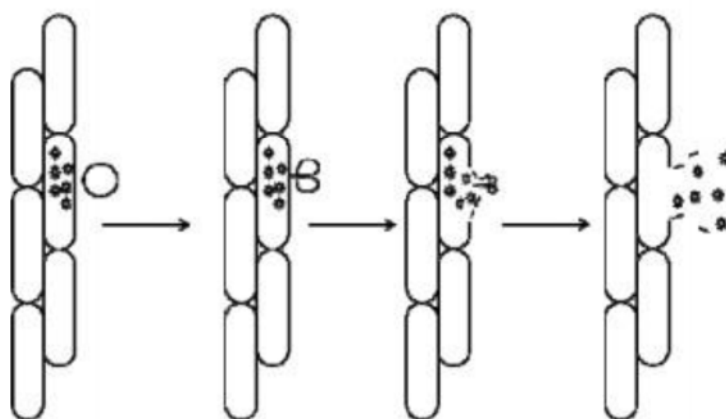


Figure 3 : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une cellule végétale (**Sébastien, 2010**)

Il existe deux types de cavitations selon l'amplitude de la variation de pression :

- A faible amplitude, la bulle de cavitation répond de façon linéaire. Son diamètre varie simultanément à la pression. Il s'agit de la cavitation stable qui ne conduit pas aux phénomènes sonochimiques.
- A forte amplitude de variation de pression, la réponse de la bulle devient non linéaire. Elle va augmenter jusqu'à atteindre une valeur critique pour laquelle elle entre en résonance avec l'onde incidente. C'est le phénomène de cavitation transitoire qui conduit aux effets sonochimiques (**Pétrier *et al.*, 1994**).

Actuellement, dans l'eau, il est généralement admis que les fréquences basses (de 20 à 80 kHz) permettent d'obtenir des bulles de cavitation transitoire relativement peu nombreuses mais de dimensions élevées, ce qui privilégie les effets physiques par rapport aux effets chimiques. Pour de hautes fréquences (de 150 à 2 000 kHz)(**Mason *et al.*, 2002**), les bulles de cavitation transitoire possèdent un diamètre plus faible favorisant la production de radicaux hydroxyles et en conséquence les réactions d'oxydation radicalaire des solvants organiques hydrophiles(**Makino *et al.*, 1982**). Les ultrasons entraînent deux types de réactions : physiques (basées sur les effets mécaniques et thermiques des ultrasons) et chimiques (basées sur la formation de radicaux libres par fragmentation du solvant)(**Riesz et Kondo, 1992**).

3. Paramètres influents l'extraction assisté par ultrason

Le choix approprié du solvant et de la température permet une meilleure extractibilité des composés phénoliques. De plus, l'optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons tels que la fréquence, la puissance des ultrasons, Pression du milieu Présence de gaz dissous ainsi que le temps d'extraction permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction (**Wang et Weller, 2006**). Une brève description de l'influence de ces paramètres est présentée.

3.1. Fréquence ultrasonore

La fréquence de sonication est un paramètre très important. L'amplitude de la dépression à fournir pour permettre d'atteindre le seuil de cavitation dépend de la fréquence. Plus la fréquence du son est élevée, plus la période de dépression est courte. Elle peut être trop courte pour former une cavité. Des travaux réalisés par Boucher en 1970 ont montré que l'intensité du seuil de cavitation croît avec la fréquence. Cela signifie qu'il est plus facile d'engendrer la cavitation à basse fréquence. A cette dernière, le rayon critique est grand (de l'ordre de 160 μm à 20 kHz) et le temps de vie (10 μs) des bulles est relativement élevé (**Leighton, 1994**). De plus hautes fréquences rendent plus difficile la cavitation. Les fréquences le plus couramment utilisées se situent entre 20 et 40 kHz (**Borthwick et al., 2005 ; Gao et al., 2014 ; Pico, 2013 ; Ugoilmohamadi et al., 2013**).

3.2. Puissance acoustique

L'activité sonochimique est très dépendante de la puissance ultrasonore ou puissance acoustique (W m^{-2}). Néanmoins, au-dessous d'une certaine puissance (seuil de Blake), l'amplitude du champ ultrasonore est trop faible pour permettre la formation des bulles de cavitation. Au-dessus de ce seuil, les vitesses de réactions augmentent avec l'augmentation de la puissance acoustique, du fait de l'augmentation de nombre de bulles formées. Mais, il apparaît que cette vitesse atteint une limite, lorsque la puissance acoustique est trop élevée. Une concentration élevée de bulles engendre des phénomènes de dispersion de l'énergie par coalescence. Pour obtenir un bon rendement énergétique et chimique, il est conseillé d'appliquer à la solution une puissance comprise entre le seuil de Blake et celle induisant des vitesses maximales (**Kapustina, 1973**).

3.3. Nature du solvant

La nature du solvant est un paramètre très important pour la cavitation ultrasonore, car ses propriétés physiques telles que la viscosité et la tension superficielle, influent sur l'efficacité de la cavitation ultrasonore. En effet, une faible viscosité et une faible tension superficielle du solvant permettent d'abaisser le seuil de cavitation (seuil de Blake), vu que les forces de cohésion sont moindres(Afiaet *al.*, 2021).

3.4. Influence de la température

Plusieurs recherches, ont prouvé que la température a des effets importants sur la cavitation ultrasonore (Cheung *et al.*, 1994 ; Goel *et al.*, 2004). Une augmentation de température du milieu engendre une modification de la viscosité du milieu et une hausse de pression de vapeur saturante, ce qui facilite la cavitation, mais l'implosion des bulles sera moins violente(Mason, 1999). C'est pour cette raison que la majorité des réactions sonochimiques sont réalisées à de faibles températures(Izella, 2009 ; Mason, 1999).

3.5. Pression du milieu

Les bulles de cavitation sont produites lorsque la pression appliquée au milieu descend en dessous de la tension de vapeur du liquide. La pression appliquée au milieu, quand celui-ci est soumis aux ultrasons, peut être calculée comme étant la somme des pressions hydrostatique et acoustique. Par conséquent la cavitation sera possible dans le liquide si la tension de vapeur du liquide est supérieure à la somme de ces pressions. Cela signifie que plus la pression appliquée au milieu sera élevée, plus il sera difficile de provoquer de la cavitation (Apfel et Holland, 1991).

3.6. Présence de gaz dissous

Les bulles de cavitation peuvent être constituées de vapeur du liquide dans lequel elles sont générées. La cavitation prend naissance à partir de noyaux qui sont constitués par les occlusions gazeuses au sein du liquide. La présence de gaz dissous favorisera donc le phénomène de cavitation (Niemczewski, 2007).

3.7. Temps d'extraction

La durée est étroitement liée à la cinétique d'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération (**Mandal et al., 2007**).

4. Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrason

L'un des avantages de l'extraction assistée par ultrason est la température modérée de travail qui permet une réduction de la consommation d'énergie et une préservation de l'intégrité des substances bioactives sensibles à la chaleur (**Pradal, 2016**), en plus de l'amélioration du rendement de l'extraction, c'est-à-dire une extraction plus courte et plus efficace (**Goula, 2013**). Par contre, du point de vue inconvénients, cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus d'extraction (**Penchev, 2010**), d'une part et l'effet délétère de l'énergie ultrason sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation des radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules médicamenteuses (**Handa, 2008**).

5. Applications des ultrasons

La diversité des équipements ultrasons et leurs actions offre un large éventail d'applications dans le domaine de l'agroalimentaire tel que la transformation, l'extraction et la préservation des produits alimentaires (**Mason et al., 2003**).

5.1. Ultrasons en technologie de transformation

D'importantes forces de pression et de cisaillement sont générées par les ultrasons de puissance provoquant de forts gradients de température dans le milieu traité. Ceci améliore le rendement réactionnel, les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés visuelles du produit agroalimentaire final destiné à la consommation humaine. Ainsi on dénombre plusieurs exemples de transformation des aliments assistés par ultrasons (**Messaouden, 2018**).

5.2. Ultrasons en technologie de préservation

Il existe plusieurs exemples de microorganismes inactivés par ultrasons et étudiés dans des milieux de cultures de laboratoire, au sein de modèles alimentaires. Les cellules bactériennes ont chacune des sensibilités différentes aux traitements ultrasoniques. De manière générale, les plus grandes cellules sont plus sensibles aux ultrasons. Cela est peut-être dû au fait que les grandes cellules ont une plus grande surface les rendant plus vulnérables aux fortes pressions produites pendant la cavitation acoustique. Les cellules Gram positifs paraissent être plus résistantes que les Gram négatifs ; cela est peut-être dû à la structure de la paroi cellulaire. Les cellules Gram positifs ont des parois plus épaisses qui procurent à la cellule une certaine protection contre le traitement ultrasonique (Messaouda et Amel, 2018 ; Gaoet al., 2014).

5.3. Ultrasons en technologies d'extraction

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction des matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les premières applications ont été liées à la détermination des métaux dans les aliments. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants (Chemat, 2009; Jadhavet al., 2009).

5.3.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction assistée par ultrasons a été utilisée sur un bon nombre de plantes aromatiques telles que l'artémise (Asfaw et al., 2005) et la lavande (Da Porto et al., 2009). Les rendements en huiles essentielles ont pu être augmentés. Concernant les épices on peut citer l'extraction de la vanilline à partir de gousses de vanille (Jadhavet al., 2009). La carvone a pu également être extraite des graines de carvi de façon plus pure, lors d'une extraction aux ultrasons (Chemat et al., 2004).

5.3.2. Extraction des antioxydants

De nombreuses études ont utilisées la méthode d'extraction assistée par ultrasons afin d'extraire les principes actifs des plantes, des fruits ou des légumes. En effet, les lycopènes de la tomate (**Liangfu et Zelong, 2008**), les anthocyanes de la framboise (**Chen *et al.*, 2007**) et les composés phénoliques de la fraise (**Herrera et Luque de Castro, 2005**) et de la noix de coco (**Rodrigues *et al.*, 2008**) ont été extraits avec l'utilisation des ultrasons.

Chapitre III : matériel et méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes**1. Matériel végétal**

Cette étude a été réalisée sur les feuilles d'une plante nommée *Crataegus monogyna* (**Figure 4**) appartenant à famille des rosacées.



Figure 4 : Feuilles de *Crataegus monogyna*

1.1. Récolte

Les feuilles de *C. monogyna* ont été récoltées au mois d'avril 2022 à Timanachine wilaya de Bejaïa, durant la floraison.

1.2. Lavage et Séchage

Après la récolte *C. monogyna* a été débarrassée des mauvaises herbes, puis lavée avec de l'eau du robinet afin de se débarrasser de toutes poussières. Les feuilles ont été séchées dans une étuve (NURE FN 400P, Turquie) à une température de 40°C pendant une période de 3 jours, jusqu'à stabilisation de leurs poids.

1.3. Broyage et Tamisage

Les feuilles séchées ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (ISOLAB Laborgeräte GmbH, France). Les particules obtenues après le broyage, sont tamisées à l'aide des tamiseurs manuels de 250 µm et 500 µm de diamètre d'ouverture afin d'obtenir des poudres fines et homogènes (nous avons utilisé la poudre obtenue du tamis 250 µm après l'avoir tamisée une deuxième fois avec le tamis 500 µm). Cette dernière est conservée dans une boîte hermétique en verre dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

2. Analyses phyto-chimiques

2.1. Détermination de l'humidité

La teneur en humidité de la plante est déterminée par la méthode de séchage. 2 gdes feuilles fraîches de *C. monogyna* ont été placés dans une étuve à $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 2 heures. Le test a été répété 3 fois.

Le taux d'humidité (H%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{p_2 - p_0}{p_1} \times 100 \text{ ; Où}$$

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

P₀ : poids de boîte de pétri vide en gramme ;

P₁ : Poids de l'échantillon en gramme avant séchage ;

P₂ : Poids de boîte de pétri et de l'échantillon après séchage en gramme (N'Guessanet *al.*, 2019).

2.2. Taux de cendres

Le taux de cendre relève de l'existence des éléments minéraux puisés dans le sol par la plante. Il est basé sur l'élimination des matières organiques d'un échantillon par calcination à température définie durant un temps donné. Il correspond au rapport de la masse du résidu obtenu après calcination à la masse initiale de l'échantillon, exprimé en pourcentage (%). Il consiste à déterminer par pesée les masses de l'échantillon avant et après calcination (Ngargueudedjimet *al.*, 2015).

Le taux de cendres a été déterminé selon la méthode décrite par (Letermeet *al.*, 2006).

1gde poudre sèche de *C. monogyna* été prélevé et mit dans un creuset préalablement taré. L'ensemble (creuset et échantillon) a été placé dans un four à moufle (Nabertherm, Allemagne) à une température de 450°C pendant 6 heures. Après 6 heures, l'ensemble est retiré

du four et déposé dans un dessiccateur pour le refroidissement ensuite la pesée est effectuée. Le test a été répété 3 fois.

Le taux de cendre est donné par la formule suivante :

$$\text{TC \%} = \frac{P_2 - P_0}{P_1} \times 100 ; \text{ ou}$$

TC % : Taux de cendre exprimé en pourcentage ;

P₀ : poids du creuset vide en gramme ;

P₁ : poids de l'échantillon avant la calcination en gramme ;

P₂ : poids finale du creuset et du résidu de l'échantillon calciné en gramme.

2.3. Dosage des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes de la plante étudiée a été réalisé selon la méthode décrite par **Sass-Kisset al. (2005)**. 1 g de poudre de *C. monogyna* a été introduit dans un bécher de 50ml couvert d'aluminium contenant un volume de 20ml du mélange n-hexane/acétone/éthanol (2 : 1 : 1) (v/v/v). Le mélange (solvant, poudre) est soumis à une agitation pendant 10 minutes à l'abri de la lumière. Après cette période, les deux phases ont été séparées et la même procédure a été effectuée sur la phase solide.

Après filtration, les extraits obtenus ont été récupérés dans une ampoule à décanter. Un volume d'hydroxyde de sodium (KOH) à 10% préparé avec l'éthanol a été ajouté afin de décanter les chlorophylles (**Cui et al., 2004**) puis le mélange a été lavé avec de l'eau distillée. La phase hexanique (de couleur jaune) a été récupérée et son absorbance a été déterminée à 450nm.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec le β-carotène afin de déterminer la teneur en caroténoïdes (**Annexe 1**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent β-carotène/gramme de matière sèche (mg Eq β-car/g MS).

3. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

3.1. Model expérimental

Afin d'optimiser les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de *C. monogyna*, un plan d'expérience à 15 tests dont trois points centraux a été réalisé à l'aide d'un logiciel StatgraphicsCenturion XVI (StatpointTechnologies, USA). Trois variables indépendantes : le temps d'extraction (10, 35, 60 min), la température (20, 40, 60°C) et la concentration en solvant (%en éthanol) (0, 50, 100%) ont été étudiées. Ainsi trois réponses qui sont la teneur en polyphénols totaux (TPT) (mg EAG/g MS), le piégeage du radical ABTS (mmol ET/g MS) et le piégeage du radical libre DPPH (μg EAG/ml) ont été déterminées (**Tableau I**).

L'optimisation des conditions d'extraction est réalisée avec la méthode de surface de réponse (RSM) et le plan mathématique de Box-Behnken(**Jeganathan et al.,2014**).

Tableau I:Plan d'expérience utilisé pour l'extraction des composés phénoliques de *C. monogyna*.

Test	Température (°C)	Temps (min)	EtOH(%)
1	20	35	100
2	20	10	50
3	20	35	0
4	40	60	0
5	40	60	100
6	60	60	50
7*	40	35	50
8	20	60	50
9	60	35	100
10*	40	35	50
11	60	10	50
12*	40	35	50
13	40	10	0
14	60	35	0
15	40	10	100

* : Points centraux du plant d'expériences

3.2. Extraction des composés phénoliques par ultrason.

Dans cette étude la méthode d'extraction assistée par ultrasons a été utilisée pour l'extraction des composés bioactifs de *C. monogyna*. Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques des fréquences allant de 20 à 100 KHz pour l'extraction des composés bioactifs (Ghitescu *et al.*, 2015).

3.2.1. Principe

Le principe d'extraction assistée par ultrason consiste à la destruction des parois cellulaires par des fréquences d'ultrasons, ce qui permet une meilleure pénétration du solvant au cœur de la matière, et par conséquent un meilleur rendement d'extraction. Les fréquences utilisées sont généralement supérieures à 20 kHz. En milieu liquide, les ultrasons provoquent des cycles d'expansion et de compression des cellules formant ainsi des bulles. Le développement excessif des bulles microscopiques à proximité des parois cellulaires, entraîne une élévation de température et de pression, ce qui provoque l'explosion des bulles et la destruction des parois cellulaires (Wang *et al.*, 2006).

3.2.2. Mode opératoire

L'extraction des composés phénoliques totaux de *C. monogyna* a été faite par la méthode d'extraction assistée par ultrasons.

1 g de poudre des feuilles de *C. monogyna* a été introduite dans un petit flacon contenant 20 ml de solvant d'extraction (éthanol). Le mélange obtenu a été plongé dans un bain à ultrasons (BRANSONIC ULTRASONIC, Mexique) pendant un temps et une température d'extraction bien déterminés (**figure 5**) en respectant les conditions définies par le plan d'expérience regroupé dans le **Tableau I**. Par la suite le mélange est filtré et centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min. L'extrait récupéré (le surnageant) est stocké dans des flacons étiquetés, fermés et conservés dans un congélateur afin d'empêcher la dégradation des extraits.



Figure 5 : Bain à ultrasons utilisé pour l'extraction des composés phénoliques

3.3. Dosage des polyphénols totaux

3.3.1.Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est 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 (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Jeganathan *et al.*, 2014).

3.3.2. Mode opératoire

Le Folin-Ciocalteu a été utilisé pour estimer la teneur en polyphénols totaux selon la méthode décrite par (Nabet *et al.*, 2019). 30 μ l de chaque extrait ont été mélangés avec 1800 μ l d'eau distillée et 150 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu ont été ajoutés. Après une minute d'agitation, 450 μ l de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% ont été ajoutés avec 570 μ l d'eau distillée. Le mélange est incubé pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. La lecture des absorbances a été faite à 760 nm contre un blanc en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon).

Une courbe a été créée en utilisant l'acide gallique comme référence pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux (Annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS).

4. Détermination de l'activité antioxydante

4.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH

4.1.1. Principe

Les antioxydants réduisent le diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune (**figure 6**), le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

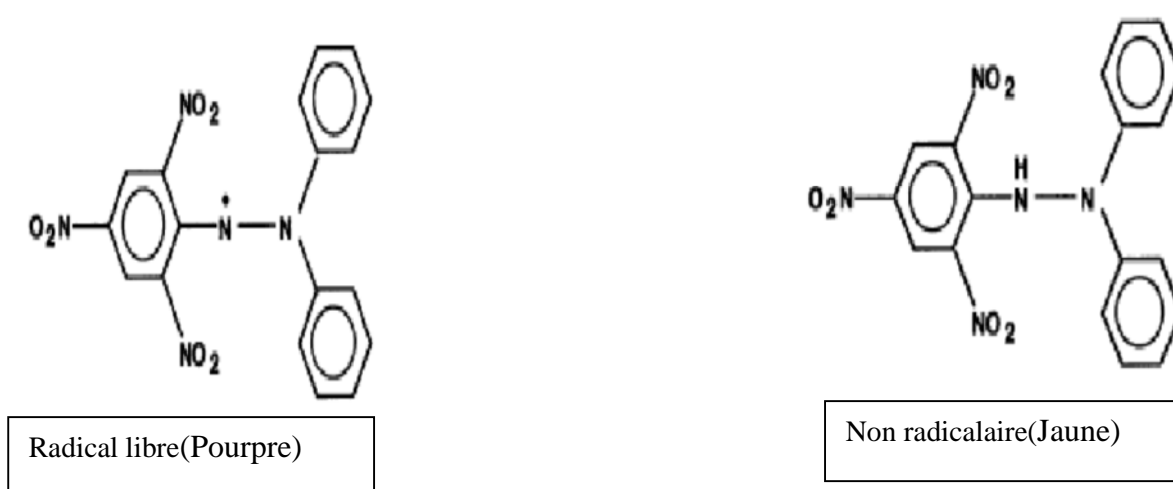


Figure 6 : Forme radicalaire et réduite du DPPH (**Mesrane ,2018**)

4.1.2. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des extraits de *C. Monogyna* sur les radicaux libres DPPH a été déterminé selon la méthode rapportée par (**Brand-Williams, 1995**). Un volume de 1450 µl de DPPH préparé avec du méthanol à une concentration de 6.10^{-5} mM est additionné à 50 µl de l'extrait à tester (dilué à 1/10). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30 min à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition (I%) des radicaux libres DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{\text{Abs témoin} - \text{Abs ech}}{\text{Abs témoin}} \times 100$$

Avec :

Abs témoin: Absorbance du témoin à T = 0 min ;

Abs ech: Absorbance de l'échantillon à T= 30 min.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec l'utilisation d'acide gallique (**Annexe 3**). Les résultats obtenus ont été exprimés en μg équivalent acide gallique (EAG)/ml.

4.2. Test de piégeage des radicaux cationiques ABTS^{•+}

4.2.1. Principe

La méthode de piégeage du radical ABTS^{•+} est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détermination de l'activité anti-oxydante. Elle est basée sur la neutralisation d'un radical cationique (**Jriet al., 2010**). Ce radical cationique est facilement formé par oxydation, en présence de persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) pour donner une solution colorée en vert-bleu (**Prouillac, 2006**). L'addition d'un antioxydant à la solution radicalaire d'ABTS^{•+} entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette dernière dépend de l'activité anti-oxydante des composés testés, du temps et de la concentration (**Reet al., 1999**).

4.2.2. Mode opératoire

L'activité antioxydante des extraits de *C. monogyna* obtenus par extraction assistée par ultrasons a été évaluée selon la méthode décrite par (**Reet al., 1999**). Une solution d'ABTS de 7mM a été préparée avec l'eau distillée. Les radicaux cationiques ABTS^{•+} ont été obtenus par le mélange de la solution d'ABTS avec la solution de persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) et laisser le mélange à l'ombre et à une température ambiante pendant 12 à 16h avant utilisation. Pour l'étude des composés phénoliques la solution d'ABTS^{•+} a été diluée avec une solution de phosphate de sodium à 5 mM et un pH de 7,4 jusqu'à l'obtention d'une absorbance de [0,68-0,72]nm.

2ml de la solution d'ABTS^{•+} ont été additionnés à 20 μL de l'extrait. Après 45 min d'incubation à 30°C, une lecture des absorbances à 734nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon).

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec l'utilisation du Trolox (**Annexe 4**). Les résultats ont été exprimés en mmol équivalent Trolox par gramme de matière sèche (m mol ET/g MS).

5. Dosage des flavonoïdes

5.1. Principe

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (**Bahorunet al., 1996**), est utilisée pour quantifier les flavonoïdes des extraits des feuilles de *C. monogyna*. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, La formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajoute du chlorure d'aluminium est due à la fixation des ions Al^{3+} sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Riberau-Gayon, 1968**). Ceci traduit le fait que le métal (Al^{3+}) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**figure 8**).

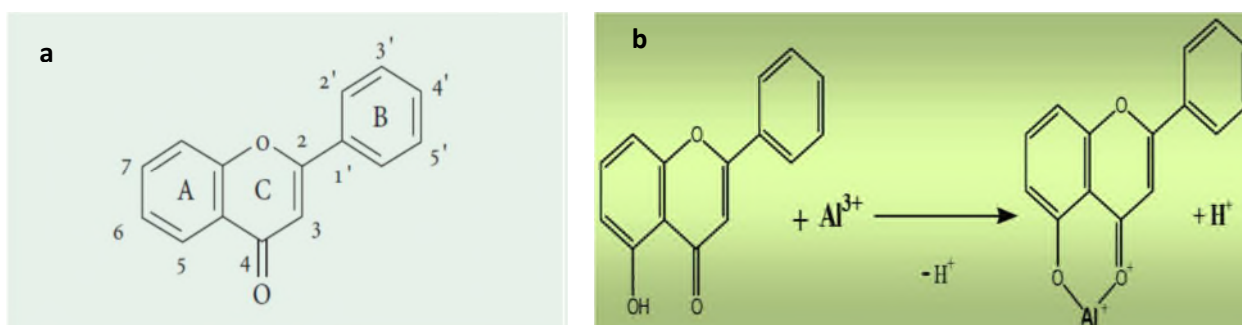


Figure 7: Structure de base des flavonoïdes et mécanisme de réaction d' Al^{3+} avec les flavonoïdes (**He et al., 2008**).

5.2. Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes de l'extrait des feuilles de *C. monogyna* obtenus dans les conditions optimales d'extraction avec le plan d'expériences a été estimée par un dosage colorimétrique selon la méthode décrite par (**Djeridane et al., 2006**). 500 μl de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 % (2g de chlorure d'aluminium ont été dissouts dans 100ml de méthanol) ont été additionnés au même volume (500 μl) de l'extrait (dilué 1/10). L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 40 nm, après un temps de contact de 15 minutes à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la quercétine comme standard pour déterminer la teneur en flavonoïdes (**Annexe 5**). Les résultats sont exprimés en mg équivalents quercétine par gramme de matière sèche de la plante (mg EQ/g MS).

6. Dosage des tannins condensés

6.1. Principe

Les tannins condensés, aussi appelés proanthocyanidines sont des polymères de flavanols (**Schofield et al., 2001**). La présence de nombreux groupes hydroxyphénoliques conduit à la formation de complexes avec des protéines, des ions métalliques et d'autres macromolécules. Ces composés sont généralement amorphes, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Quettier-Deleu et al., 2000**). En présence de sels ferriques les tannins condensés donnent des précipités brun-verdâtres (**Bruneton, 1999**). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en tannins dans l'échantillon (**Harbertson et al., 2010**).

6.2. Mode opératoire

La teneur en tannins condensés de l'extrait de *C. monogyna* obtenu dans les conditions optimales d'extraction ont été déterminées selon la méthode proposée par **Škerget et al. (2005)**.

0,5 ml de l'extrait (dilué 1/10) ont été mélangés avec 2 ml de la solution de sulfate ferrique acide $Fe_2(SO_4)_3$, préparée avec la dissolution de 77 mg de sulfate d'ammonium ferrique $NH_4Fe(SO_4)_2$ dans 500 mL du n-Butanol/HCl (3:2) (v/v). Le mélange a été incubé à 95°C pendant 50 minutes et l'absorbance est lue à 530 nm. Le blanc est réalisé avec une solution de butanol/HCl/ $FeSO_4$ à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon).

Les résultats sont déterminés à l'aide de la formule suivante en utilisant la cyanidine comme standard :

$$TC = \left[\frac{Abs \times PM \times FD}{(\epsilon \times L)} \right] ; \text{Où}$$

Abs : absorbance à 530 nm ;

PM : Poids moléculaire de la cyanidine égale à 287,24 g/mol ;

FD : Facteur de dilution ;

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de la cyanidine égale à 34700 l. mol⁻¹.cm⁻¹ ;

L : Largueur de la cuve (1cm).

Les teneurs en tannins sont exprimées en mg équivalent de cyanidine par g de matière sèche (mg EC/ g MS).

Chapitre IV :
Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion**1. Taux d'humidité :**

La teneur en humidité de *C. monogyna* est représentée dans la **Figure 8**.

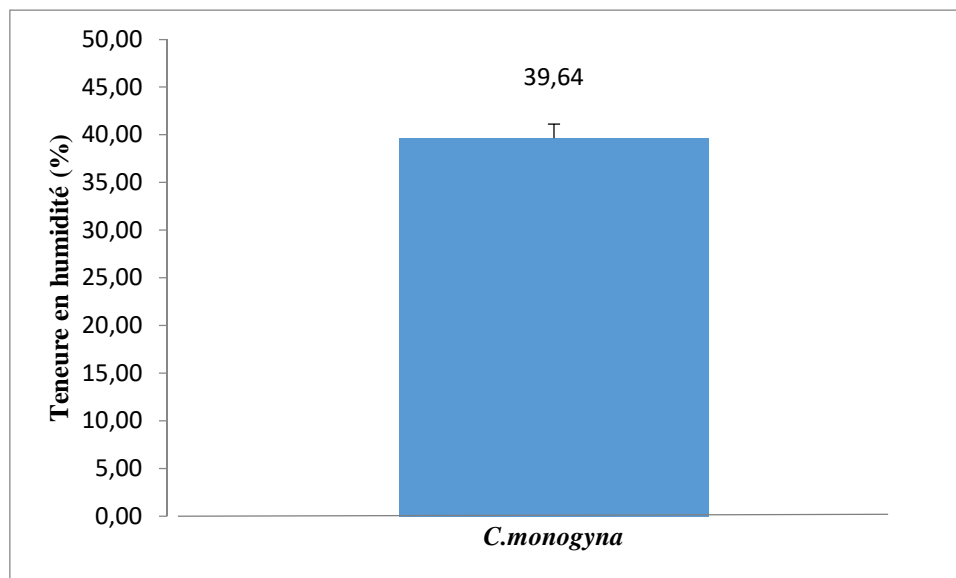


Figure 8: Teneur en humidité de *C.monogyna*

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau des feuilles de *C. monogyna*.

Les résultats montrent que le taux d'humidité est de $39,64 \pm 1,47\%$ du poids total des feuilles de *C. monogyna*. Ce qui signifie que 61,36 % représentent le taux de matière sèche. Pour assurer une bonne conservation des échantillons, l'eau contenue dans la matrice végétale doit être éliminée par la méthode de séchage sans toucher à leurs paramètres physicochimiques.

Boudraa et al. (2010) ont rapporté dans leur étude que les teneurs en eau des fruits des deux plantes *C. monogyna* et *C. azarolus* qui ont été récoltées au mois d'octobre dans la Daïra de N'Gaous et la Daïra d'AïnTouta (Wilaya de Batna) sont de $35,52 \pm 8,06\%$ et de $70,22 \pm 3,40\%$, respectivement.

La différence des teneurs en humidité peut être expliquée par la différence de plusieurs paramètres tels que l'espèce étudiée, la partie étudiée de la plante, la saison et la région de la récolte (**Boudraa et al., 2010**).

2. Taux de cendres

La teneur en cendres de *C. monogyna* est représentée dans la **Figure 9**.

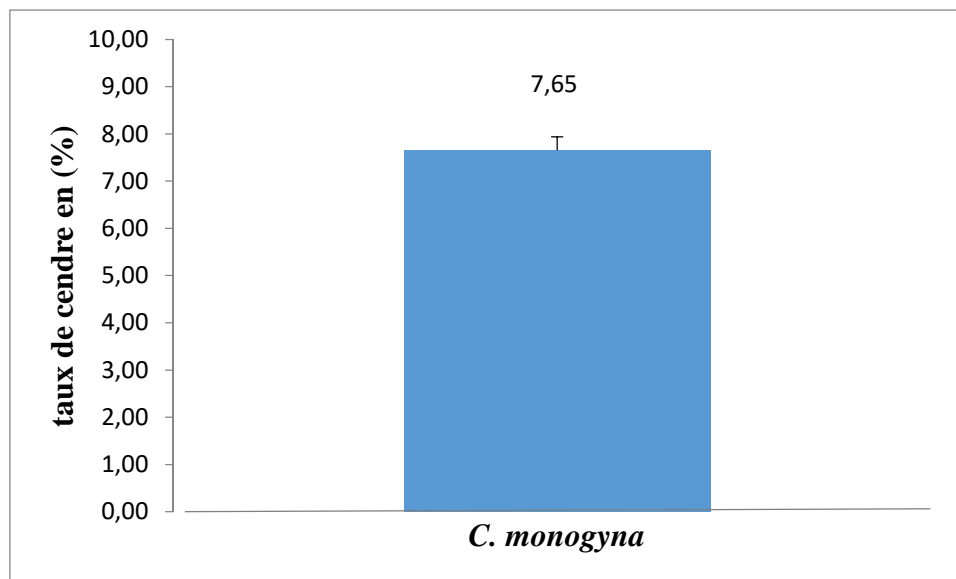


Figure 9: Teneur en cendres de *C.monogyna*.

La teneur en cendres représente la quantité totale en sels minéraux présent dans les feuilles de *C.monogyna*. Le taux de cendres des feuilles de *C. monogyna* est de $7,65 \pm 0,28\%$.

Boudraet al. (2010) ont rapporté dans leur étude que les teneurs en cendres des fruits des deux plantes *C. monogyna* et *C. azarolus* qui ont été récoltés au mois d'octobre dans la Daïra de N'Gaous et la Daïra d'AïnTouta (Wilaya de Batna) sont de $4,10 \pm 0,1\%$ et de $5,00 \pm 0,07\%$, respectivement.

Cette différence peut être expliquée par la différence de quelques paramètres tels que l'espèce étudiée, la partie étudiée de la plante ou la région de récolte, les facteurs environnementaux (**Boudraet al., 2010**).

3. Teneur en caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes des feuilles de la plante étudiée est représentée dans la **Figure 10**.

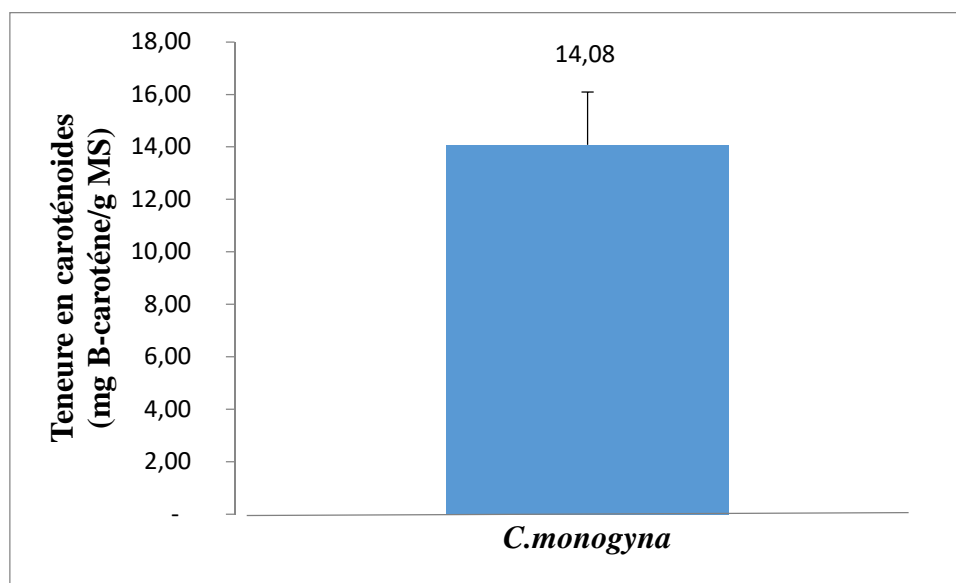


Figure 10: Teneur en caroténoïdes de *C. monogyna*.

La teneur en caroténoïdes d'extrait de *C. monogyna* obtenue est de $14,08 \pm 2,01$ mg β -carotène/g MS.

Antonio et al. (2015) ont rapporté que la teneur en caroténoïdes totaux des fruits de *C. mexicanus* récoltés au Mexique, est de $26,4 \pm 0,02$ mg β -carotène /g de poids frais.

Pérez-Lainez et al. (2019) ont montré dans leur étude sur 24 génotypes des fruits de *Crataegus* récoltés en septembre-octobre 2016 et 2017 au Mexique que les concentrations les plus élevées de caroténoïdes sont de $42,35$ μ g/g de poids frais.

Plusieurs auteurs rapportent que la teneur en caroténoïdes varie avec la variation de plusieurs paramètres tels que l'espèce étudiée, la méthode d'extraction utilisée, la période de récolte ou les conditions géographiques de la plante (**Antonio et al., 2015 ; Pérez-Lainez et al., 2019**).

4. Résultats d'optimisation d'extrait de *Crataegus monogyna* par ultrason

Le **Tableau II** représente un plan d'expérience à trois variables et les résultats de trois réponses étudiées des extraits de *C. monogyna* obtenus par ultrasons.

Tableau II : Plan d'expérience et résultats des réponses étudiées des extraits de *C. monogyna* obtenus par ultrasons.

Test	T (°C)	T (min)	EtOH (%)	TPT (mg EAG/g MS)	DPPH (µgEAG/ml)	ABTS (mmolET/gMS)
1	20	35	100	48,10±0,99	81,71±1,36	28,10± 2,08
2	20	10	50	81,77±4,13	81,89±1,33	64,68±1,47
3	20	35	0	20,86±0,04	27,12±2,27	17,81±0,17
4	40	60	0	15,18±0,56	12,13±1,20	16,12±0,84
5	40	60	100	35,97±1,33	64,62±1,54	28,92±0,34
6	60	60	50	87,97±2,78	81,74±0,86	60,58±4,21
7*	40	35	50	74,15±1,98	82,89±0,72	55,65±2,32
8	20	60	50	79,10±3,02	81,74±0,11	58,48±3,21
9	60	35	100	45,17±2,38	66,38±3,76	31,39±0,54
10*	40	35	50	80,27±1,88	81,04±2,94	69,91±2,44
11	60	10	50	76,82±3,23	80,9±2,21	58,51±1,72
12*	40	35	50	79,54±1,53	81,19±2,35	63,58±2,58
13	40	10	0	15,57±0,16	24,95±1,89	15,41±0,44
14	60	35	0	17,09±0,30	34,3±2,71	18,10±0,79
15	40	10	100	34,71±0,77	72,76±0,36	26,92±1,85s

* : représente les points centraux

4.1. Teneur en polyphénols totaux

La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *C.monogyna* est obtenue dans les conditions d'extraction suivantes : 60 °C, 60 min et 50% EtOH, avec une teneur de 87,97 mg EAG/g MS, Par contre, la plus faible teneur en polyphénols totaux est obtenue à 40 °C, 60 min, 0 % EtOH (test 4) et à 40 °C, 10 min, 0% EtOH (test 13) avec une teneur de 15 mg EAG/g MS (**Tableau II**).

L'étude statistique montre que le % EtOH possède un fort effet significatif positif sur la TPT, ainsi que l'effet quadratique de la température possède un effet significatif positif sur la TPT. De plus, l'effet quadratique du % EtOH possède un fort effet significatif négatif sur la TPT. Par contre, les deux variables la température et le temps d'extraction n'ont aucun effet significatif sur la TPT de l'extrait de *C.monogyna*(**Figure 11**).

La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *C.monogyna* qui est de 86, 47 mg EAG/g MS, proposée par le model ($R^2 = 99.33 \%$) dont les conditions optimales d'extractions sont : 60°C, 60 min et 56 % EtOH.

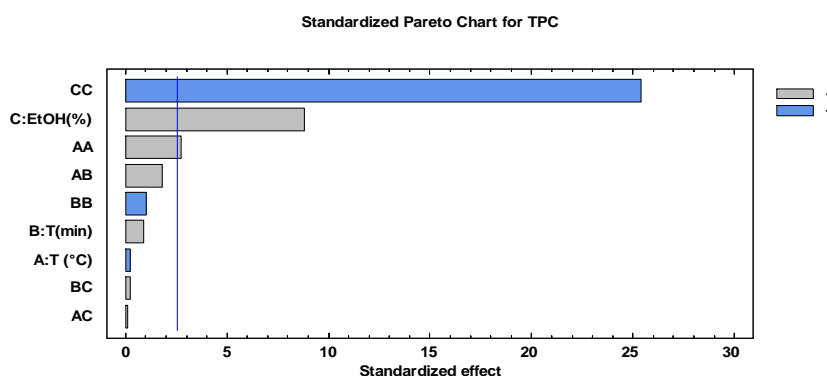


Figure 11 : Diagramme de Pareto des polyphénols de *C. monogyna*

Le résultat trouvé par **Pliszka et al. (2016)** montre que la teneur en composés phénoliques d'extrait d'acide citrique et d'extrait méthanolique à 80% des fruits de *C. monogyna* récoltés en Pologne est de $9,13 \pm 41,8$ mg EAG/100 g de poids frais et $6,02 \pm 17,0$ mg EAG/100 g de poids frais, respectivement.

Keser et al. (2014) ont montré dans leur étude que la teneur en composés phénoliques totaux des extraits aqueux et éthanoliques des fleurs de *C. monogyna* récoltés à Gaziantep en Turquie est de $72,54 \pm 2,58$ et $92,69 \pm 1,87$ mg quercétine /g de poids sec d'extrait, respectivement. La TPT des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles *C. monogyna* sont de $106,24 \pm 3,48$ et $86,88 \pm 1,85$ mg quercétine/g de poids sec, respectivement. Ainsi la TPT des extraits aqueux et éthanoliques des fruits *C. monogyna* sont de $70,58 \pm 1,66$ et $71,69 \pm 1,45$ mg quercétine/g de poids sec, respectivement.

Dans une autre étude ils ont trouvé que la teneur en composés phénoliques d'extraits méthanoliques de neuf échantillons des parties aériennes de *C. monogyna* récoltée pendant la floraison en mai 2011 à Madrid (Espagne) varie entre $117,72 \pm 0,01$ et $204,29 \pm 0,01$ mg EAG/g ES (**Abuashwashi et al., 2016**).

Ces variations des teneurs en polyphénols peuvent être expliquées par plusieurs facteurs tels que la partie de l'espèce étudiée, la méthode d'extraction, le temps et la température d'extraction, le solvant utilisé, l'âge de la plante, la période de récolte ou les facteurs environnementaux. (**Abuashwashi et al., 2016; Keser et al., 2014; Pliszka et al., 2016**).

4.2. L'effet sur le piégeage du radical libre DPPH

D'après les résultats de l'effet de piégeage du radical libre DPPH regroupés dans le **Tableau I**, on constate que les variables étudiées (temps, température et %EtOH) ont une influence sur l'effet de piégeage du radical DPPH des extraits de *C. monogyna*.

Le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH est obtenu à un temps d'extraction de 35 min, une température de 40°C et 50% EtOH, avec une teneur de 82,89 µgEAG/ml. Par contre, le plus faible effet de piégeage du radical libre DPPH sur *C.monogyna* est obtenu à 60 min, 40°C et 0% EtOH avec une teneur de 12,13 µgEAG/ml (**Tableau II**).

L'étude statistique montre que seulement la variable concentration en éthanol (% EtOH) qui possède une forte influence significative positive sur l'effet de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait de *C.monogyna*. Par contre, les deux autres variables étudiées n'ont aucun effet significatif sur l'effet de piégeage du radical libre DPPH (**Figure 12**).

D'autre part, l'effet quadratique du %EtOH possède un fort effet significatif négatif sur l'effet de piégeage du radical libre DPPH (**Figure 12**).

Le modèle ($R^2=98,99\%$) propose le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui est de 93,70 µgEAG/ml dont les conditions optimales d'extraction sont : 29min, 20 °C et 71% EtOH.

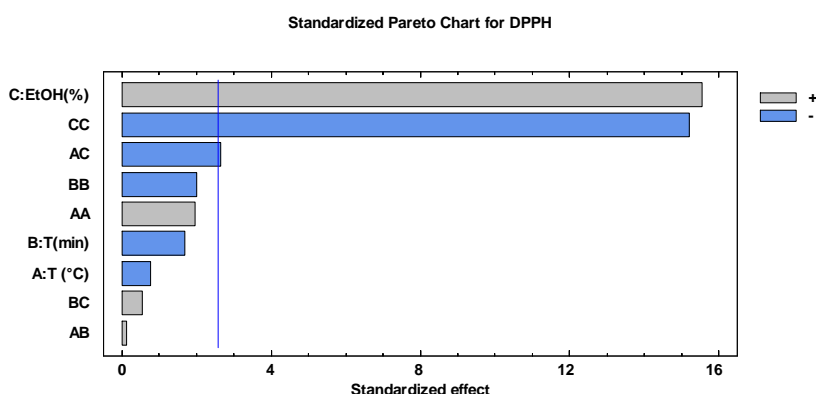


Figure 12 : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de *C. monogyna*

Il existe aussi une interaction entre le temps et la température d'extraction lors de l'étude de la réponse de l'effet de piégeage du radical DPPH. Dans le cas où le temps d'extraction est fixé à 10 min et à 20 °C on obtient le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui est de 85 µgEAG/ml. Par contre, lorsque le temps d'extraction est de 60 min et à 20 °C, l'effet de piégeage du radical libre DPPH obtenu est moins important (80 µgEAG/ml).

Par contre, Lorsque le temps d'extraction est de 10 min ou de 60 min, l'augmentation de la température de 20°C jusqu'à environ 50 °C ne fait que diminuer l'effet de piégeage du radical DPPH et l'obtention d'un optimum aux alentours de 50°C et au-delà de cette température l'activité antioxydante augmente (**Figure 13**).

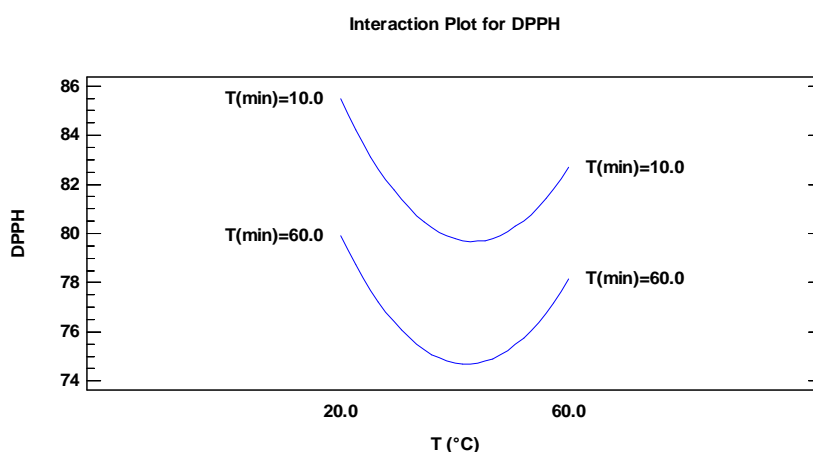


Figure 13 : Interaction entre le temps et la température et leur effet sur le piégeage du radical DPPH de l'extrait de *C. monogyna*

Simirgiotiset al. (2013) ont montré que l'effet de piégeage du radical libre DPPH (IC_{50}) de l'espèce *C. monogyna* est de $3,61 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ pour les fruits et de $3,34 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$ pour la partie aérienne.

L'effet de piégeage du radical libre DPPH (IC_{50}) dans neuf échantillons (parties aériennes) de la même espèce récoltée pendant la floraison en mai 2011 à Madrid (Espagne) est appartenant à $2,67 \pm 0,14 - 3,76 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$ (**Abuashwashi et al., 2016**).

Un taux de piégeage du radical libre DPPH d'extrait d'acide citrique et d'extrait méthanolique à 80% des fruits de *C. monogyna* est de 90% et 85%, respectivement (**Pliszka et al., 2016**).

4.3. L'effet sur la piégeage du radical libre ABTS

Le plus fort effet de piégeage du radical libre ABTS est obtenu à un temps d'extraction de 35 min, une température de 40°C et 50 % EtOH, avec une teneur de 69,91 mmol ET/g MS. Par contre, le plus faible effet de piégeage du radical libre ABTS de l'extrait de *C. monogyna* est obtenu à 10 min, 40°C et 0% EtOH avec une teneur de 15,41mmol ET/g MS (**Tableau II**).

L'étude statistique montre que seulement la concentration en solvant (%EtOH) qui possède un effet significatif positif sur l'effet de piégeage du radical ABTS de l'extrait de *C. monogyna*. Par contre, les deux autres variables étudiées n'ont aucun effet significatif sur l'effet de piégeage du radical ABTS. De plus, l'effet quadratique de % EtOH montre un fort effet significatif négatif sur l'effet de piégeage du radical ABTS (**Figure 14**).

Le plus fort effet de piégeage du radical libre ABTS qui est de 63,60 mmol ET/g MS, obtenu par le model ($R^2= 98,09$) dont les conditions optimales d'extraction sont : 22,62 min, 20 °C et 53,26 % EtOH.

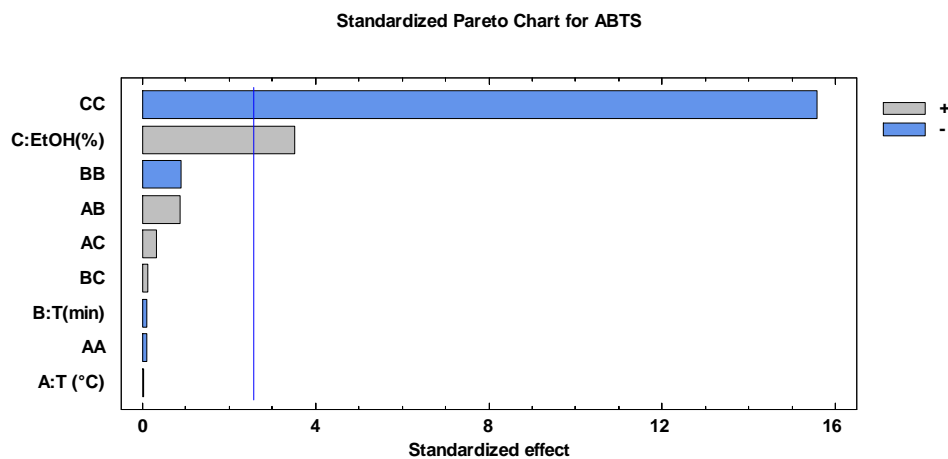


Figure 14 : Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait de *C. monogyna*

Il existe une interaction entre le temps et la température d'extraction lors de l'étude de la réponse de l'effet de piégeage du radical ABTS de l'extrait de *C. monogyna*. Le plus fort effet de piégeage du radical ABTS de l'extrait de *C. monogyna* est obtenu dans les conditions suivantes (10 min, 20 °C) et (60 min, 60 °C) avec une teneur de 63 mmol ET/g MS (**Figure 15**). Lorsque la température varie de 20 à 60°C l'effet de piégeage du radical ABTS augmente dans le cas où le temps est fixé à 60 min. par contre, on obtient l'effet inverse lorsque le temps est fixé à 10 min (**Figure 15**).

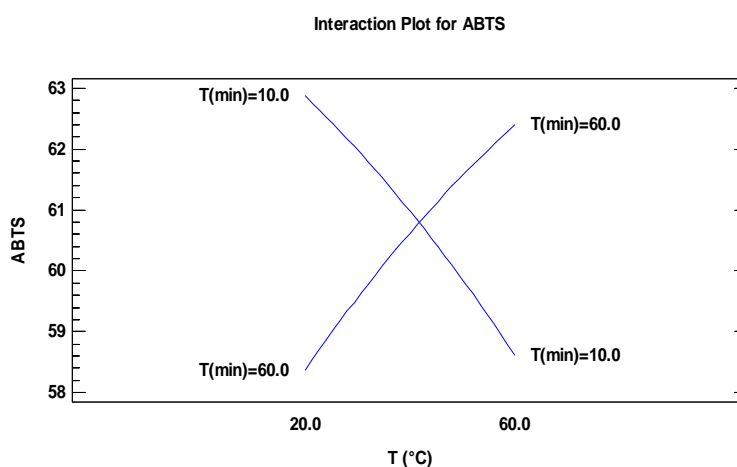


Figure 15 : Interaction entre le temps et la température et leurs effets sur le piégeage du radical ABTS

Keseret al. (2014) ont rapporté dans leur étude que les extraits aqueux des fleurs, des feuilles et des fruits mûrs de l'espèce *C.monogyna* récoltée en Turquie possède un effet de piégeage de radical ABTS de $97,50 \pm 0,57$; $97,30 \pm 0,82$ et $50,76 \pm 0,66\%$, respectivement. Par ailleurs, les extraits éthanoliques des fleurs, des feuilles et des fruits mûrs de la même espèce montrent une capacité antioxydante de $97,90 \pm 0,71$; $97,60 \pm 0,46$ et $52,50 \pm 0,56\%$ des extraits éthanoliques pour les trois parties de la plante.

Le piégeage des radicaux ABTS des extraits méthanolique à 80% et d'acide citrique de *C. monogyna* est de 55% et 52%, respectivement (**Pliszka et al., 2016**).

4.4. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *C. monogyna*

Au niveau du **Tableau III** sont regroupés les résultats prédits et les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de *C. monogyna* par la méthode d'extraction assistée par ultrason qui sont : une température de 20 °C, un temps d'extraction de 22 min et un pourcentage de 54% en éthanol.

Tableau III : Résultats prédits et les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de *C. monogyna*.

Réponses	Résultats prédits	Résultats expérimentaux	% RSD
TPT (mg EAG/g MS)	85,00	69,55± 10,92	14,14
DPPH (µg EAG/mL)	89,64	76,54± 9,29	11,15
ABTS (mmol Trolox/g MS)	63,57	62,82±0.53	0,84

Le modèle propose un facteur de désirabilité de 0,95 % (**Figure 16**) avec une teneur en polyphénols totaux de 85 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 89,64 µg EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 63,57 mmol Trolox/g MS. Ces teneurs sont proches à celles trouvées dans l'expérimentale. Par conséquent le modèle proposé par le logiciel Statgraphics (20°C, 22 min et 54% EtOH) est validé.

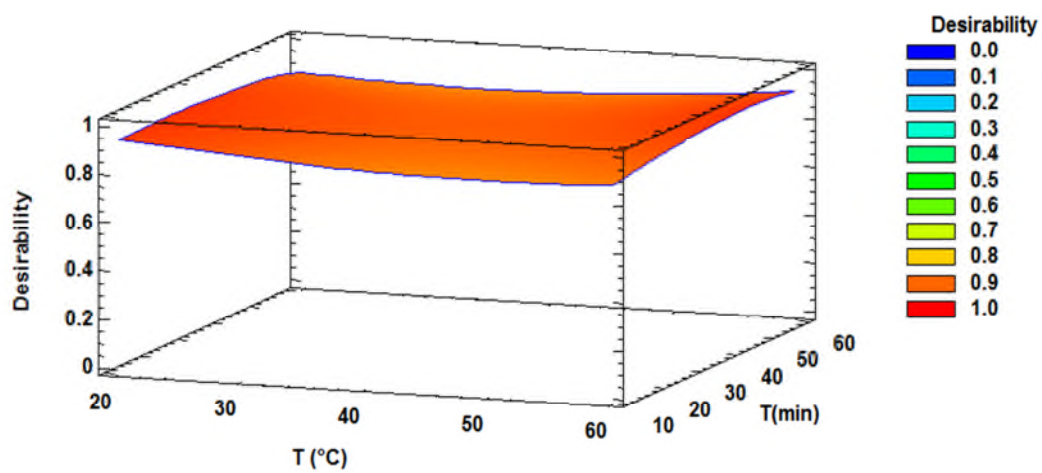


Figure 16: Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets de température et de temps sur la désirabilité de l'extrait de *C. monogyna* obtenu par extraction assistée par ultrason

5. Teneur en flavonoïdes

Le résultat de la teneur en flavonoïdes de *C. monogyna* est regroupé dans la **Figure 17**.

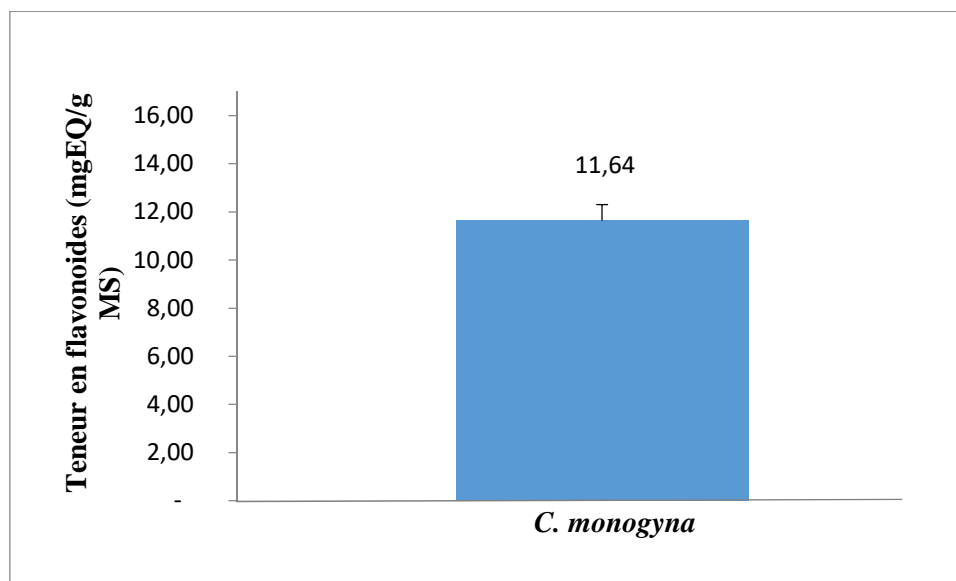


Figure 17: Teneur en flavonoïdes de *C. monogyna*

La teneur en flavonoïdes de l'extrait optimisé (obtenu dans les conditions optimales d'extraction) des feuilles de *C. monogyna* obtenue dans notre étude est de $11,64 \pm 0,66$ mg EQ/g MS.

Abuashwari et al. (2016) ont rapporté dans leur étude que les extraits méthanoliques des fleurs et de la partie aérienne de *C. monogyna* ont une teneur en flavonoïdes de $8,77 \pm 0,00$ mg EQ/g MS et de $64,9 \pm 0,00$ mg EQ/g MS, respectivement.

Une autre étude rapporte que l'extrait méthanolique à 90% des feuilles de la même espèce récoltée à Bejaïa possède une teneur en flavonoïdes de $36,35$ mg /g MS (**Mekhoukheet et al., 2016**). Ces résultats sont supérieurs à celui rapporté dans notre étude.

En outre, **Kostic et al. (2012)** ont rapporté les teneurs en flavonoïdes de différents extraits préparés à partir des fruits frais de *C. oxycantha* : $0,560 \pm 0,000$ mg EQ /g de poids frais pour l'extrait éthanolique ; $0,556 \pm 0,023$ mg EQ /g de poids frais pour l'extrait éthanol-eau ; $0,990 \pm 0,038$ mg EQ /g de poids frais pour l'extrait méthanolique ; $0,855 \pm 0,033$ mg EQ /g de poids frais pour l'extrait méthanol-eau ; $0,766 \pm 0,047$ mg EQ/g de poids frais pour l'extrait aqueux.

6. Teneur en tannins condensés

La teneur en tannins condensés de l'extrait de plante étudiée est présentée dans la **Figure 18**.

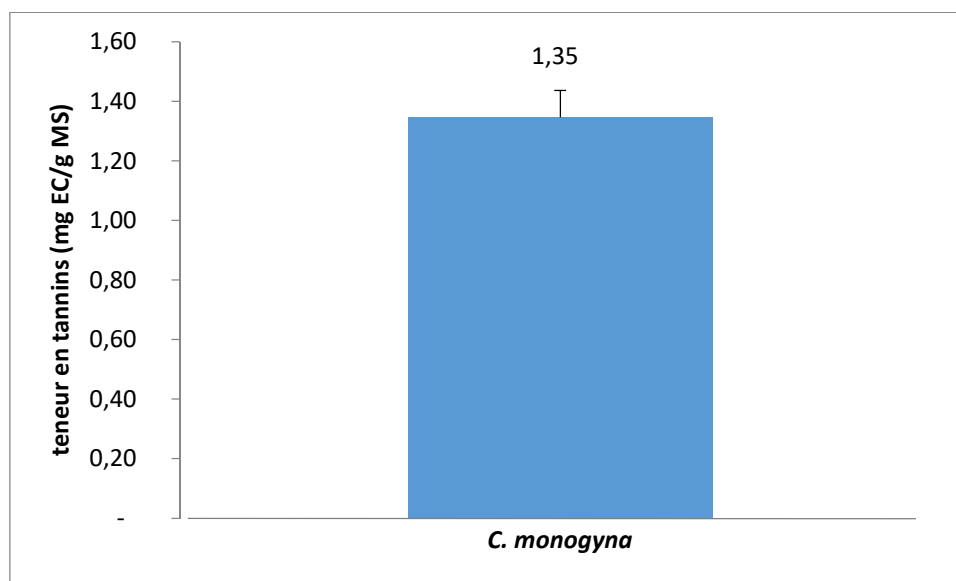


Figure 18: Teneur en tannins condensés de *C. monogyna*

Le résultat de la **Figure 18** indique que la concentration en tannins condensés contenue dans l'extrait optimisé de *C. monogyna* est de $1,35 \pm 0,09$ mg EC/g MS.

La teneur en tannins condensés de l'extrait méthanolique à 99% des feuilles de *C. monogyna* récoltée à Bejaïa est de 10,73 mg/g MS **Mekhoukheet al. (2016)** Cette teneur est neuf fois supérieure à celle trouvée dans notre étude.

Bonomoet al. (2020) ont rapporté dans leur étude que l'extrait éthanolique à 55% de *C. oxyacantha* possède une teneur en tannins condensés de $342,76 \pm 19,73$ mg d'acide tannique/100ml d'extrait.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a pour but l'optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *C. monogyna* obtenus par la méthode d'extraction à ultrason en utilisant un plan d'expérience avec trois variables et l'étude de trois réponses.

Les teneurs en humidité et en cendres retrouvées dans les feuilles de *C. monogyna* sont de $39,64 \pm 2,30\%$ et $7,65 \pm 0,28\%$, respectivement.

L'extrait de *C. monogyna* possède une faible teneur en caroténoïdes qui est de $14,08 \pm 2,01$ mg β -carotène/g MS.

La plus forte teneur en polyphénols totaux qui est de 86,47 mg EAG/g MS, proposée par le plan d'expérience Box-Benken pour l'extrait de *C. monogyna* dont les conditions optimales sont : 60°C, 60min et 56% EtOH.

Le plan Box-Benken propose le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui est de 93,70 μ g EAG /ml de l'extrait de *C. monogyna* dont les conditions optimales sont : 29 min, 20 °C et 71% EtOH.

Le plus fort effet de piégeage du radical libre ABTS de l'extrait de *C. monogyna* est de 63,60 mmol ET/g MS, proposée par le plan d'expérience Box-Benken dont les conditions optimales sont : 22,62 min, 20°C et 53,26 % EtOH.

L'optimisation des réponses de surfaces multiples d'extrait de *C. monogyna* a permis d'identifier les conditions optimales d'extraction qui sont : 20°C, 22 min et 54% EtOH. Ces derniers permettent d'avoir une teneur en polyphénols totaux de 85 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 89,64 μ g EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 63,57 mmol ET/g MS.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait optimisé de *C. monogyna* est de $11,46 \pm 0,66$ mg EQ/g MS.

La teneur en tannins de l'extrait optimisé de *C. monogyna* est de $1,35 \pm 0,09$ mg EC/g MS.

En termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- ✓ D'étudier d'autres facteurs et conditions qui pourraient influencer l'optimisation de l'extraction des CPT telle que la fréquence des Ultrasons,
- ✓ Détermination de la composition chimique de l'extrait optimisé de *C. monogyna* par LC/MS,
- ✓ Utilisation d'autres méthodes d'extraction (micro-onde),
- ✓ Utilisation d'autres solvants d'extraction (méthanol),
- ✓ Etudier d'autres parties de la plante (fleur, fruit),
- ✓ Etudier d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire, antibactérienne, anticancéreux...),
- ✓ De faire une étude *in vivo* pour vérifier l'efficacité des antioxydants dans l'organisme et de démontrer la possibilité et le mode de son utilisation thérapeutique,
- ✓ Enrichir certaines denrées alimentaires avec l'extrait de la plante et l'évaluation de leur effet sur la conservation et la qualité microbiologique des aliments.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abuashwashi, M. A., Palomino, O. M., & Gómez-Serranillos, M. P. (2016).** Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2708-2713.
- Afia, S., Aliouche, D., & Guemghar, H.E. (2021).** Optimisation de l'extraction des antioxydants à partir d'huile de pistacia lentiscus L.
- Alidert, J., Ranjeva, R. & Boudet, M. A. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15: pp 279-301.
- Antonion, B. T. G., Margarita, C. R., & Daniel, M.I. (2015).** Biological properties and antioxidant activity of hawthorn *Crataegus mexicana*. *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics*, 6(4), 1.
- Apfel R.E., Holland C.K. (1991).** Gauging the likelihood of cavitation from shortpulse, lowduty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 17, 179-185.
- Asfaw N., Licence P., Novitskii A. A. Poliakoff M. (2005).** Green chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of clean technology with conventional methodology. *Green Chem.* 7, 352-356.

B

- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzeimittel-Forschung*,
- Bardeau, F. (1977).** La pharmacie de bon dieu. Fernand lanore.
- Benamor, B (2008).** Maîtrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans les Opérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle.
- Bensakhria, a. (2018).** Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.

- Borthwick, K.A.J., Coakley, W.T., McDonnell, M. B., Nowotny, H., Benenes, E., & Gröschl, M. (2005).** Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *Journal of microbiological methods*, 60(2),207-216.
- Boubekri, Ch. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. *Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider – Biskra*, p 24.
- Boucher R. M. G. (1970).** Sonochemistry at low and high ultrasonic frequencies. *British Chem. Engin.* 15, 363-367.
- Boudraa, S., Hambaba, L., Zidani, S., & Boudrara, H. (2010).** Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Zizyphus lotus* L, 65(2), 75-84.
- Bourgou, S., SerairiBeji, R., Medni, F., and Ksouri, R. (2016) :** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbiahelioscopia. *Journal of new sciences.*, 28(12), 1649-1655.
- Brand –Williams., Cuvelier, M.E., & Bercet, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Brasseur, L., Therond, P., & Legrand, A. (1995).** Pouvoir antioxydant total du plasma. *Act. Pharm. Bid. Clin.* 8: pp 239-244.
- Bravo, L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56 (11): pp 317-333.
- Brouillard, R. & Délaporte, B. (1997).** *J.Am. Chem. Soc.* 1999. pp 8461-8468.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3ème édition. TEC et DOC : *Lavoisier*, Paris.

C

- Cao, G. H., Alessio, H. M. & Cutler, R. G. (1993).** Oxygen–radical absorbency capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 14: pp 303-311.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005).** Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, 92, 491–497.
- Chemat, F. (2009).** « Essential oils and aromas: green extraction and applications ». HKB Publishers, Dehradun, India.

- Chemat S., Lagha A., Aitamar H., Bartels P.V., Chemat F. (2004).** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Frag. J.* 19, 188–195.
- Chen F., Sun Y., Zhao G., Liao X., Hu X., Wu J., Wang Z. (2007).** Optimization of ultrasound assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrason. Sonochem.* 14, 767-78.
- Cheung H. M., Kurup S. (1994).** Sonochemical Destruction of CFC 11 and CFC 113 in Dilute Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1619-1622.
- Corona, G. (2011).** Seaweed polyphénols: bioavailability and Healthy benefits. *Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction*, p 5.

D

- D'alessandro, I. G., Dimitrova, K. K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014).** Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from aronia melanocarpa (black chokeberry) wastes. *Chemical engineering research and design*, 92(10), 1818-1826.
- Da Porto, C., Decorti, D & Kikic, I. (2009).** Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L., to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem.* 112, 1072-1078.
- Dinesh, K., Vikrant, A., Zulfi qar, A.B., Nisar, A K & Deo, N.P. (2012).** The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy.* The genus *Crataegus*: chemical and Aop05712. ISSN 0102-695X.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.

F

- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, pp 108-115.
- Frankel, E. N., Water house, A. L. & Teissedre, P. L. (1995).** *Agric. Food. Chem.* 43: pp 221-235.

G

- Gao, S., Lewis, G.D., Ashokkumar, M., & Hemar, Y. (2014).** Inactivation of microorganism by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), 454-460.
- Gerschman, R. (1981).** Historical introduction to the »free radical theory« of oxygen toxicity. In *Oxygen and living Processes* (pp.44-45). Springer, New York, NY.
- Ghazi, F. & Sahraoui, S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia. *Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach*.
- Ghitecu, R. E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A. M., Gilca, I. A. et Popa, V. I. (2015):** Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 535–541.
- Girre, L. (2000).** "Les plantes médicinales". Ouest-France (Éd). Rennes. 30p.
- Glavind, J. & Holmer, G. (1967).** Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 44(9): pp 539-542.
- Golmohamadi, A., Moller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013).** Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1316-1323.
- Gordon, M. H. (1990).** The mechanism of antioxidant in vitro. "*Food antioxidants*": Ed. HUDSON B.J.F. pp 1-18.
- Gourguillon, L., Destandau, E., Lobstein, A., & Lesellier, E. (2016).** Comparison of different ways to extract dicaffeoylquinic acids from a halophytic plant. *COMPTES RENDUS CHIMIE*;19(9):1133-41.

H

- Hadi, M. (2004).** La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur*, p 155.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10).

Harbertson, J., Kennedy, J., & Doug, A. (2010). Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1): 54-59.

Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 257-266.

He F., Pan Q.H., ying S., & Chang-Qing D. (2008). "Biosynthesis and Genetic Regulation of proanthocyanidins in plants. *Molécules*", 13: 2674-2703.

He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annuals Review Food Science Technology*, 1, 163–87.

Herrera M.C., & Luque de Castro M.D. (2005). Ultrasound-assited extraction of phenolic compound from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode arrayn ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*. 1100, 1-7.

Himed, L. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à lamargarine. *Thèse de Magister, Université Mentouri–Constantine*, p 13.

I

Izella, S. (2009). Cavitation par excitation bi fréquentielle : application à la thrombolyse Ultrasonore. Thèse de doctorat. École doctorale mécanique, génie civil & acoustique, 102p.

J

Jadhav D., Rekha B. N., Gogate P. R., & Rathod V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *J. Food Engin.* 93, 421-426.

Jakupovic, J., Paredes, L., Bohlmann, F., & Watson L. (1988). Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochemistry*. 27(10): p 3273.

Jeganathan, P. M., Venkatachalam, S., Karichappan, T & Ramasamy, S. (2014). Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from redgrapesusing Box–Behnken design. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(1), 56-67.

Jiri, S., Marketa Olga, K., Petr, S., Vojtech, J., Libuse, T., Ladislav, H., Miroslava, B., Josef, Z., Ivo, P., et Rene, K. (2010). Fully Automated Spectrophotometric Protocols

for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*, 15: 8618- 8640.

Joshi, L. S., & Pawar, H. A. (2015). Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research*, 3, 1-8.

K

Kapustina O.A. (1973). "Degassing of Liquids, Physical Principles of Ultrasonic Technology, Chapter 5, ed. L.D. Rozenberg Plenum Press, New York, U.S.A.

Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, Ö., & Turkoglu, I. (2014). The investigation of some bioactive compounds and antioxidant properties of hawthorn (*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* Jacq). *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 3(2), 51.

Kim, D. k. & Lee, C.Y. (2004). Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: pp 253–273.

Korkina, L., De Luca, C. & Pastore, S. (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1259: pp 77-86.

Kositic, d. a, velickovic, j.m., Mitic, s. s., Mitic, m.n. & Randelouic, S. S. (2012). Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus Oxyacantha L (Rosaceae)* Fruit Extract from Southeast Serbia tropical journal of pharmaceutical reserch, 11(1),117-124.

Kostova, I. and Iossifova, T. (2007). Chimiical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* 2007, 78: 85-106.

Kunkel G., (1984). Plants of Human Consumption. ISBN 387429216

L

Leighton T.G. (1994). « The Acoustic Bubble ». Academic Press, London, U.K.

Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125(2): pp 288- 306.

- Li, C., Oldham, C. D., & May, S. W. N. (1994).** N-Dimethyl-1,4- phenylenediamine as alternative reductant for peptidylglycine-amidating mono-oxygenase catalysis. *Journal of Biochem.* 300: pp 31-36.
- Li, P., Hopia, A., Jaris, S., Teijo, Y. & Heikki, V. (1999).** TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. *Chemistry and Nutrition*, 10: pp 123-187.-
- Liangfu Z., & Zelong L. (2008).** Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* 15, 731-737.
- Lieutaghi, P. (2004).** Le livre des arbres, arbustes & arbrisseaux.
- Lobstein, A. (2010).** Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K. V. & Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.* 1-4: pp 119-125.
- Lust J., (1983).** The Herb Book. ISBN 0-553-23827-2.

M

- Maamri, S. (2008).** Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. *Thèse de Magister, Université M'Hamed Bougara Boumerdes*, p 108.
- Magin, D.V., Lewin, G., Popov, I. N., Izmailov, Y. D. & Vladimirov, Y. A. (2000).** Photochemi-luminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems, Mathematic modeling. *Lavoisier*, p 419.
- Makino K., Mossoba M., Riesz P., (1982).** Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Evidence for hydroxyl and hydrogen free radicals (cntdot. OH and. cntdot. H) by spin trapping. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 12, 3537-3539.
- Manach, C. Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L., (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79(5): pp 727-747.-
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007).** Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. & Fritsch, P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20: pp 458-463.

- Martinelli, F., Perrone, A., Yousefi, S., Papini, A., Castiglione, S., Guarino, F., & Salami, S. A. (2021).** Botanical, phytochemical, anti-microbial pharmaceutical characteristics of hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), Rosaceae. *Molecules*, 26(23), 7266.
- Mason T. J. (1999).** Sonochemistry. Oxford Science Publications, New York, U.S.A.
- Mason T. J. (1999).** Sonochemistry, New York: Oxford Science Publications,. ISBN: 0 19 850371 7.
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002).** *Applied sonochemistry: the uses of power ultrasound in chemistry and processing* (Vol. 10). Weinheim: Wiley-Vch.
- Mathé, A. (2015).** Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, pp.1-12.
- Mekhoukhe A., Madani K., Chibane M., Brahmi N. (2016).** Étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits de quelques plantes médicinales de la région de Bejaia.
- Messaouda, A. D., & Amel, S. S. (2018).** *Stabilisation et amélioration des caractéristiques organoleptiques d'un jus d'orange par usage d'ultrason* (Doctoral dissertation).
- Mesrane, K. (2018).** *Optimisation de l'extraction assistée par l'ultrason des composés phénoliques du jujubier *Ziziphus lotus** (Doctoral dissertation (Université de Boura))
- Mohand A.Y. (2006).** "Plantes médicinales de Kabylie (préface du docteur Jean-Philippe Brette)." Ibis Press (Éd). Paris. 99-102p.

N

- N'Guessan, A., Any-Grah, S. A., Dally, I. L., Tuo, A., Lia, A. G., N'guessan, C., ... & Montaignes, B. (2019).** Formulation de comprimés à base de feuilles et de tiges d'*Artemisia annua*.
- Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E., & Mendiola, J.A. (2019).** Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops & Products*, 129, 395–404.
- Ngarguededjim, K., Ngarmaim, N., Bassa, B., Allarabeye, N., Annouar, D., Abdel-Rahim, M., ... & Fogue, M. (2015).** Caractéristiques physiques du bois Rônier (*Borassus aethiopicum* Mart., Arecaeae) 2-du Tchad/Afrique Centrale [Physical

characteristics of tall-palm (*Borassus Aethiopum* Mart., *Arecaceae*) of Chad/Central Africa]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(3), 553.

O

Oueslati, K. (2017). Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par chimie de fenton en milieu mimétique de la viande (doctoral dissertation, Université CLERMONT auvergne).

P

Peronny, S. (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (*Lemure Catta*). *Thèse de Doctorat*, Muséum national d'histoire naturelle, France. P22.

Pérez-Lainez, M. D., Corona-Torres, T., del Rosario García-Mateos, M., Winkler, R., Barrientos-Priego, A. F., Nieto-Ángel, R., ... & García-Velázquez, J. A. (2019). Metabolomic study of volatile compounds in the pigmented fruit from Mexico *Crataegus* genotypes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 92, 15-23.

Pico, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Tr AC Treuds Aral.Chem.*, 48: 84-99.

pittler, M. H., Schmidt, K., et Ernst, E., (2003). "Hawthorn extract for treating chronic heart failure: Meta-analysis of randomized trials". *American Journal of Medicine*, 114(8): 665-674.

Pöpping, S., Rose, H., Ionescu, I., Fischer, Y., & Kammermeier, H. (1995). Effect of a hawthorn extract on contraction and energy turnover of isolated rat cardiomyocytes. *Arzneimittel-forschung*, 45(11), 1157-1161.

Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., & Wierzbicka, E. (2016). Effects of solvents and extraction methods on the content and antiradical activity of polyphenols from fruits *Actinidia arguta*, *Crataegus monogyna*, *Gaultheria procumbens* and *Schisandra chinensis*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia alimentaria*, 15(1), 57-63.

Prouillac, C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organique et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro. *Thèse de doctorat*, Université Paul Sabatier Toulouse III, 254p.

Q

Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F., & Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and

antioxydant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35–42.

R

- Re R., Pellegrini N., Proteggente A, Panala A., Yanh M., ET Rice-Evans C. (1999).** Antioxydant activity applying and inapoved ABTS radical cation decolorization assay free radical biology and medicine, 26: 1231-1237.
- Rees, S. & Harbone, G. (1985).** The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochimie*. 24: pp 2225-2231.
- Ribereau, G. P. (1964).** Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. Veg., I.N.R.A.*
- Ribereau-Gayon. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques in : les composés phénoliques des végétaux. Ed. *Paris: Dunod*, p: 1-27.
- Riesz P., Kondo T. (1992).** Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology & Medicine*, 13, 247-270.
- Rodrigues S., Pinto G.A.S., Fernandes F.A.N. (2008).** Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 15, 95-100.

S

- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. (1995).** Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine*, 19: pp 481-486.
- Sanchez-Moreno C., (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 8: 121-137.46: 1086-1089.
- Sanchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: pp 121-137.
- Sartori-Thiel, A. (2003).** Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: p 177.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphénols. *American Journal of Clinical Nutrition*. 130: pp 2073-2085.

- Schofield P., Mbugua D-M., Pell A N., (2001).** Analyses of condensed tannins: a review. *Animal Food and Technology*, 91: 21-40.
- Schroder, D., Weiser, M., Klein, P., (2003).** "Efficacy of a homeopathic Crataegus preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency: results of an observational cohort study". *Eur. J. Heart. Fail.*, 5: 319-26.
- Sébastien, V. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation - Chapitre 4 : Enrichissement exogène de l'huile d'olive par ultrasons. Thèse de doctorat, Université d'Avignon, France.
- Simirgiotis, M. J. (2013).** Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*, 18(2), 2061-2080.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., & Simoni, M. (2005).** Phenols, n proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89,191-198.
- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J. & Wojdylo, A. (2007).** Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, 103: pp 853-859.
- Sun, G., Khtan, B., Huang, S., Whiteman, M. & Zhu, Y. (2002).** Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco.* 23: pp 1142-1151.
- Svoboda, K. P. & Hampson, J. B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidants, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, U.K., KA6 5HW.*

T

- Tan, K. S., Tosont, T., Masuda, Y. & Kamisaca, S. (1992).** Involvement of cell Wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth Rat and cell wall extensibility of *Oryza coleoptles*. *Plant cell physiol.* 30: pp 103-108.
- TROTIN, F. (2001).** l'aubépine : mode d'action, emplois. *Nutri-et phytothrapie. Dveloppements rcents-2,17.*

U

Uchiyama, M., Suzuki, Y., & Fukuzawa, F. (1968). Etude biochimique de la fonction physiologique du tocopheronolactone. *Yakugazu Zasshi*. 88: pp 678-683.

Uphof J.C.Th., (1959). Dictionary of Economic Plants. Weinheim.

V

Vergé, S., Soulet, S., Lacan, F., Mas, T., Arnaudinaud, V., & Nay, B. (1999). Les polyphénols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 138: pp 75-90.

W

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

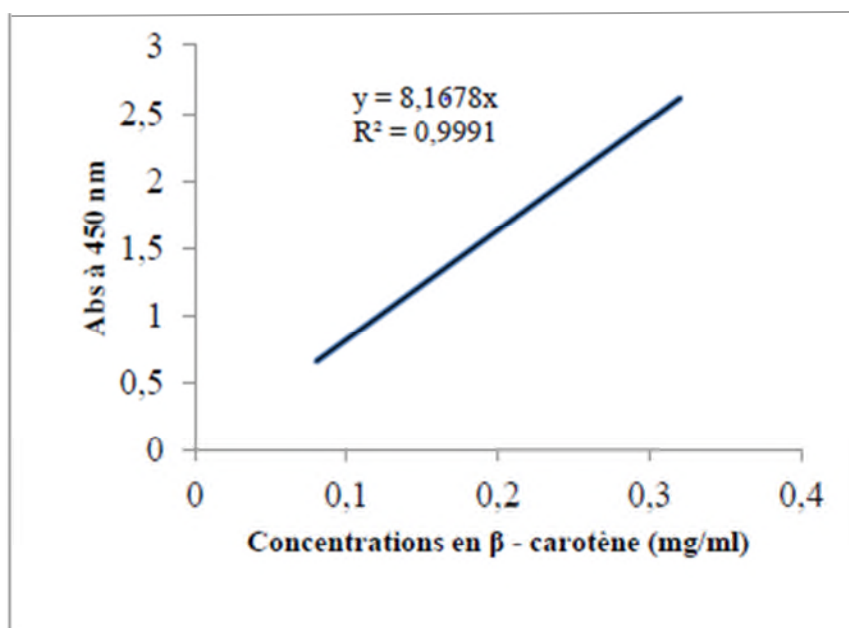
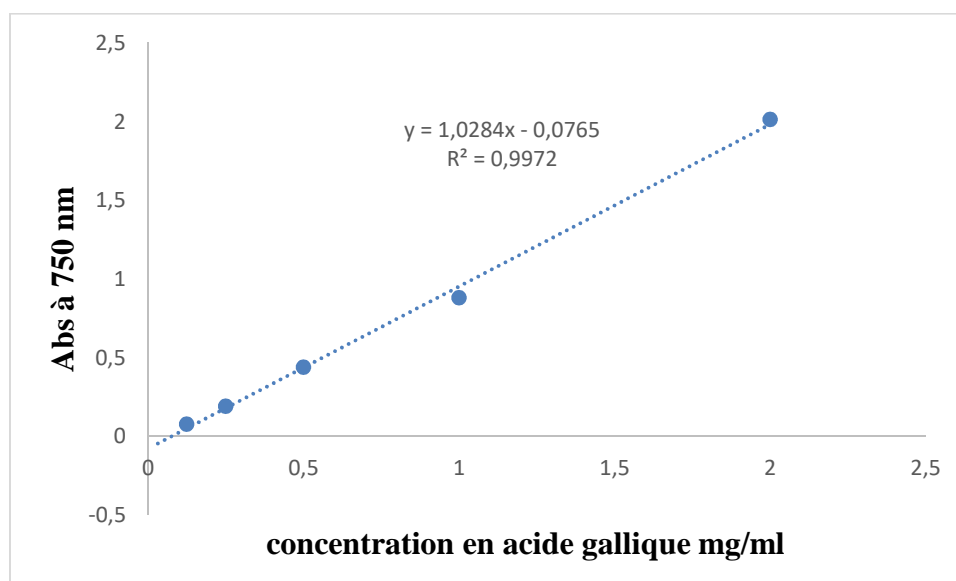
Wang, L., and Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*., 17, 300-312.

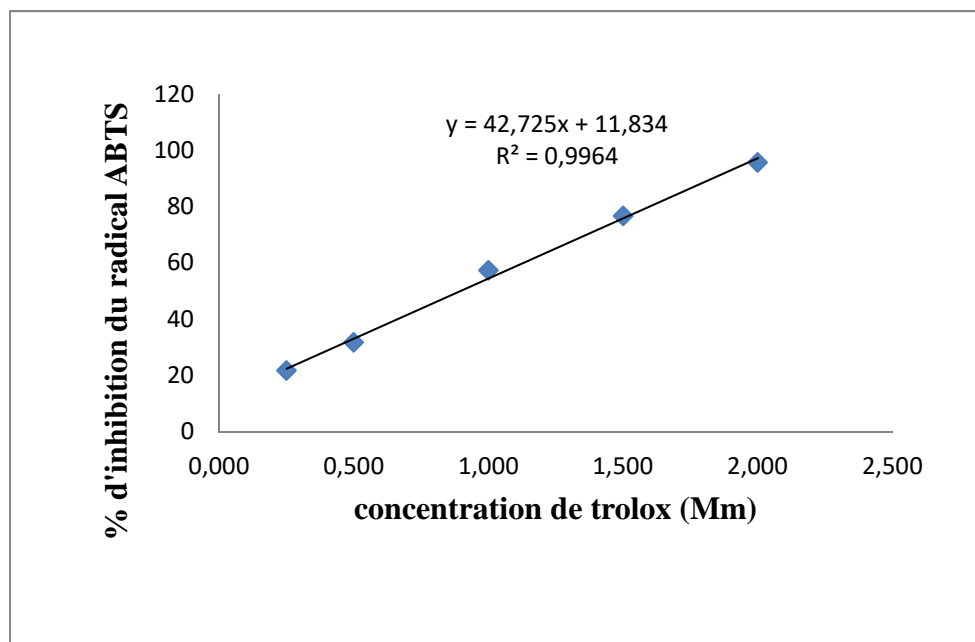
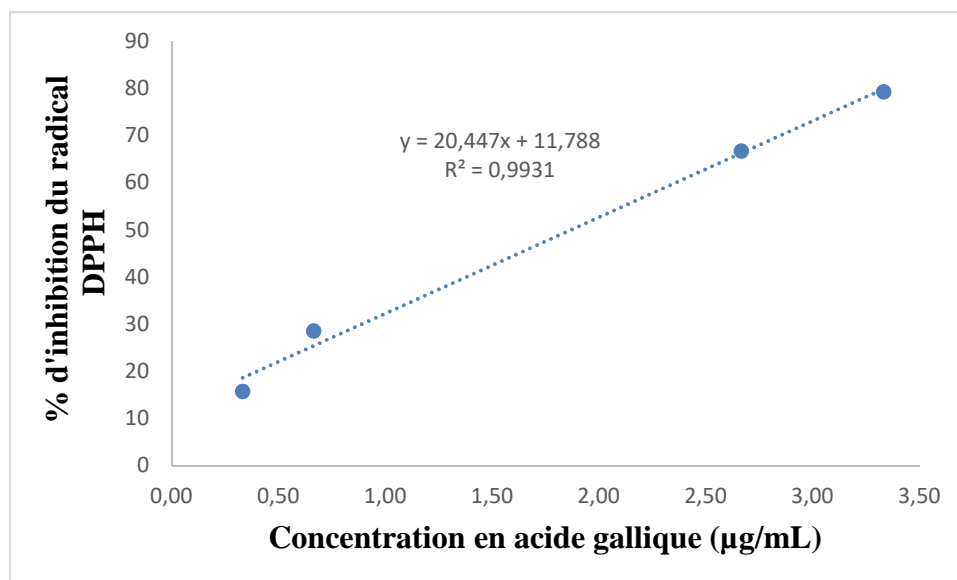
Wichtl, M., et Anton, R. (1999). "Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, Science et thérapeutique". 3 ème édition. Tec et Doc (Éd). 42-138p.

Z

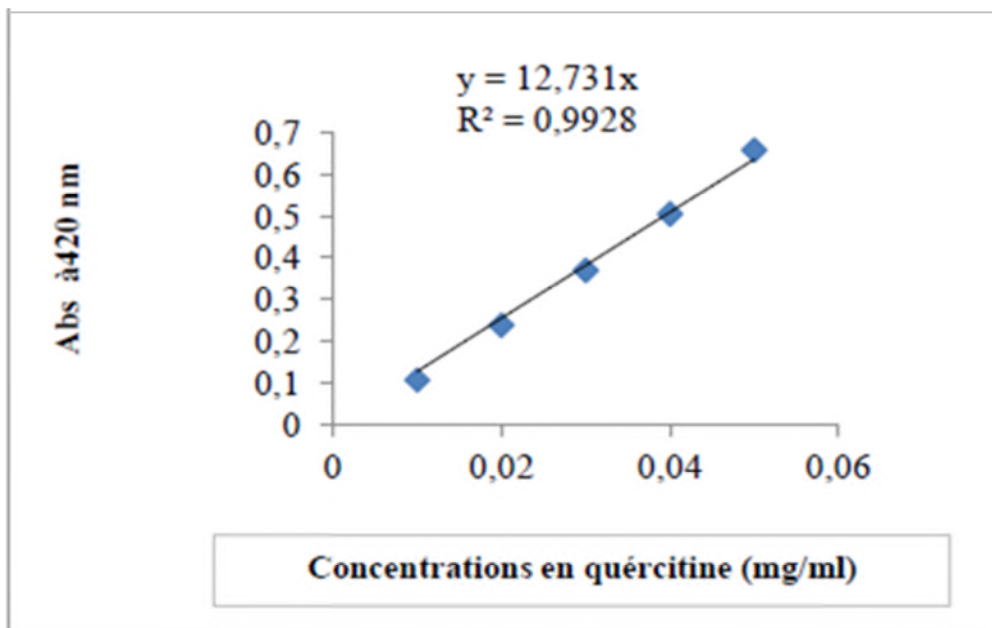
Ziouti, A., El Madafar, C., & Boustani, E. (1998). Rôle des composés phénoliques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* *Université L*) dans sa défense contre le bayoud (*Fusarium oxysporum* *F.sp. albedinis*). *Cadi Ayad, Maroc*

Annexes

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes.**Annexe 2** : Courbe d'étalonnage pour la détermination des teneurs en polyphénols totaux

Annexe 3: Courbe d'étalonnage de piégeage des radicaux libres ABTS**Annexe 4:** Courbe d'étalonnage de piégeage des radicaux libres DPPH

Annexe 5: Courbe d'étalonnage pour la détermination des teneurs en flavonoïdes.



Résumé

Résumé : L'objectif de cette étude est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des feuilles de *Crataegus monogyna* par la méthode d'extraction assistée par ultrasons combinée avec la méthodologie de surface de réponse (RSM). Trois variables qui sont la température (20, 40 et 60°C), la concentration en éthanol (0, 50 et 100%) et le temps d'extraction (10, 35 et 60 min) et trois réponses qui sont la teneur en composés phénoliques totaux et l'étude de l'activité antioxydante par le piégeage du radical ABTS et le radical libre DPPH ont été étudiées. Par ailleurs, la teneur en humidité, en cendres, en caroténoïdes, en flavonoïdes et en tannins des feuilles de *C. monogyna* ont été déterminées. Les teneurs en humidité, en cendres, en caroténoïdes, en flavonoïdes et en tannins obtenues sont de 39,64±1,47% ; 7,65± 0,28% et 14,08±2,01 mg β-carotène/g MS ; 11,64± 0.66 mg EQ/g MS et 1,35± 0,09 mg EC/g MS, respectivement. L'optimisation individuelle de TPT par le plan d'expérience a permis d'avoir une valeur de 86,47 mg EAG/g MS dont les conditions optimales sont de 60 °C, 60 min et 56 % EtOH. Par contre, l'optimisation individuelle de l'effet de piégeage du radical libre DPPH a permis d'avoir une valeur de 93,70µg EAG /ml, dont les conditions optimales sont 29 min, 20 °C et 71% EtOH. Ainsi l'optimisation individuelle de l'effet de piégeage du radical libre ABTS a permis d'avoir une valeur de 63,60 mmol ET/g MS, dont les conditions optimales sont 22,62 min, 20°C et 53,26 % EtOH. D'autre part, l'optimisation des réponses de surfaces multiples d'extrait de *C. monogyna* a permis d'avoir une TPT de 85,00 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 89,64 µg EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 63,57 mmol ET/g MS, dont les conditions optimales d'extraction sont de 22 min, 20°C et 54% EtOH.

Mots clés : *Crataegus monogyna*, Composés phénoliques, Plan d'expérience, ABTS, DPPH, Caroténoïdes et Ultrason.

Abstract: the objective of this study is to optimize the extraction of phenolic compounds and the antioxidant activity of *Crataegus monogyna* leaves by the method of ultrasound-assisted extraction combined with response surface methodology (RSM). three variables which are the temperature (20, 40 and 60°C), the ethanol concentration (0, 50 and 100 %) and the extraction time (10,35 and 60 min) and three responses which are the total phenolic compounds and the study of antioxidant activity by ABTS radical scavenging and DPPH free radical scavenging have been studied. Furthermore, the moisture, ash, carotenoid, flavonoid and tannin content of *Crataegus monogyna* leaves were determined. The contents of moisture, ash and carotenoids, flavonoid and tannin obtained are 39,64±1,47% ; 7,65± 0,28% et 14,0.8±2,01 mg β-carotène/g DM ; 11,64± 0.66 mg EQ/g DM et 1,35± 0,09 mg EC/g DM, respectively. The individual optimization of TPC by the experimental design resulted in a value of 86, 47 mg EAG/g DM with optimal conditions of 60°C, 60 min and 56 % EtOH. In contrast, the individual optimization of the DPPH free radical scavenging activity resulted in a value of 93,70 µg EAG /ml with optimal conditions of 29°C, 20 min and 71% EtOH. Thus the individual optimization of the ABTS free radical scavenging activity resulted in a value of 63, 60 mmol/g DM with optimal conditions of 22.62°C, 20 min and 53.26% EtOH. On the other hand, the optimization of multiple surface responses of *C. monogyna* extract resulted in a TPC of 85,00 mg EAG/g DM, an DPPH free radical scavenging activity of 89,64 µg EAG /ml and a ABTS free radical scavenging activity of 63,57 mmol/g DM, with optimal extraction conditions of 22 min, 20°C and 54 % EtOH.

Keywords: *Crataegus monogyna*, ABTS, DPPH, Antioxidant activity, Carotenoids, Phenolic compounds, Ultrasound.