

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 Biotechnologie

Réf :

Mémoire

Présenté par

BENALILECHE Mouloud

et

IKHEDJI Tarik

Pour l'obtention du diplôme de

Master Académique

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Optimisation d'extraction des composés bioactifs des extraits de
*Crataegus azarolus***

Soutenu le : 01/07/2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme MEHENNI C	M C B	Présidente
Mr NABET N	M C A	Promoteur
Mme BOUDRIA A	M C A	Examinatrice

Année Universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENTS

Nous remercions *DIEU* le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force et la volonté d'accomplir ce travail.

Nous remercions profondément notre promoteur Mr Nabet qui a été toujours présent à nos côtés pour nous guider, ces critiques et conseils nous ont permis d'évaluer nos connaissances acquises et aussi de les approfondir.

Nous remercions les membres du jury : Mme Mehenni qui nous a fait l'honneur de présider le jury et Mme Boudria d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier aussi les responsables et les travailleurs des laboratoires de recherche où nous avons pu travailler dans les meilleures conditions.

A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, et à ceux qui feront un bon usage de ce document.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents et Mes sœurs qui ont toujours été présents
à mes côtés par leur amour, soutien et encouragements.*

*À mon cher collègue Tarik et sa famille, Tous mes proches et mes
amis sans exception.*

À toute la promotion Biotechnologie microbienne 2023-2024.

Mouloud

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :
Mes très chers parents qui m'ont soutenu durant toutes mes
études, qui ont partagé mes joies et mes peines, qui ont fait de
moi ce que je suis aujourd'hui, je leur en serai éternellement
reconnaissant.*

Mon frère Omar ainsi que ma sœur Lydia

A mes grands-parents

Tous mes proches et mes amis sans exception

*Toute la promo Biotechnologie microbienne
2023-2024*

Tarik

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR *CRATAEGUS AZAROLUS*

1	Présentation du genre <i>Crataegus</i> et de l'espèce <i>C. azarolus</i>	4
1.1	Étymologie.....	4
1.2	Classification botanique.....	4
1.3	Conditions de l'espèce	5
1.4	Utilisation de <i>C. Azarolus</i>	5
1.4.1	Utilisation pharmacologique de <i>C. Azarolus</i>	5
1.4.2	Utilité alimentaire	6
1.5	Composition Biochimique	6
1.5.1	Composition en métabolites primaires	7
1.5.2	Composition en métabolites secondaires.....	8
1.6	Toxicité	8
2	Activité antioxydante.....	8
2.1	Radicaux libres	9
2.2	Définition	9
2.2.1	Principaux radicaux libres	9
2.3	Les antioxydantes	10

CHAPITRE II : METHODES D'EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASON

2.3.1	Définition.....	10
2.3.2	Classification des antioxydants	10
2.4	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	11
3.1	Définition.....	12
3.2	Principe	12
3.3	Paramètres influents l'extraction assistée par ultrasons	13
3.3.1	Fréquence ultrasonore	13
3.3.2	Puissance acoustique	13
3.3.3	Nature du solvant.....	14
3.3.4	Influence de la température	15
3.3.5	Temps d'extraction.....	15
3.4	Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrasons	16

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

1	Matériel végétal.....	17
1.1	Récolte	17
1.2	Lavage et séchage	17
1.3	Broyage et tamisage.....	17
2	Analyses phytochimiques.....	18
2.1	Détermination de l'humidité.....	18
2.2	Taux de cendres	18
2.3	Dosage des caroténoïdes.....	19
2.4	Teneurs en pectines.....	19
2.4.1	Mode opératoire.....	19
2.5	Dosage des sucres totaux	20
2.6	Extraction des composés phénoliques	20
2.6.1	Extraction des composés phénoliques par ultrasons	20
3	Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par ultrasons.....	21
3.1	Modèle expérimental	21
3.1.1	Extraction des composés phénoliques par la macération	22
3.2	Extraction des composés phénoliques par le Soxhlet	23
3.3	Dosage des polyphénols totaux.....	23
3.3.1	Principe.....	23

3.3.2	Mode opératoire.....	23
3.4	Dosage des flavonoïdes	24
3.4.1	Principe.....	24
3.4.2	Mode opératoire.....	24
3.5	Dosage des tannins condensés	24
3.5.1	Principe.....	24
3.5.2	Mode opératoire.....	25
4	Détermination de l'activité antioxydante	25
4.1	Test de piégeage des radicaux libres DPPH ⁺	25
4.1.1	Principe.....	25
4.1.2	Mode opératoire.....	26
4.2	Test de piégeage des radicaux cationiques ABTS ⁺	26
4.2.1	Principe.....	26
4.2.2	Mode opératoire.....	26
4.3	Test du pouvoir réducteur	27
4.3.1	Principe.....	27
4.3.2	Mode opératoire.....	27
5	Analyse statistique.....	27

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1	Taux d'humidité	29
2	Taux de cendres	30
3	Teneur en caroténoïdes	30
4	Teneur en pectines	31
5	Teneur en sucres totaux	32
6	Résultats d'optimisation des conditions d'extraction de composés phénoliques de <i>C. azarolus</i> obtenus par ultrasons.....	33
6.1	Optimisation de la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>C. azarolus</i>	34
6.2	Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH.....	36
6.3	Optimisation de l'effet de piégeage du radical cationique ABTS	37
6.4	Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de <i>C. azarolus</i>	39
7	Teneurs en composés phénoliques des extraits de <i>C. azarolus</i> obtenus par macération et Soxhlet.....	40
7.1	Teneurs en polyphénols totaux	40
7.2	Teneurs en flavonoïdes	41
7.3	Teneurs en tannins	42

8	Activités antioxydantes des extraits de <i>C. azarolus</i> obtenus par macération et Soxhlet ...	43
8.1	Effet de piégeage du radical libre DPPH	43
8.2	Effet de piégeage du radical cationique ABTS.....	44
8.3	Pouvoir réducteur.....	45
	Conclusion	47
	Références bibliographiques.....	50

Liste des figures

Figure 01 : <i>Crataegus azarolus</i>	5
Figure 02 : Extraction par ultrasons basée sur la cavitation acoustique et ses forces de cisaillement hydrodynamiques (Hielscher Ultrasonics., 2013)	13
Figure 03 : Fruits de <i>C. azarolus</i>	17
Figures 04, 05 et 06 : Dispositif d'extraction assistée par ultrasons.	21
Figure 07 : Teneur en humidité de <i>C. azarolus</i>	28
Figure 08 : Taux de cendres du fruits de <i>C. azarolus</i>	29
Figure 09 : Teneur en caroténoïdes du fruit de <i>C. azarolus</i>	30
Figure 10 : Teneurs en pectine du fruit de <i>C.azarolus</i>	31
Figure 11 : Teneur en sucres totaux du fruit de <i>C. azarolus</i>	32
Figure 12 : Diagramme de Pareto des polyphénols de <i>C. azarolus</i>	34
Figure 13 : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de <i>C.azarolus</i>	35
Figure 14 : Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait de <i>C.azarolus</i>	37
Figure 15 : Interaction entre le temps et la EtOH et leurs effets sur le piégeage du radical ABTS	38
Figure 16 : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets de temps d'extraction et de concentration en éthanol sur la désirabilité de l'extrait de <i>C.azarolus</i> obtenu par extraction assistée par ultrason	39
Figure 17 : Teneurs en polyphénols totaux de <i>C. azarolus</i>	40
Figure 18 : Teneurs en flavonoïdes de <i>C. azarolus</i>	41
Figure 19 : Teneurs en tannins de <i>C. azarolus</i>	42
Figure 20 : Effets de piégeage du radical libre DPPH de <i>C. azarolus</i>	43
Figure 21 : Effet de piégeage du radical cationique ABTS de <i>C. azarolus</i>	44
Figure 22 : Le pouvoir réducteur des différents extraits de <i>C. azarolus</i>	45

Liste des tableaux

Tableau I : Potentiel énergétique et nutritionnel de <i>Crataegus azarolus</i>	6
Tableau II : Résultats des métabolites primaires de l'azérole algérien.....	7
Tableau III : Plan d'expérience utilisé pour l'extraction des composés bioactifs de <i>C. azarolus</i>	22
Tableau IV : Plan d'expérience et résultats des réponses étudiées des extraits de <i>C. azarolus</i> obtenus par ultrasons	33
Tableau V : Résultats prédits et résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de <i>C. azarolus</i>	38

Liste des abréviations

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

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

EAG : Equivalent d'acide gallique.

ET : Equivalent de Trolox.

EtOH : Ethanol.

KHz : Kilohertz.

MS : Matière sèche.

nm : Nanomètre.

Mmol : Millimoles.

rpm : Rotation par minute.

TPT : Teneur en polyphénols totaux.

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

UV-Vis : Ultraviolet-Visible.

INTRODUCTION

Introduction

Il existe une grande diversité d'espèces naturelles cultivées en Algérie dont les avantages économiques, alimentaires et curatifs sont peu connus.

Les plantes sont utilisées à des fins thérapeutiques depuis l'Antiquité. Elles sont employées dans le traitement de diverses maladies (**Gourguillon *et al.*, 2016**).

Les métabolites secondaires des plantes jouent le rôle de principes actifs, du fait des apports qu'elles contiennent. Ces molécules biologiquement actives, en particulier les polyphénols, sont largement utilisées en thérapie comme vaso-protecteurs, agents anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antioxydants et agents anti-radicalaires dont l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante (**Chanwitheesuk *et al.*, 2005**).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires incitent à rechercher des substances naturelles possédant des propriétés antibactériennes et antioxydantes sans provoquer d'effets irritants ou toxiques.

L'Algérie possède un potentiel végétal médicinal vaste qui comprend des milliers d'espèces d'intérêt et fait l'objet de recherches scientifiques, notamment dans le domaine des substances naturelles de la famille des Rosacées des régions tempérées de l'hémisphère Nord, dont l'aubépine (**Dobignard, 2009**).

Elle est considérée comme une plante médicinale souvent utilisée en médecine traditionnelle comme traitement des douleurs des systèmes digestif et urinaire, la régulation de la fréquence cardiaque, la circulation sanguine, l'hypertension artérielle et calme le système nerveux. Il a plusieurs effets thérapeutiques, notamment des effets antispasmodiques, astringents, diurétiques, antipyrétiques, antihypertenseurs et sédatifs (**Bahorun *et al.*, 1994**).

C'est dans ce contexte que notre étude est réalisée dont le but est d'optimiser les conditions d'extraction des composés bioactifs du fruit de *Crataegus azarolus* avec la méthode de l'extraction assistée par ultrasons. L'optimisation est effectuée en utilisant un plan d'expérience (Box-Behnken) constitué de trois variables indépendantes qui sont le temps d'extraction (2 ; 4,5 et 7 min), l'amplitude (20 ; 60 et 100 %) et la concentration du solvant (0,

50 et 100%) et de trois réponses (la teneur en polyphénols totaux, test DPPH et test ABTS). La deuxième partie de ce travail consiste à faire une étude comparative de la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de l'extrait obtenu par ultrasons dans les conditions optimales et des extraits obtenus par deux techniques d'extraction conventionnelles la macération et le Soxhlet.

Ce mémoire est divisé en deux parties distinctes qui sont la partie bibliographique et la partie expérimentale.

- La partie bibliographique se compose de deux chapitres :
 - Chapitre I : Généralités sur la plante *Crataegus azarolus*,
 - Chapitre II : Techniques d'extraction des composés bioactifs.
- La partie expérimentale est divisée 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 en finir avec une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE I : Généralités sur la plante *Crataegus azarolus*

1 Présentation du genre *Crataegus* et de l'espèce *C. azarolus*

Les espèces de *Crataegus* (famille des Rosaceae), appelés « aubépines », sont des arbustes généralement épineux ou peu épineux, dont environ 200 espèces sont communément réparties dans les régions tempérées du nord (**Máthé et Turgut, 2023**).

Crataegus azarolus est un arbuste traditionnel non fructueux très courant en Afrique, notamment en Algérie. Leurs fruits sont traditionnellement utilisés comme source de vitamines et de minéraux, qui peuvent constituer des ingrédients importants dans les aliments. Ces fruits peuvent être consommés frais ou séchés. (**Boudraa et al., 2010**)

1.1 Étymologie

Crataegus, nom générique des aubépines (rosacées), désignant en latin "Crataegon" ou "Cratægus" et en grec ("κράτα γινος ou κράτα γινου"), l'azérolier (*Crataegus azarolus* L.) ; peut-être du grec "κράτα γινος" par allusion à la dureté du bois. Le nom botanique des aubépines est dérivé d'un terme qui, chez Théophraste, désignait l'azerolier. Le genre *Crataegus* comprend plus de 600 espèces. Ce nombre varie selon les auteurs (**Boudraa et al., 2010**)

Crataegus azarolus est commun dans les haies, en bordure des chemins de toutes les régions tempérées d'Europe, de l'Asie occidentale et de l'Afrique du Nord. L'azérolier est naturalisé en Amérique du Nord et cultivé en région méditerranéenne (**Grieve, 1971**).

1.2 Classification botanique

La classification botanique de l'espèce *C. azarolus* selon **dirlík et Eser, 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 azarolus*



Figure 01 : *Crataegus azarolus* (Aubépine)

1.3 Conditions de l'espèce

L'aubépine est un arbuste très résistant qui peut supporter tous les climats rigoureux, notamment la sécheresse, le froid, les vents violents et les pluies torrentielles (Yves-Marie, 1988).

L'azérolier préfère les climats chauds et les zones ensoleillées, et les sols secs, lourds et argileux comme il peut pousser sur des sols alcalins ou calcaires et tolérer la pollution de l'air (Koyuncu *et al*, 2007).

1.4 Utilisation de *C. Azarolus*

1.4.1 Utilisation pharmacologique de *C. Azarolus*

En Algérie, l'azérolier est utilisé depuis longtemps pour divers traitements (Abdelguerfi *et al.*, 2003).

Du fait de l'influence de la médecine traditionnelle arabe, les extraits de feuilles et de fruits d'aubépine sont utilisés, entre autres, pour traiter la faiblesse sexuelle, le cancer et le diabète (Said *et al.*, 2002).

En médecine chinoise, l'aubépine est utilisée depuis environ 650 ans avant J.C, notamment pour le traitement des maladies cardiovasculaires (Croxtton et Sparks, 2002).

Vers la fin du XIX siècle, les médecins Européens ont commencé à expérimenter l'aubépine comme médicament contre les maladies cardiovasculaires. Cette plante présente de grands bienfaits et utilisée dans plus de 200 médicaments (Lacoste, 2006).

(Svedström *et al.*, 2006). Longtemps, chez les anciennes civilisations, l'aubépine a eu la réputation d'accroître la fertilité.

Les extraits de feuilles, de fleurs et de fruits de *Crataegus* sont couramment utilisés pour traiter les maladies du cœur, du système digestif, du système urinaire et du système nerveux.

1.4.2 Utilité alimentaire

Les feuilles et les sommités fleuries sont utilisées pour la préparation d'infusions, et leurs fleurs pour l'aromatisation et la décoration des sirops, du dessert et des salades (Lust, 2014). Beaucoup de produits sont obtenus à partir de la pulpe du fruit ; les confitures, les marmelades, les gelées, les sirops, les jus, les boissons alcooliques et la farine, comme il rentre dans la préparation du vinaigre.

1.5 Composition Biochimique

L'aubépine possède un potentiel énergétique et nutritionnel non négligeable confirmé par les travaux de plusieurs chercheurs, ceux (Özcan *et al.*, 2005) sur des espèces Turque de *Crataegus*, a achevé aux résultats présentés dans le **Tableau I**.

Tableau I : Potentiel énergétique et nutritionnel du fruit de *C. azarolus* (Özcan *et al.*, 2005)

Fraction	Teneur
Humidité	64,26%
Protéines	2,48%
Lipides	0,87%
Cellulose	4,67%
Cendres	2,28%
Energie	34,02 (Kcal/g)

Tableau I : Potentiel énergétique et nutritionnel de *Crataegus azarolus*

1.5.1 Composition en métabolites primaires

Les fruits de l'azérolier contiennent 15,9 % des sucres totaux, des oses simples majoritaires comme le fructose, le glucose et le rhamnose (**Dzhangaliev, 2002**). Ces fruits sont aussi riches en polysaccharides tels que la cellulose et la pectine (**Baba Aissa, 1999**).

Les sucres solubles de l'azérole algérien sont d'une teneur en moyenne de 9,86% du total de la matière sèche, où 3,03% présentent des sucres réducteurs et 6,83% en saccharose. Concernant les polysaccharides, cette espèce renferme 6,86% de pectine et 11,97% de cellulose, de la matière fraîche du fruit. Son apport énergétique est de 37,98 Kcal/g (**Saadoudi, 2008**).

Les résultats des métabolites primaires de l'azérole algérien provenant de la région de Mila sont regroupés dans le **Tableau II**.

Tableau II : Résultats des métabolites primaires de l'azérole algérien (**Saadouni, 2008**).

Fraction	Teneur
Sucres réducteurs	3,03%
Saccharose	6,83%
Pectines	6,86%
Cellulose	11,96%
Apport énergétique	37,98 Kcal/g
Acides aminés	3 à 6%
Lipides	Traces

Le contenu des fruits secs d'azérolier en aminoacides totaux varie entre 3 à 6%, caractérisé par des acides aminés aromatiques (**Chang et al., 2006**). Les lipides sont présents sous forme de

traces (**Bruneton, 1999**). Par ailleurs, **Ferhat, 2008** rapporte une teneur de 0,67% en matière grasse dans son étude sur l'azérole de la région de N'gaous (Algérie).

1.5.2 Composition en métabolites secondaires

- **Composés phénoliques**

Les composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique, la vitexine, la quercétine-3-O-galactoside, la quercétine-3-O-glucoside, l'acétylvitexine 2"-O-rhamnoside ont des teneurs élevés dans les feuilles d'aubépine par rapport aux écorces (**Wloch et al., 2013**).

La quercétine a été rapporté comme étant un composé important dans le ralentissement de la progression de la maladie du *Covid-19* (**Di Pierro et al., 2021**).

- **Huiles essentielles**

Comme les composés phénoliques, les composés volatils sont des métabolites secondaires des plantes. Les huiles essentielles des feuilles et des fleurs des espèces de *Crataegus azarolus* tel que les acides linoléique, stéarique et palmitique ainsi que des alcanes et des alcènes autres l'exadécane, le tricosane et l'hexacosane ont été déjà étudiés (**Lakache et al., 2014**).

1.6 Toxicité

Chez l'homme, une consommation excessive d'aubépine peut provoquer des problèmes cardiaques et respiratoires (dépression), de légers problèmes digestifs et de légères allergies cutanées.

D'autres part une consommation élevée de fruits d'aubépine chez les jeunes enfants peut provoquer une hypotension sévère. C'est aussi une plante allergisante de par son pollen (**Girre, 2000**).

2 Activité antioxydante

Les radicaux libres et les antioxydants sont de plus en plus courants parmi les professionnels de la santé ainsi que dans le grand public. Mais ces idées ne sont pas nouvelles. Il ne faut pas oublier que les deux biologistes **R.Gershman** et **D.Hartmann** discutaient déjà au milieu des années 1950

de la théorie de la toxicité de l'oxygène et des radicaux libres pour expliquer le processus de vieillissement ainsi que la Protection contre les effets néfastes des radicaux (Harman, 1992; Gerschman, 1981).

2.1 Radicaux libres

2.2 Définition

Les radicaux libres et les oxydants peuvent être nocifs comme ils peuvent être bénéfiques pour l'organisme, ils jouent donc un double rôle de composés toxiques et bénéfiques (Favier, 2003).

Ils sont produits par le métabolisme cellulaire normal in situ ou par des sources externes (pollution, fumée de cigarette, rayonnements, médicaments).

Si la surcharge de radicaux libres ne peut être détruite progressivement, l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme provoque un phénomène appelé stress oxydatif.

Ce processus joue un rôle important dans le développement de maladies dégénératives chroniques telles que le cancer, les maladies auto-immunes, le vieillissement, la cataracte, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives.

Le corps humain dispose de plusieurs mécanismes pour lutter contre le stress oxydatif en produisant des antioxydants qui sont naturellement produits localement ou fournis de manière externe par le biais d'aliments et de suppléments. (Pham-Huy, C., Pham Huy, B., 2022)

2.2.1 Principaux radicaux libres

- **Anion superoxyde (O_2^\bullet)** : Lorsqu'une molécule d'oxygène entre en contact avec une énergie suffisante, elle peut accepter un électron supplémentaire et former un anion superoxyde. Cet anion agit comme agent oxydant dans de nombreuses réactions.
- **Radical hydroxyle (OH^\bullet)** : Très réactif envers les structures organiques et responsable du déclenchement de l'autoxydation des lipides.
- **Peroxyde radicalaire (ROO^\bullet)** : est un radical secondaire généré par l'oxydation de substances organiques provoquée par l'oxygène singulet ou des radicaux hydroxyles.
- **Oxygène singulet (O_2)** : est la forme excitée de la molécule d'oxygène et est souvent comparée aux radicaux libres en raison de sa forte réactivité. ((Benagoune *et al.*, 2018) ; (Pincemail *et al.*, 2007)).

2.3 Les antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction redox dans laquelle des électrons sont transférés d'une substance à un agent oxydant. Cette réaction peut générer des radicaux libres qui provoquent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants peuvent arrêter ou ralentir ces réactions en chaîne en se réduisant grâce aux radicaux libres et en annulant leurs effets (**Tahri et al., 2013**).

2.3.1 Définition

Les antioxydants sont des composés qui inhibent l'oxydation d'autres molécules et protègent l'organisme des effets des radicaux libres.

De nombreux antioxydants sont présents naturellement, tandis que d'autres sont obtenus sous forme synthétique et réduisent le stress oxydatif des organismes vivants. (**Rahaman et al., 2023**)

2.3.2 Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés en antioxydants naturels ou synthétiques selon leur origine, et en antioxydants primaires ou secondaires selon leur mode d'action (**Thomas., 2016**)

- **Antioxydants synthétiques**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate de propyle (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ) ont été utilisés grâce à leur efficacité.

- **Antioxydants naturels.**

Substances peuvent agir comme antioxydants in vivo. Très controversée car ils nécessitent des recherches sur des matériaux alternatifs (**Lisu et al., 2003**).

- **Antioxydants primaires**

Ceux-ci Ils agissent sur les produits d'oxydation des lipides ($L\cdot$, $LOO\cdot$, $LO\cdot$) en les convertissant en produits plus stables (LH, LOOH, LOH) grâce à leurs propriétés actives de donneur de protons. Ils contiennent des composés qui interfèrent avec l'oxydation des lipides (**Kim et Lee., 2004**).

- **Antioxydants secondaires**

Selon **Gordon (1990)**, les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation des lipides par divers mécanismes d'action.

- Absorption de la lumière ultraviolette,
- Inactivation de l'oxygène singulier,
- Chélation des métaux,
- Décomposition des hydroperoxydes.

2.4 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Le contrôle de l'oxydation est important pour gérer la complexité évolutive des systèmes biologiques, en particulier dans le cas des aliments, dont la dégradation peut avoir un impact sur la sécurité alimentaire (**Marc *et al.*, 2004**). Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante peuvent être qualitatives ou quantitatives.

Les méthodes qualitatives permettant d'identifier l'activité antioxydante des composés relativement nombreux et impliquent généralement la coloration ou la décoloration de certains réactifs en présence d'un antioxydant.

Une méthode de détection des antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui provoque une réaction colorée en présence de tels composés (**Li *et al.*, 1999**).

Concernant l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, de nombreuses méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. Parmi ces méthodes on peut citer :

- La méthode ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés) (**Cao *et al.*, 1993**),
- La méthode du radical cationique ABTS (piégeage du radical 2,2-azino-bis-3éthylbenzothiazoline-6-acide sulphonique) (**Maamri., 2008**),
- éthode du radical DPPH (piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Uchiyama *et al.*, 1968**),
- La méthode de DMPD (piégeage du radical N, N-diméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride) (**Li *et al.*, 1994**).

3 Chapitre II : Méthode d'extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est la technique privilégiée pour isoler les composés bioactifs des plantes. (Saklar Ayyildiz *et al.*, 2018) En utilisant la sonication, il est possible d'obtenir une extraction complète, ce qui entraîne des rendements d'extraction plus élevés dans un temps d'extraction très court (Petigny *et al.*, 2013). L'extraction par ultrasons, en tant que méthode d'extraction si performante, permet de réaliser des économies de temps et d'argent tout en produisant des extraits de qualité supérieure, qui sont employés dans les aliments, les compléments alimentaires et les produits pharmaceutiques (Sitthiya *et al.*, 2017).

L'extraction par ultrasons est employée afin de libérer des composés bioactifs tels que des vitamines, des polyphénols, des polysaccharides et d'autres substances phytochimiques naturelles (Dogan *et al.*, 2019).

3.1 Définition

Les ultrasons représentent des ondes mécaniques vibrationnelles de 20 à 100 kHz qui sont employées pour extraire des composés bioactifs possédant une diffusion dans les matériaux solides, liquides et gazeux. Dans un environnement liquide, la transmission des ondes provoquera des cycles de compression (pression élevée) et de raréfaction (pression faible) (Figure 2) (Ghitescu *et al.*, 2015).

3.2 Principe

La technique d'extraction par ultrasons consiste à combiner des ondes ultrasoniques de grande puissance et de basse fréquence avec une boue contenant de la matière végétale dans un solvant. La suspension est soumise à des ondes ultrasoniques de grande puissance grâce à un processeur ultrasonique à sonde. Le phénomène de cavitation acoustique est causé par le déplacement des ondes ultrasonores très énergétiques dans le liquide, créant ainsi des cycles alternatifs de haute et basse pression. Des températures, des pressions, des taux de chauffage/refroidissement élevés, des différentiels de pression et des forces de cisaillement élevées sont générées localement par la cavitation acoustique ou ultrasonique. En cas d'implosion des bulles de cavitation à la surface de solides (par exemple, des particules, des cellules végétales, des tissus, etc.), le décollement de la surface, l'érosion, l'éclatement des particules, la sonoporation et la dislocation des cellules sont des effets des micro-jets et des collisions intermoléculaires. De plus, lorsque les bulles de cavitation se dissocient dans les milieux liquides, cela entraîne la formation de macro-turbulences et de micro-

mélanges. Les processus de transfert de masse peuvent être améliorés grâce à l'irradiation ultrasonique (Hielscher Ultrasonics., 2013).

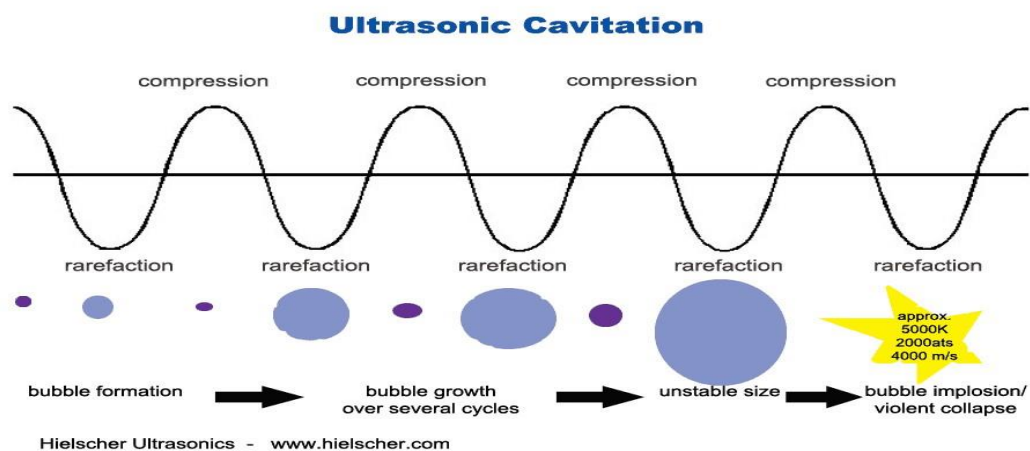


Figure 02 : Extraction par ultrasons basée sur la cavitation acoustique et ses forces de cisaillement hydrodynamiques (Hielscher Ultrasonics., 2013).

3.3 Paramètres influents l'extraction assistée par ultrasons

3.3.1 Fréquence ultrasonore

La fréquence de sonication joue un rôle crucial. La fréquence détermine l'amplitude de la dépression nécessaire pour atteindre le seuil de cavitation. À mesure que la fréquence du son augmente, la durée de la dépression diminue. Il est possible qu'elle soit trop courte pour créer une cavité. Selon des recherches menées par Boucher en 1970, il a été démontré que l'intensité du seuil de cavitation augmente en fonction de la fréquence. Cela implique que la cavitation à basse fréquence est plus simple à produire. Dans cette situation, le rayon critique est élevé de $160\ \mu\text{m}$ à 20 kHz et le temps de vie des bulles est assez long qui est de $10\ \mu\text{s}$. Les fréquences les plus élevées compliquent la cavitation. Les fréquences les plus utilisées sont entre 20 et 40 kHz (Leighton, 1994).

3.3.2 Puissance acoustique

La puissance de l'ultrason joue également un rôle dans le rendement de l'extraction dans le procédé d'extraction assistée par ultrasons (EAU). Le rendement de l'extraction est amélioré lorsque la puissance de l'ultrasonication de l'EAU est augmentée. On utilise fréquemment la sonication pour extraire différents composés du matériel végétal et créer des bulles microscopiques.

L'intensité des ondes ultrasoniques qui traversent le solvant est positivement liée au type et au nombre de bulles formées. Ainsi, plus l'intensité des ondes ultrasoniques traversant le solvant

d'extraction est élevée, plus il y a de bulles et plus l'effondrement est élevé. Une onde de choc violente et un jet à grande vitesse peuvent être produits pour perturber le processus et la formation de bulles de cavitation et l'explosion violente de ces bulles à la surface des cellules peuvent provoquer une perturbation des parois cellulaires, ce qui entraîne une augmentation du rendement. Ainsi, le solvant d'extraction pénètre plus efficacement dans les cellules, ce qui entraîne une libération accrue des composants cibles des cellules dans le milieu de masse (**Tian et al., 2013 ; Yang et al., 2017**).

3.3.3 Nature du solvant

Selon **Giacometti et al. (2018)** le choix du solvant est essentiel dans l'EAU, car il a un impact important sur l'efficacité de la cavitation et le transfert de l'énergie acoustique vers les réactifs. La cavitation commence dans un liquide lorsque la pression négative est exercée pendant le cycle de raréfaction afin de contrer les forces de cohésion entre les molécules qui le composent. Ces interactions moléculaires augmentent lorsque la viscosité augmente, ce qui entraîne une augmentation significative du seuil de cavitation.

En raison de la viscosité élevée, les échantillons présenteront une amplitude élevée dans ces conditions, car la résistance de l'échantillon au mouvement de l'appareil à ultrasons augmente également en fonction du niveau de viscosité de l'échantillon. Il est recommandé d'utiliser une pression de vapeur faible dans l'EAU car cela entraînera un effondrement plus agressif de la bulle de cavitation. Toutefois, le niveau de vapeur varie en fonction de la température du liquide (**Chemat et al., 2017**). De plus, la performance de l'extraction diminue à mesure que la polarité du solvant augmentera, ce qui signifie que la polarité la plus faible donnera des résultats positifs en termes de performance (**Mohd. F et Mat. D., 2016**).

L'éthanol est couramment employé dans l'industrie pétrolière en raison de sa sécurité environnementale et humaine, et il est également largement utilisé dans l'industrie alimentaire (**Zhou et al., 2017**).

De nombreuses extractions ont été effectuées à l'aide de n-hexane (**Abdullah et Koc, 2012 ; Jakobe et al, 2015 ; Mohd. F et Mat. D., 2016 ; Altemimi et al., 2016 ; Yousuf et al., 2018**), de méthanol (**Kim et al., 2019**) et le solvant le plus utilisé était l'éthanol (**Abdullah et Koc., 2012 ; Charpe et Rathod., 2014 ; Prommajak et al., 2014 ; Jing et al., 2015 ; Tuncay., 2015 ; Hadiyanto., 2016 ; Yang et al., 2017 ; Zhou et al., 2017**) ; **Cássia et al., 2018 ; Kim et al, 2019**).

3.3.4 Influence de la température

La température joue un rôle essentiel dans le processus de l'EAU. Ce paramètre a été utilisé comme facteur de production d'un meilleur rendement d'extraction dans de nombreuses études. La majorité des études suggèrent que la température idéale est comprise entre 30°C et 50°C afin d'obtenir un meilleur rendement (**Tian et al., 2013 ; Mohd. F et Mat. D., 2016 ; Yang et al., 2017 ; Buddin et al., 2018 ;**). Les matériaux utilisés pour l'extraction influencent la température. Lorsque la température d'extraction est plus élevée, le rendement de l'extraction augmente. Selon **Zhou et al., (2017)**. Une augmentation de la température d'ultrasonication pourrait entraîner une augmentation du coefficient de diffusion des composés désirés et améliorer la solubilité des composés dans le solvant.

De plus, une augmentation des températures entraînerait une augmentation de la vitesse d'effondrement des bulles dans le solvant, ce qui faciliterait la pénétration du solvant dans le tissu cellulaire et accélérerait la libération du contenu cellulaire dans la solution d'extraction (**Li et al., 2016**). D'un autre côté, une hausse de température supplémentaire entraîne une diminution du rendement en raison de l'effet d'amortissement, c'est-à-dire que la pression de vapeur à des températures élevées favorise la formation de bulles remplies de vapeur et que, par conséquent, l'implosion de ces bulles diminue.

Selon **Buddin et al. (2018)**, l'effet de cavitation serait moins efficace à une température d'extraction élevée, ce qui a entraîné une diminution significative du rendement.

Avec l'augmentation de la température, la viscosité et la densité du solvant diminuent, ce qui accélère le processus d'extraction, or les extraits peuvent parfois être dégradés par une température trop élevée, ce qui réduit le rendement de l'antioxydant (**Zhou et al., 2017**).

3.3.5 Temps d'extraction

Pendant le processus d'extraction, le solvant est introduit en contact avec les échantillons. Le temps d'interaction entre les deux phases joue donc un rôle dans l'efficacité de l'extraction. L'étape de lavage et l'étape d'extraction lente sont distinctes. Dans les 10 à 20 premières minutes de l'extraction, la phase de lavage est utilisée pour nettoyer la surface de la matrice contenant les composants solubles dissous. Environ 90 % de l'extraction peut être effectuée à ce stade, ce qui correspond à un taux d'extraction rapide. La phase suivante est connue sous le nom d'extraction lente, où la diffusion se produit dans une période de 60 à 100 minutes lorsque le soluté de la matrice se déplace dans le solvant (**Medina-torres et al., 2017**).

D'après les recherches antérieures, de nombreux chercheurs ont conclu que le temps d'extraction pendant le processus de l'EAU est d'environ 30 minutes (**Ghafoor et al., 2009 ; Ofori-Boateng et Lee, 2013 ; Samaram et al., 2013 ; Tian et al., 2013 ; Teng et al., 2016 ; Liu et al., 2017 ; Yang et al., 2017**).

D'autres études ont permis d'atteindre une durée d'extraction optimale supérieure à 30 minutes (**Zhang et al., 2009 ; Tang et al., 2010 ; Li et al., 2016 ; Zhou et al., 2017**).

3.4 Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrasons

L'utilisation de l'EAU est bénéfique pour extraire divers composés d'intérêt à partir de matrices végétales et permet d'obtenir des rendements d'extraction considérablement plus élevés avec un temps d'extraction court. L'utilisation de cette méthode est considérée comme une forme de "chimie verte" car elle permet de diminuer la consommation de ressources, comme les solvants et l'énergie. En revanche, en ce qui concerne les désavantages, cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant l'extraction d'une part, et l'impact néfaste de l'énergie ultrasonique sur les composants actifs des plantes médicinales, entraînant la formation de radicaux libres et des modifications indésirables dans les molécules médicamenteuses (**Carreira-Casais et al., 2021**).

Matériel et méthodes

1 Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les fruits de la plante nommée *C. azarolus*, appartenant à la famille des rosacées (**Figure 03**).



Figure 03 : Fruits de *C. azarolus*

1.1 Récolte

Le fruit de *C. azarolus* a été récolté au mois d'octobre 2023 à Kendira (Semta), Wilaya de Béjaïa. Les caractéristiques écologiques du lieu de récolte sont comme suit : une latitude de 36°30'30.3"N, une longitude de 5°04'23.8"E et une altitude de 1100 mètres.

1.2 Lavage et séchage

Les fruits de *C. azarolus* ont été débarrassés des mauvaises herbes après la récolte, puis lavés avec de l'eau du robinet pour éliminer toute poussière. Les fruits ont été séchés à une température de 40 °C dans une étuve ventilée (BINDER, Allemagne) pendant 3 à 4 jours, jusqu'à stabilisation de leur poids.

1.3 Broyage et tamisage

Un broyeur domestique (Moulinex, France) a été utilisé pour réduire en poudre les fruits secs de *C. azarolus*. Après le broyage, les particules sont tamisées à l'aide de tamiseurs manuels avec des diamètres d'ouverture de 250 µm à 500 µm, dans le but d'obtenir des poudres fines et homogènes. La poudre obtenue est stockée dans une boîte en verre hermétique dans un lieu sec et à l'abri de la lumière.

2 Analyses phytochimiques

2.1 Détermination de l'humidité

La teneur en eau du fruit de *C. azarolus* est établie par le processus de séchage d'après la méthode de N 'Guessan *et al.* (2019). 2 g de fruit frais ont été placés dans une étuve à une température de $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ jusqu'à stabilisation du poids. Le test a été effectué à 3 reprises. Le taux d'humidité (H%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{p_2 - p_0}{p_1} * 100$$

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

P₀ : Poids de la boîte de pétri vide en gramme.

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

P₂ : Poids de la boîte de pétri et de l'échantillon après séchage en gramme.

2.2 Taux de cendres

Ce test repose sur l'élimination des composés organiques d'un échantillon en le calcinant à une température spécifique pendant une période spécifique. Il représente le pourcentage de la masse du résidu obtenu après calcination par rapport à la masse initiale de l'échantillon (Ngargueudedjim *et al.*, 2015).

Le taux de cendres a été déterminé en utilisant la méthode décrite par Leterme *et al.* (2006). 1g de poudre sèche de *C. azarolus* a été placée dans un creuset préalablement taré. La combinaison creuset et échantillon a été exposée à une température de 450 °C dans un four à moufle (NABERTHERM, Allemagne) pendant une durée de 6 heures. Après 6 heures d'incinération l'ensemble est retiré du four et placé dans un dessiccateur (Duran, États-Unis) pour le refroidissement, puis la pesée est réalisée. Le test a été effectué à 3 reprises.

Le taux de cendres est donné par la formule suivante :

$$TC (\%) = \frac{M_2 - M_0}{M_1} * 100; \text{ où}$$

TC (%) : Taux de cendres exprimé en pourcentage.

M₀ : Masse du creuset vide en gramme.

M1 : Masse de l'échantillon avant la calcination en gramme.

M2 : Masse finale du creuset et du résidu de l'échantillon calciné en gramme.

2.3 Dosage des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes du fruit étudié a été réalisé selon la méthode décrite par **SassKiss *Et al.* (2005)**. 1 g de poudre de *C. azarolus* été introduit dans un bécher de 50 ml couvert d'aluminium contenant un volume de 20 ml du mélange n-hexane/acétone/éthanol (2 :1 :1) (v/v/v). Le mélange (solvant, poudre) est soumis à une agitation à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. Après, les deux phases ont été séparées et la même procédure a été effectuée sur le résidu. Les surnageants obtenus ont été additionnés. Après filtration, les extraits obtenus ont été mis dans une ampoule à décanter. Puis le mélange a été lavé avec un volume de 30 ml d'eau distillée. La phase hexanique de couleur jaune a été récupérée et son absorbance a été déterminée à 450 nm.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec le β -carotène afin de déterminer la teneur en caroténoïdes (**Annexe 01 (a)**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent β -carotène/gramme de matière sèche (mg E β -carotène/g MS).

2.4 Teneurs en pectines

Le fruit de *C. azarolus* s'avère être riche en pectines. De ce fait, une étude a été menée sur l'effet de trois différents solvants à savoir l'eau, l'acide chlorhydrique et l'acide citrique à pH de 7, 2 et 2, respectivement sur le rendement d'extraction en pectine.

2.4.1 Mode opératoire

1 g de poudre de fruit de *C. azarolus* a été mélangé avec 20 ml du solvant en question dans un erlenmeyer. Le mélange est mis au bain-marie sous agitation à 80 °C pendant une période d'une heure et demi. Après refroidissement de l'extrait, ce dernier est filtré. 70 ml d'éthanol pur ont été ajoutés au filtrat afin de précipiter les pectines. Mélanger avec une tige à verre et laissé reposer le mélange pendant une nuit, en suite une centrifugation à 4000 rpm pendant 20 minutes a été appliquée. Ensuite les pectines obtenues ont été séchées dans une étuve à 40 °C jusqu'à stabilisation de leur poids (**Li *et al.*, 2022**). Le rendement d'extraction en pectine a été calculé selon la loi ci-dessous

$$RP (\%) = \frac{M2-M1}{M0} * 100 \quad \text{où :}$$

RP (%) : Rendement d'extraction en pectine exprimé en pourcentage.

M0 : Masse initiale de la poudre de *C. azarolus* en gramme.

M1 : Masse de tube vide.

M2 : Masse de tube vide et de la pectine extraite après séchage.

2.5 Dosage des sucres totaux

La détermination de la teneur en sucres totaux du fruit de *C. azarolus* a été réalisée par la méthode de l'antrone décrite par **Osborne et Voogt (1978)**. L'hydrolyse acide de l'échantillon a été réalisé en mélangeant 0,5 grammes de poudre de *C. azarolus* prétraité avec 15 ml de l'acide perchlorique (HClO₄) à 52%, et laissé agir pendant 18h à l'ombre. Par la suite, un volume d'eau distillée a été ajouté au mélange, suivi d'une filtration et ajuster le volume du filtrat jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution a été diluée à un dixième (1/10). 1 ml d'antrone à 0,1 % préparé avec de l'acide sulfurique (H₂SO₄) pur a été ajouté à 500 µl du filtrat dilué obtenu au préalable. Le mélange a été porté à ébullition dans un bain marie pendant 12 minutes. Un complexe de couleur verte apparaît suite à l'interaction de l'antrone avec les sucres totaux disponibles dans l'échantillon. L'absorbance de ce complexe a été mesurée à une longueur d'onde de 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Le dosage a été tripliqué.

Une courbe d'étalonnage a été préparée à l'aide du glucose comme standard avec une série de dilutions de 10 à 200 µg/ml (**Annexe 01 (b)**). La teneur en sucre du fruit a été déterminée en g de glucose/100 g de fruit.

2.6 Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques à partir de fruit de *C. azarolus* a été réalisée avec trois méthodes différentes, qui sont l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction par la macération et par le Soxhlet. La méthode d'extraction assistée par ultrasons (UAE) a été utilisée afin d'optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques du fruit de *C. azarolus* suivant un plan d'expérience. Les résultats obtenus seront comparés à ceux des deux autres techniques conventionnelles.

2.6.1 Extraction des composés phénoliques par ultrasons

2.6.1.1 Principe

Les ultrasons entraînent des cycles d'expansion et de compression des cellules dans un milieu liquide, créant ainsi des bulles microscopiques près des parois cellulaires. Cela entraîne une

augmentation de la température et de la pression, par conséquent la destruction des parois cellulaires (Wang *et al.*, 2006).

2.6.1.2 Mode opératoire

1 g de poudre séchée de fruit de *C. azarolus* a été placé dans un petit flacon contenant 20 ml de solvant d'extraction adéquat (voir le plan d'expérience). On a procédé à une extraction par ultrasons du mélange obtenu à l'aide d'un sonicateur (Sonic Materials TM, USA) (**Figure 04, 05 et 06**), en respectant les conditions définies (temps d'extraction, concentration en éthanol et l'amplitude) dans le plan d'expérience regroupé dans le **Tableau III**. Le mélange est ensuite filtré et centrifugé à une vitesse de 4000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est conservé dans des flacons étiquetés, fermés et conservés dans un congélateur pour des analyses ultérieures. Les analyses effectuées sur les extraits obtenus par l'extraction assistée par ultrasons sont la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante (test DPPH et test ABTS). Par ailleurs, les résultats de l'extrait issu à partir des conditions optimales avec l'utilisation des ultrasons ont été comparés à ceux obtenus par les techniques conventionnelles. Les **Figures 04, 05 et 06** représentent le dispositif d'extraction assistée par ultrasons.



Figure 04



Figure 05

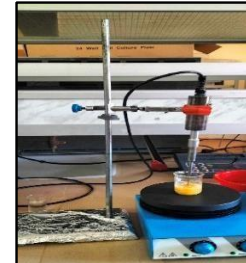


Figure 06

3 Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par ultrasons

3.1 Modèle expérimental

Afin de déterminer les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du fruit de *C. azarolus* récolté à Semta (Kendira, wilaya de Béjaïa) un plan d'expérience à 15 tests avec trois points centraux a été élaboré à l'aide d'un logiciel Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, États-Unis). Trois facteurs indépendants ont été analysés : le temps d'extraction (2 ; 4,5 et 7 min), l'amplitude de la sonde à ultrasons (20, 60 et 100 %) et la concentration en solvant (% en éthanol) (0, 50 et 100 %).

Ainsi que, trois réponses ont été identifiées, à savoir la teneur en polyphénols totaux (TPT) (mg EAG/g MS), le piégeage du radical libre DPPH (μg EAG/ml) et le piégeage du radical cationique ABTS (mmol ET/g MS) (**Tableau III**).

Le **Tableau III** représente les différentes conditions expérimentales utilisées pour la réalisation du plan d'expérience.

Tableau III : Plan d'expérience utilisé pour l'extraction des composés bioactifs de *C. azarolus*.

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

* : Points centraux du plan d'expériences

3.1.1 Extraction des composés phénoliques par la macération

Un gramme de poudre de *C. azarolus* a été introduit dans un erlenmeyer contenant 40 mL d'éthanol à 50%, l'erlenmeyer a été incorporé dans un bain agitateur pendant une heure à 60°C.

un deuxième extrait a été préparé dans les mêmes conditions qu'auparavant à l'exception du temps d'extraction qui est de 2 heures.

Les analyses phytochimiques réalisés sur les extraits obtenus par la macération sont les dosages de TPT, des flavonoïdes, des tannins condensés et la détermination de l'activité antioxydante par trois tests (DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur).

3.2 Extraction des composés phénoliques par le Soxhlet

3 g de poudre du fruit de *C. azarolus* ont été mises dans une cartouche à papier, cette dernière a été couverte d'un coton cardé. 180 ml d'éthanol 50 % ont été versés dans un ballon à col rodé. L'extraction des composés phénoliques du fruit de *C. azarolus* a été réalisée avec le système de reflux avec l'utilisation du Soxhlet. Une température d'ébullition de 80°C et un temps d'extraction de 150 minutes ont été utilisés.

Les analyses phytochimiques réalisés sur l'extrait obtenu par le Soxhlet sont les dosages de TPT, des flavonoïdes, des tannins condensés et la détermination de l'activité antioxydante par trois tests (DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur).

3.3 Dosage des polyphénols totaux

3.3.1 Principe

Le Folin-Ciocalteu est un réactif composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des phénols, il est transformé en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite est liée à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Jeganathan et al., 2014**).

3.3.2 Mode opératoire

Le réactif du Folin-Ciocalteu a été employé afin d'évaluer la teneur en polyphénols, conformément à la méthode décrite par **Nabet et al. (2019)**. 30 µl de chaque extrait ont été additionnés à 1800 µl d'eau distillée et 150 µl du réactif du Folin-Ciocalteu. Après avoir agité pendant une minute, 450 µl de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% et 570 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Incuber le mélange pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 760 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec l'acide gallique afin de mesurer la quantité en polyphénols totaux (**Annexe 02 (a)**). Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimés en mg EAG/g MS).

3.4 Dosage des flavonoïdes

3.4.1 Principe

Lors de l'incorporation du chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre se forme en raison de la fixation des ions Al^{3+} sur les atomes d'oxygène, situés sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Riberau-Gayon, 1968**).

Cela signifie que deux électrons sont perdus par le métal (Al^{+3}) pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique qui jouent le rôle d'accepteur d'électrons (**Bahorun et al., 1996**).

3.4.2 Mode opératoire

Les teneurs en flavonoïdes présents dans les extraits des fruits de *C. azarolus* obtenus avec les différentes méthodes d'extraction ont été déterminée selon la méthode décrite par **Djeridane et al. (2006)**. 500 μ l de la solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2 % (2 g de chlorure d'aluminium dissous dans 100 ml de méthanol) ont été ajoutés à l'extrait. Après un temps de contact de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 430 nm.

En utilisant la quercétine comme standard, une courbe d'étalonnage a été établie pour évaluer la concentration en flavonoïdes (**Annexe 02(b)**). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg EQ/g MS.

3.5 Dosage des tannins condensés

3.5.1 Principe

Les proanthocyanidines, également connues sous le nom de tannins condensés, sont des polymères de flavanols. Plusieurs groupes hydroxy phénoliques sont présents, ce qui entraîne la formation de complexes avec des protéines, des ions métalliques et d'autres grandes molécules (**Schofield et al., 2001**). En présence de sels ferriques les tannins hydrolysables donnent des précipités bleu noirs et les tannins condensés des précipités bruns verdâtres (**Bruneton, 1999**).

3.5.2 Mode opératoire

La teneur en tannins condensés des extraits des fruits de *C. azarolus* a été déterminée selon la méthode proposée par **Vermerris et Nicholson (2006)**. Une solution de sulfate ferrique acide $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ a été préparée avec la dissolution de 77 mg de sulfate d'ammonium ferrique $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ dans 500 mL de n-Butanol/HCl (3 :2) (v/v). 2,5 ml de la solution ferrique ont été mélangés avec 250 μL de l'extrait. Après incubation à 95 °C pendant 50 minutes, l'absorbance a été mesurée à 530 nm au spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon).

Les résultats sont déterminés à l'aide de la formule ci-dessous en utilisant la cyanidine comme standard.

$$\text{TC} = \frac{\text{A530nm} \times \text{FD} \times \text{MM}}{(\epsilon \times \text{L})} \quad \text{Où :}$$

TC : Teneur en tannins condensés en mg EC/g MS ;

FD : Facteur de dilution ;

MM : Masse molaire de la cyanidine égale à 287,24 g/mol ;

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de la cyanidine égale à 34700 L/mol/cm ; L

: Largeur de la cuve (1cm).

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

4 Détermination de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de fruits de *C. azarolus* a été réalisée avec l'utilisation de trois méthodes différentes à savoir le test DPPH, le test d'ABTS et le pouvoir réducteur.

4.1 Test de piégeage des radicaux libres DPPH^{•+}

4.1.1 Principe

Le test DPPH mesure l'activité antioxydante des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène. Le composé (DPPH^{•+}) est un cation radical coloré, de couleur pourpre et stable qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm. Les composés antioxydants, qui sont capables de transférer un électron à DPPH^{•+}, provoquent une décoloration de la solution (DPPH-

H). Cette réaction est rapide et proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon (Sanchez-Moreno, 2002).

4.1.2 Mode opératoire

L'effet du piégeage du radical libre DPPH des extraits de *C. azarolus* 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 (UV-1800 SHIMADZU, Japon) à 517 nm.

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

suivante :

$$I \% = \frac{\text{Abs blanc} - \text{Abs éch}}{\text{Abs blanc}} \times 100$$

Avec :

Abs_{blanc} : Absorbance du contrôle à T= 0 min

Abs_{éch} : Absorbance de l'échantillon à T= 30 min.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec l'utilisation d'acide gallique (Annexe 03(a)). Les résultats obtenus ont été exprimés en µg équivalent acide gallique / ml (µg EAG /ml).

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

La méthode de piégeage du radical cationique ABTS^{•+} est parmi les méthodes les plus couramment employées pour évaluer l'activité antioxydante.

4.2.1 Principe

Cette méthode repose sur la neutralisation d'un radical cationique (Jiri *et al.*, 2010). Ce dernier est formé en oxydant le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), ce qui donne une solution colorée en vert-bleu. En ajoutant un antioxydant à la solution radicalaire d'ABTS^{•+}, ce radical est réduit et l'absorbance de la solution radicalaire diminue (Prouillac, 2006).

4.2.2 Mode opératoire

La méthode décrite par Re *et al.* (1999) a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de *C. azarolus*. Une solution d'ABTS de 7 mM en utilisant de l'eau distillée a été préparée. Le mélange de la solution d'ABTS avec la solution de persulfate de potassium

(K₂S₂O₈) a permis d'obtenir les radicaux cationiques ABTS^{•+}. Le mélange a été incubé à l'ombre et à une température ambiante pendant 12 à 16 heures. La solution radicalaire d'ABTS^{•+} a été diluée avec une solution tampon de phosphate de sodium à 5 mM et à pH de 7,4 afin d'obtenir une absorbance comprise entre 0,68 et 0,72 à 734 nm. 2 ml de la solution radicalaire d'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 20 µL de l'échantillon. Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, une analyse des absorbances à 734 nm a été effectuée.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec l'utilisation du Trolox. Des concentrations de 0,25 jusqu'à 2 mmol ont été utilisées pour la préparation de cette courbe (**Annexe 03 (b)**). Les résultats ont été exprimés en mmol équivalent Trolox /g de matière sèche (mmol ET/g MS).

4.3 Test du pouvoir réducteur

4.3.1 Principe

Le test du pouvoir réducteur est basée sur la réduction de fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants présents dans l'échantillon

4.3.2 Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des extraits du fruit de *C. azarolus* a été déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, 1986**. 500 µL d'extrait ont été mélangées à 1250 µL de tampon de phosphate de sodium (0,2 M, pH 6) et de 1250 µL de [K₃Fe (CN)₆] à 1 %. Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. 1250 µL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % ont été ajoutés puis le tout a été centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes. 1250 µL du surnageant ont été mélangés avec 1250 µL d'eau distillée et 0,25 ml de chlorure ferrique (FeCl₃) à 0,1 %, l'absorbance a été mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (UV-1800 SHIMADZU, Japon) L'analyse a été tripliquée pour tous les échantillons.

Une courbe d'étalonnage a été préparée avec l'utilisation d'acide gallique afin de déterminer le pouvoir réducteur des extraits. Des concentrations de 10 jusqu'à 200 µg/ml ont été utilisées pour la préparation de cette courbe (**Annexe 02(c)**). Les résultats ont été exprimés en mg équivalent acide gallique / g de matière sèche (mg EAG /g MS).

5 Analyse statistique

Toutes les analyses réalisées au niveau de cette étude ont été répétées trois fois, afin de déterminer la moyenne et l'écart type pour chaque test à l'aide de l'Excel (version 2016). L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel **Statistica version 12**. Le test de l'analyse de

la variance à un seul facteur (Anova-Tukey) a été utilisé pour déterminer la différence significative la plus faible (LSD) à une valeur de $p \leq 0,05$.

Résultats et discussion

1 Taux d'humidité

La teneur en humidité du fruit de *C. azarolus* est représentée ci-dessous

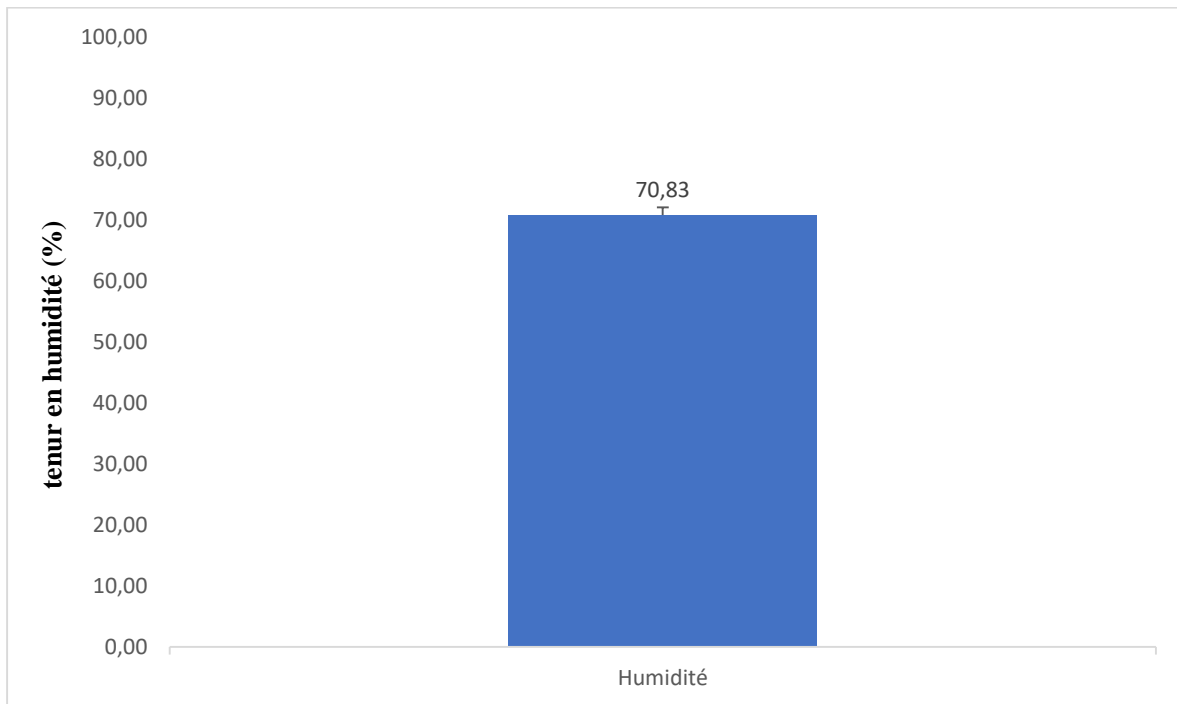


Figure 07 : Teneur en humidité de *C. azarolus*

Le test d'humidité est utilisé afin d'évaluer la teneur en eau des fruits de *C. azarolus*. Néanmoins la suppression de l'humidité est nécessaire pour assurer une bonne conservation des échantillons et cela sans changer les caractéristiques physico-chimiques de la matrice végétale.

Le taux d'humidité de fruit de *C. azarolus* étudié est de $70,83 \pm 1,89$ %. Il en résulte que 29,17 % correspond au pourcentage de matière sèche.

Les taux d'humidité des fruits de *C. monogyna* et *C. azarolus*, cueillis en octobre dans la Daïra de N'Gaous, (Batna) sont de $35,52 \pm 8,06$ % et $70,22 \pm 3,40$ %, respectivement (Boudraa *et al.*, 2010).

2 Taux de cendres

La teneur en cendres de fruit de *C. azarolus* étudié est représentée ci-dessous.

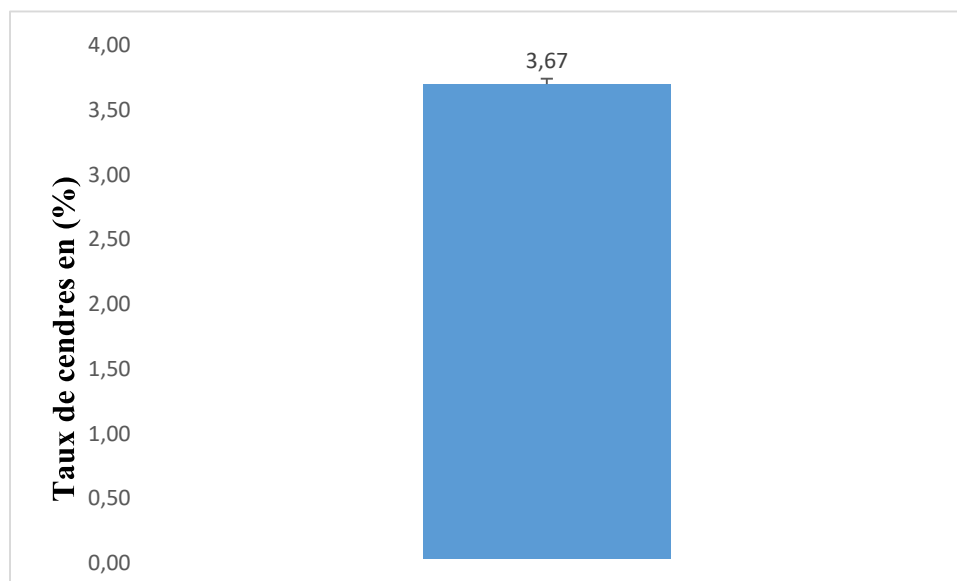


Figure 08 : Taux de cendres de fruits de *C. azarolus*

Le taux de cendre du fruit de *C. azarolus* récolté à Senta (Béjaia) est de $3,67 \pm 1,15$ %. **Boudraa et al. (2010)** rapportent dans leur étude, des taux de cendres de $4,10 \pm 0,1\%$ et $5,00 \pm 0,07\%$ pour les fruits de *C. monogyna* et *C. azarolus*, respectivement.

Le taux de cendres du fruit de *C. azarolus* rapporté par **Boudraa et al. (2010)** est supérieur à celui trouvé dans notre étude. Selon **Boudraa et al. (2010)**, cette différence peut être attribuée à des variations dans certains critères tels que l'espèce en question, la partie de la plante étudiée, la période de récolte, ainsi que des facteurs environnementaux.

3 Teneur en caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes du fruit de *C. azarolus* est représentée ci-dessous.

Le fruit de *C. azarolus* étudié présente une faible teneur en caroténoïdes qui est de $1,06 \pm 0,17$ mg β -carotène /g MS.

Les fruits de *C. mexicana* provenant du Mexique contiennent une teneur en caroténoïdes de $26,4 \pm 0,02$ mg β -carotène /g de poids frais (**Banderas et Cervantes, 2015**)

Lainez *et al.* (2019) ont montré dans leur étude menée sur 24 géotypes de fruits de *crataegus* prélevées au Mexique de septembre à octobre en 2016 et 2017, que les teneurs en caroténoïdes déterminées au niveau du mésocarpe et l'exocarpe des fruits étudiés varient de 3,95 jusqu'à 42,35 μg β -carotène/g de matière fraîche.

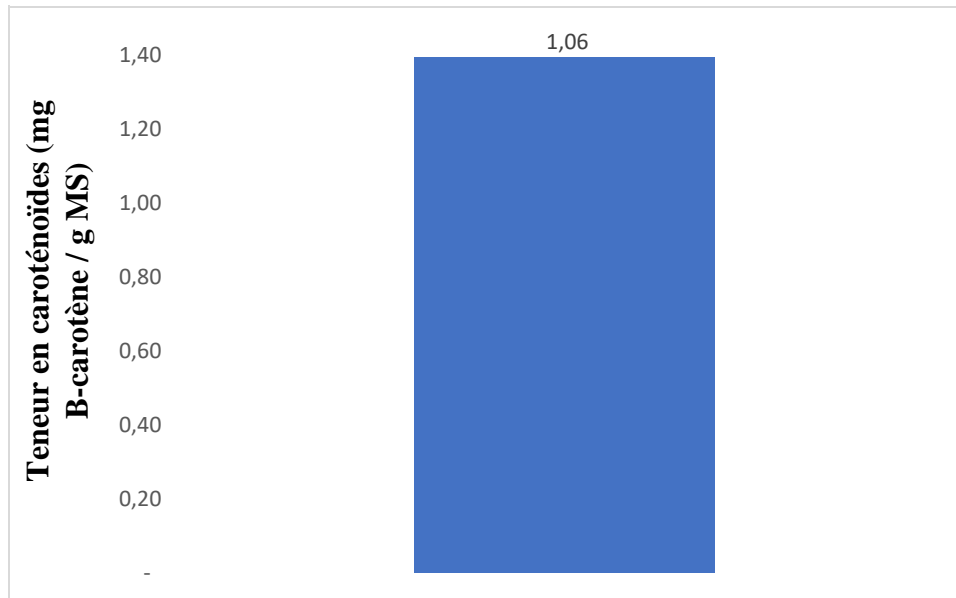


Figure 09 : Teneur en caroténoïdes du fruit de *C. azarolus*

La variation des teneurs en caroténoïdes pourrait être expliquée par l'impact des facteurs environnementaux (Banderas *et Cervantes*, 2015 ; Lainez *et al.*, 2019).

4 Teneur en pectines

Les teneurs en pectines de fruit de *C. azarolus* obtenues à partir d'extrait aqueux, d'acide chlorhydrique et d'acide citrique sont regroupés dans la figure ci-dessous

L'étude statistique réalisée sur les teneurs en pectines obtenues avec les trois différents solvants montre que les rendements d'extraction en pectines de l'extrait aqueux et l'extrait chlorhydrique ne montrent pas de différence significative (Figure 10).

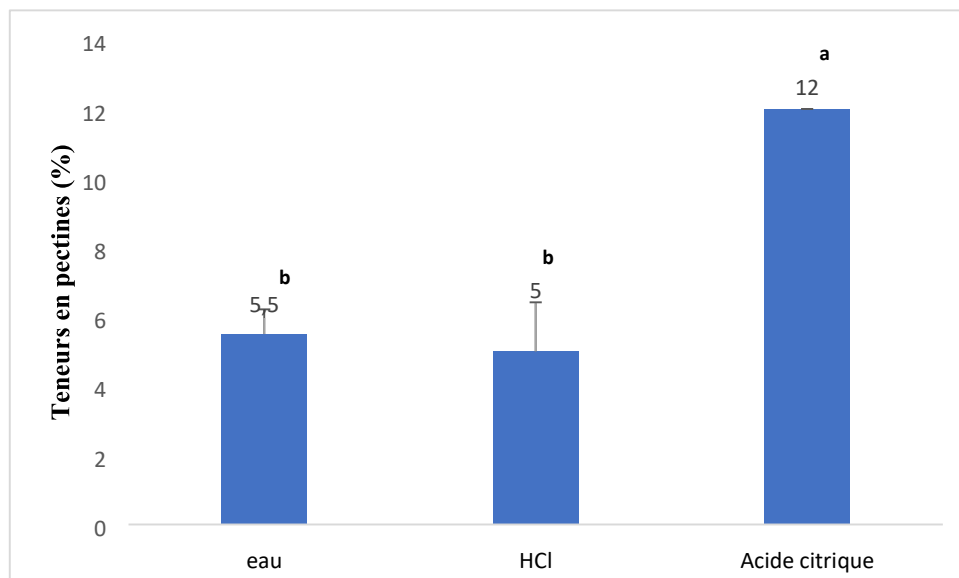


Figure 10 : Teneurs en pectines du fruit de *C. azarolus*

Les résultats qui portent des lettres a>b montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

Le meilleur rendement d'extraction en pectine est obtenu avec l'acide citrique à pH=2, avec un rendement d'extraction de 12 %. Ce dernier, est presque deux fois supérieur à ceux de l'extrait aqueux et l'extrait chlorydrique.

Les rendements d'extraction en pectine obtenus dans le cas des fruits de *C. azarolus*, *C. monogyna*, *Elaeagnus angustifolia*, *Zizyphus lotus* et *Celtis australis* sont de 2,61 ; 1,6 ; 1,43 ; 2,07 et 0,44 %, respectivement d'après **Saadoudi et al., 2012**.

Les rendements d'extraction en pectine de fruit de *C. azaolus* obtenus dans notre étude avec les différents solvants utilisés, s'avèrent supérieurs à ceux trouvés par **Saadoudi et al. (2012)**.

5 Teneur en sucres totaux

Les teneurs en sucres totaux de fruit de *C. azarolus* obtenues dans la figure ci-dessous

Le fruit de *C. azarolus* contient une teneur en sucres totaux équivalente à $47,49 \pm 0,6$ g de glucose/100 g MS.

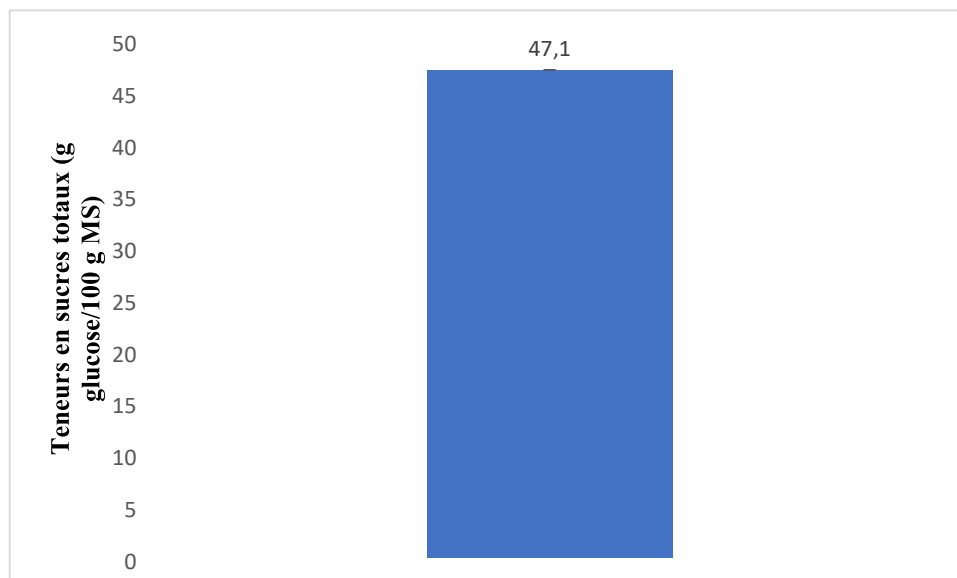


Figure 11 : Teneur en sucres totaux du fruit de *C. azarolus*

Le fruit de *C. azarolus* récolté en Tunisie contient une teneur en sucres totaux de 15,27 mg glucose /g MS (**yahiaoui et al., 2019**). Une autre étude menée sur différentes espèces d'aubépines récoltées en Chine, montre des teneurs en sucres totaux qui ont été quantifiés à l'aide de GC/MS, allant de 18,55 jusqu'à 44,5 g xylose /100 g MS (**Liu et al., 2010**).

Les teneurs en sucres totaux de fruits de *C. azarolus* et de *C. monogyna* sont de 9,86 et de 11,45 g de glucose / 100 g MS, respectivement d'après **Saadoudi et al., 2012**. Ces teneurs restent inférieurs à celle trouvée dans notre cas.

6 Résultats d'optimisation des conditions d'extraction de composés phénoliques de *C.azarolus* obtenus par ultrasons

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

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

Test	Temps (Min)	EtOH (%)	Amplitude (%)	TPC (mg EAG/g MS)	DPPH (μ g EAG/mL)	ABTS (mmol/g)
1*	4,5	50	60	16,03 \pm 1,17	79,97\pm0,42	22,77\pm0,39
2	2	50	20	15,50 \pm 1,10	79,81 \pm 0,57	19,36 \pm 1,64
3	7	50	100	17,43 \pm 0,34	81,86 \pm 0,79	20,97 \pm 0,37
4	4,5	100	100	6,91 \pm 0,47	57,55 \pm 1,41	18,10 \pm 1,21
5	2	0	60	4,30 \pm 0,28	36,03 \pm 0,72	18,42 \pm 0,59
6*	4,5	50	60	17,24 \pm 1,06	80,91\pm0,55	22,48\pm1,78
7	4,5	100	20	3,44 \pm 0,15	39,86 \pm 0,87	17,51 \pm 1,27
8	7	100	60	4,83 \pm 0,12	56,98 \pm 1,60	19,09 \pm 1,01
9*	4,5	50	60	16,91 \pm 1,32	81,75\pm0,09	21,70\pm0,34
10	4,5	0	100	6,64 \pm 0,18	24,17 \pm 0,40	16,57 \pm 0,70
11	2	50	100	17,37 \pm 1,13	80,55 \pm 0,64	21,09 \pm 0,36
12	7	50	20	15,03 \pm 1,09	80,28 \pm 0,72	20,10 \pm 0,17
13	4,5	0	20	3,82 \pm 0,23	31,94 \pm 2,69	15,76 \pm 1,06
14	2	100	60	3,61 \pm 0,24	37,71 \pm 1,79	16,57 \pm 0,49
15	7	0	60	5,17 \pm 0,11	42,12 \pm 3,58	15,83 \pm 0,30

* : Représente les points centraux

6.1 Optimisation de la teneur en polyphénols totaux des extraits de *C. azarolus*

La plus forte teneur en polyphénols totaux (TPT) des extraits de *C. azarolus* a été obtenue avec les paramètres d'extraction suivants : 7 minutes, 50% d'éthanol et une amplitude de 100%, avec une teneur de 17,43 mg EAG/g MS. Cependant, la TPT la moins élevée est obtenue avec un temps d'extraction de 4,5 minutes, 100% d'éthanol et 20% d'amplitude, qui est de 3,44 mg EAG/g MS (**Table IV**).

La **Figure 12** représente le digramme de Pareto pour les polyphénols totaux. L'analyse statistique montre que l'amplitude à un effet positif significatif sur la TPT ainsi que l'effet quadratique du solvant (éthanol) possède un effet négatif significatif sur la TPT. Tandis que le temps d'extraction et la concentration en éthanol n'ont aucun effet significatif sur la TPT des extraits de *C. azarolus* (**Figure 12**).

La plus forte teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *C. azarolus* proposée par le model ($R^2 = 99.58\%$) est de 18,26 mg EAG/g MS, avec les conditions optimales d'extractions de 5,26 min, 50 % EtOH et 100%, d'amplitude.

Le modèle mathématique proposé par le logiciel afin d'optimiser ta TPT est comme suit :

$$\text{TPC (mg EAG/g) MS} = 2,13972 + 0,7753*T + 0,456708*E (\%) + 0,0105688*A - 0,0895333*T^2 + 0,0007*T*E + 0,001325*T*A - 0,00467583*E^2 + 0,00008125*E*A + 0,000103385*A^2$$

T: Temps (min); A: amplitude (%); E: EtOH (%)

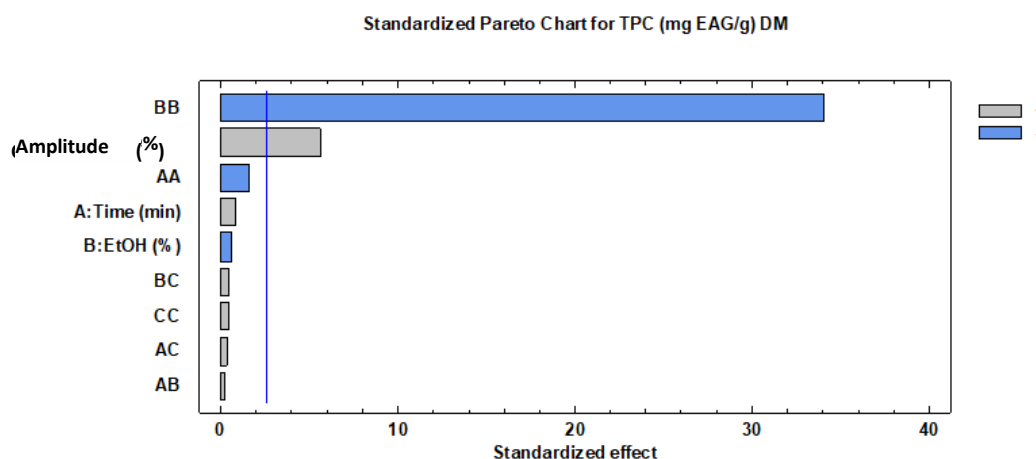


Figure 12 : Diagramme de Pareto des polyphénols de *C. azarolus*

La TPT de fruits de *C. azarolus ssp aronia* et *C. azarolus ssp pontica* collectés dans différentes provinces de l'Iran est de $27,09 \pm 0,63$ et $23,89 \pm 0,08$ mg EAG/g MS, respectivement (**Alirezalu et al., 2020**). Par ailleurs, la TPT de fruit de *C. azarolus* de la région de Mila (Algérie) est de $30,73 \pm 2,33$ mg EAG /g MS (**Boudjada et al., 2018**). Ces TPT sont supérieures à celles trouvées dans notre étude (**Tableau IV**).

La TPT des extraits acétoniques à 70 % de *C. azarolus* et de *C. monogyna* de la région de Tunisie est de $3,05 \pm 0,03$ et $2,28 \pm 0,29$ mg EAG/g de matière fraîche, respectivement (**Belkhir et al., 2013**).

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, peuvent expliquer ces variations des teneurs en polyphénols (Keser *et al.*, 2014 ; Abuashwashi *et al.* 2016 ; Pliszka *et al.* 2016).

6.2 Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH

Selon le **Tableau IV**, les résultats de l'effet de piégeage du radical libre DPPH montrent que les variables étudiées (temps, amplitude et % EtOH) ont un impact sur l'effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *C. azarolus*.

L'effet de piégeage du radical libre DPPH le plus efficace est obtenu aux alentours de 81,86 µg/ml avec plusieurs conditions expérimentales. En revanche, un effet de piégeage plus faible du radical libre DPPH a été obtenu à 4,5 min, une amplitude de 100% et 0% e d'EtOH, avec une teneur de 24,17 µg d'EAG/ml (**Tableau IV**).

La **Figure 13** représente le digramme de Pareto pour le test DPPH. L'étude statistique montre que les deux variables indépendantes le temps d'extraction et l'amplitude n'ont pas d'effet significatif sur le piégeage du radical libre DPPH. Par contre, la concentration en éthanol montre un effet significatif positif, ainsi que l'effet quadratique de l'éthanol montre un fort effet significatif négatif sur le piégeage du radical libre DPPH (**Figure 13**).

Le modèle ($R^2=97,75\%$) propose le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui est de 87,978 µg EAG / ml dont les conditions optimales d'extraction sont : 7 min, 58% EtOH et une amplitude de 82,5%.

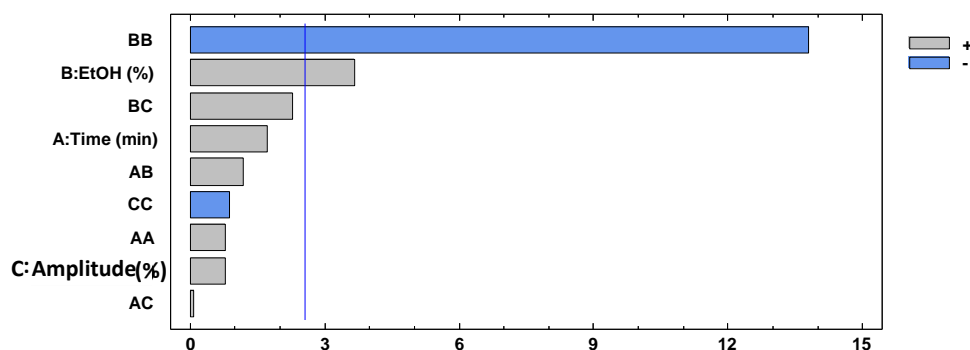


Figure 13 : Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de *C.azarolus*

Le modèle mathématique proposé par le logiciel afin d'optimiser l'effet de piégeage du radical libre DPPH est comme suit :

$$\text{DPPH}(\mu\text{g/mL}) = 43.0349 - 3.3834*T + 1.43326*E + 0.0602375*A + 0.366267*T^2 + 0.02636*T*E + 0.0021*T*A - 0.0159823*E^2 + 0.0031825*E*A - 0.00158802*A^2$$

T : temps (min); A: amplitude (%); E: EtOH (%)

L'effet de piégeage du radical libre des extraits acétoniques à 70% de pulpes de *C. azarolus* et *C. monogyna* est de $15,58 \pm 0,90$ et $10,81 \pm 1,60$ μmol équivalent trolox /g de matière fraîche, respectivement (**Belkhir et al., 2013**). L'effet de piégeage du radical libre de fruit de *C. azarolus* de la région de Béjaïa est plus important par rapport à celui rapporté par **Belkhir et al. (2013)**.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH des extraits citrique et méthanolique à 80% de fruit de *C. monogyna* est de 88% et 84%, respectivement (**Pliszka et al., 2016**). Une autre étude rapporte L'effet de piégeage du radical DPPH (IC50) de l'extrait de *C. pentagyna ssp. Elburensis* obtenu par ultrasons est de $36,7 \pm 1,5$ mg/ml (**Rabiei et al., 2012**).

6.3 Optimisation de l'effet de piégeage du radical cationique ABTS

Le plus fort effet de piégeage des radicaux cationiques ABTS a été obtenu avec un temps d'extraction de 4,5 minutes, une amplitude de 60% et une concentration de 50% d'éthanol, avec une teneur de 22,77 mmol ET/g MS. En revanche, l'extrait de *C. azarolus* a montré le plus faible effet de piégeage des radicaux cationiques ABTS à 4,5 min, 20% d'amplitude et 0% en éthanol, avec un taux de 15,76 mmol ET/g MS (**Tableau IV**).

La **Figure 14** représente le digramme de Pareto pour le test ABTS. L'étude statistique montre que les deux variables indépendantes le pourcentage en éthanol et l'amplitude ont des effets significatifs positifs sur le piégeage du radical ABTS. Par ailleurs, l'effet quadratique d'éthanol montre un fort effet significatif négatif comparé à celui de l'amplitude et de temps (**Figure 14**).

L'effet de piégeage du radical libre ABTS le plus fort selon le modèle ($R^2 = 98,36$) est de 22,39 mmol ET/g MS obtenu avec un temps d'extraction de 4,79 minutes, une amplitude de 68 % et une concentration en éthanol de 54%.

Le modèle mathématique, proposé par le logiciel afin d'optimiser l'effet de piégeage du radical ABTS est comme suit :

$$\text{TEAC (mmol/g) MS} = 13.3037 + 0.6853*T + 0.132068*E + 0.114644*A - 0.115533*T^2 +$$

$$0.01022 * T * E - 0.00215 * T * A - 0.00164683 * E^2 - 0.0000275 * E * A - 0.000759115 * A^2$$

T : temps (min); A: amplitude (%); E: EtOH

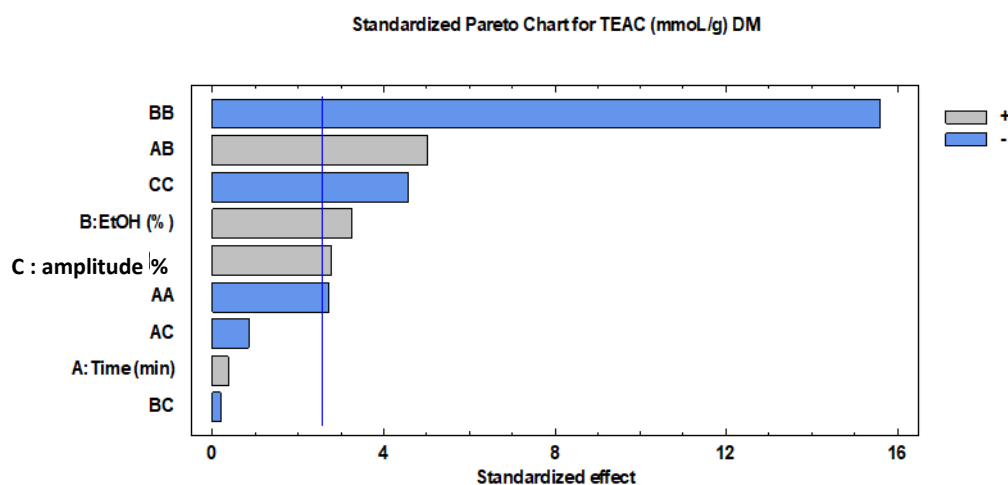


Figure 14 : Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait *C. azarolus*

Les extraits chloroformique et butanolique de la partie aérienne de *C. azarolus*, montrent un effet de piégeage des radicaux cationiques ABTS avec une IC50 de $13,89 \pm 0,03$ et $4,99 \pm 0,06$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement (**Boudjada et al., 2018**). Par ailleurs, Les extraits méthanolique et aqueux des fruits de *C. azarolus*, montrent un effet de piégeage des radicaux cationiques ABTS avec une IC50 de $114,2 \pm 1$ et $250 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement (**Al-Mustafa et Al-Thuniba, 2008**).

Les extraits méthanoliques des fruits de *C. azarolus*, montrent un effet de piégeage des radicaux cationiques ABTS qui est de 3888.02 ± 11.17 jusqu'à 6741.12 ± 11.42 $\mu\text{mol Trolox/100 g MS}$ (**BahriSahloul et al., 2014**)

Il existe une interaction entre le temps d'extraction et le pourcentage en éthanol lors de l'étude de la réponse de l'effet de piégeage du radical cationique ABTS. Dans le cas où la concentration en éthanol est de 0% avec un temps d'extraction fixé à 2 min on obtient le plus fort effet de piégeage du radical cationique ABTS qui est de 18 mmol ET/g MS. Lorsque le temps d'extraction augmente de 2 jusqu'à 7 min l'effet de piégeage du radical cationique ABTS diminue jusqu'à une valeur de 16 mmol ET/g MS. Par contre, dans le cas où la concentration en éthanol est de 100% avec un temps d'extraction fixé à 2 min, l'effet de piégeage du radical cationique ABTS obtenu est moins important (16,6 mmol ET /g MS). Ce dernier à un effet proportionnel avec l'augmentation du temps d'extraction jusqu'à l'obtention d'une valeur maximale de 19,6 mmol ET/g MS à 7 min (**Figure 15**).

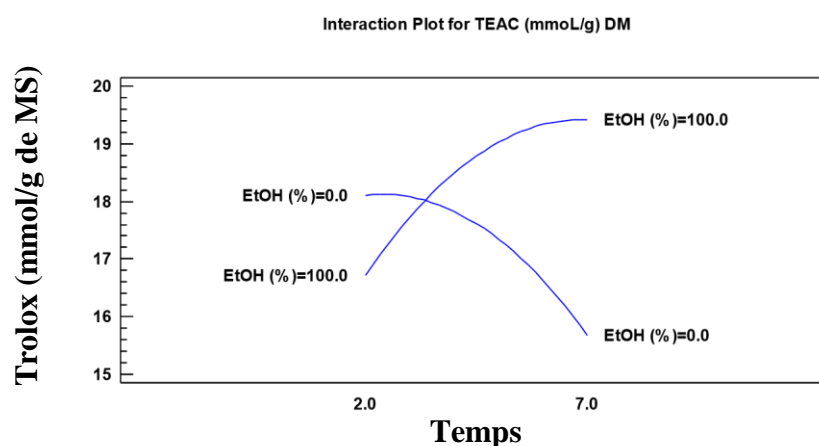


Figure 15 : Interaction entre le temps et la EtOH et leurs effets sur le piégeage du radical ABTS

6.4 Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *C. azarolus*

Le **Tableau V**, regroupe les résultats prédits et les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de *C. azarolus* par la méthode d'extraction assistée par ultrasons, qui sont un temps d'extraction de 4,79 minutes, une amplitude de 79% et 52% en éthanol.

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

Réponses	Résultats prédits	Résultats expérimentaux	RSD%
TPT (mg EAG/g) MS	17,39	12,33	24,07
DPPH (µg EAG/mL)	81,86	62,56	18,89
TEAC (mmol ET/g) MS	22,29	14,86	29,08

Le modèle propose un facteur de désirabilité de 0,97 % avec une teneur en polyphénols totaux de 17,39 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 81,86 µg ET/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 22,29 mmol ET/g MS.

Les valeurs des réponses expérimentales présentes des écarts par rapport à celles prédites par le modèle. Cela pourrait être expliqué par l'absence d'une étude préliminaire sur l'effet des variables indépendantes sur les réponses étudiées.

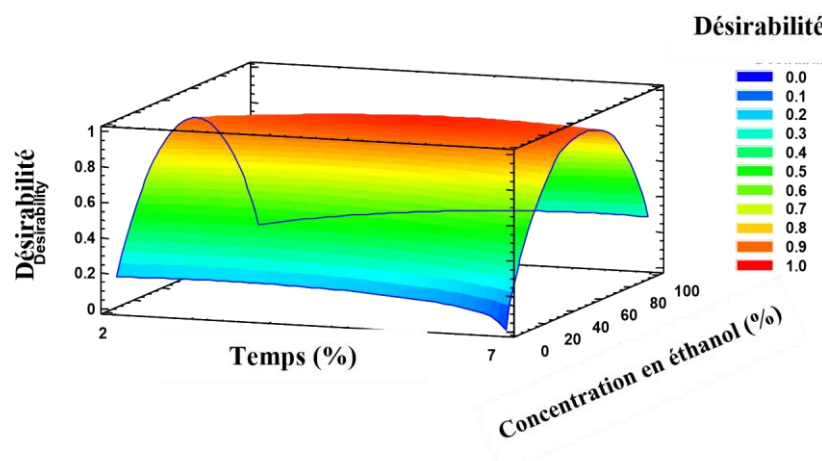


Figure 16 : Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets du temps d'extraction et de la concentration en éthanol sur la désirabilité de l'extrait de *C. azarolus* obtenu par extraction assistée par ultrasons.

7 Teneurs en composés phénoliques des extraits de *C. azarolus* obtenus par macération et Soxhlet

Les résultats de la TPT et l'activité antioxydante de l'extrait de *C. azarolus* obtenu dans les conditions optimales par la méthode d'extraction assistée par ultrasons ont été comparés à ceux obtenus par les deux méthodes conventionnelles (macération et Soxhlet).

7.1 Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux des extraits de *C. azarolus* obtenus par différentes méthodes d'extraction sont regroupés au niveau de la **Figure 17**.

L'étude statistique montre qu'il existe une différence significative entre les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits à $p \leq 0,05$. Par ailleurs, l'étude statistique montre que les TPT des extraits issus de la macération ne présente pas de différence significative à $p \leq 0,05$.

La plus forte TPT est obtenue dans le cas de l'extrait obtenu par ultrason qui est de $12,33 \pm 0,58$ mg EAG/g MS, cette dernière est presque trois fois plus importante à celle de l'extrait obtenu par le Soxhlet, malgré l'utilisation d'un temps d'extraction prolongé qui est de 150 min.

Le prolongement du temps d'extraction d'une heure dans le cas de la macération n'avait aucun effet significatif sur la TPT du fruit de *C. azarolus* (**Figure 17**).

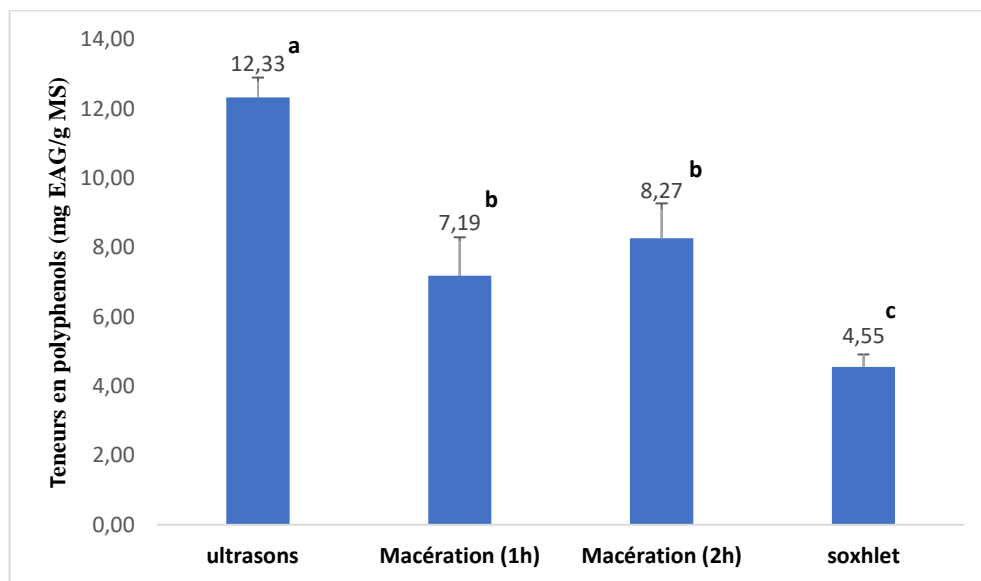


Figure 17 : Teneurs en polyphénols totaux de *C. azarolus*
Les résultats qui portent des lettres a>b>c montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

La plus forte TPT du fruit de *C. azarolus* issues des extrait méthanoliques par macération pendant trois jours à été obtenue au 24^{ème} jour de culture avec une valeur de 35.00 mg EAG / g MS. (BahriSahloul *et al.*, 2014).

L'extrait aqueux du fruit de *C. azarolus* obtenu avec la décoction a abouti à une TPT de $107,7 \pm 1,43$ mg EAG /g MS (Sammari *et al.*, 2014). Ces teneurs sont largement supérieures à celles trouvées dans notre étude.

7.2 Teneurs en flavonoïdes

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des extraits de *C. azarolus* sont regroupés au niveau de la **Figure 18**. Selon les résultats obtenus, on constate que les teneurs en flavonoïdes varient en fonction de la méthode d'extraction.

L'étude statistique montre que l'extrait de *C. azarolus* obtenu par le Soxhlet possède la plus forte teneur en flavonoïdes qui est de $3,42 \pm 0,14$ mg EQ/ g MS. Par contre, la plus faible teneur en flavonoïdes est obtenue dans le cas de la macération qui est de $1,38 \pm 0,01$ mg EQ/ g MS

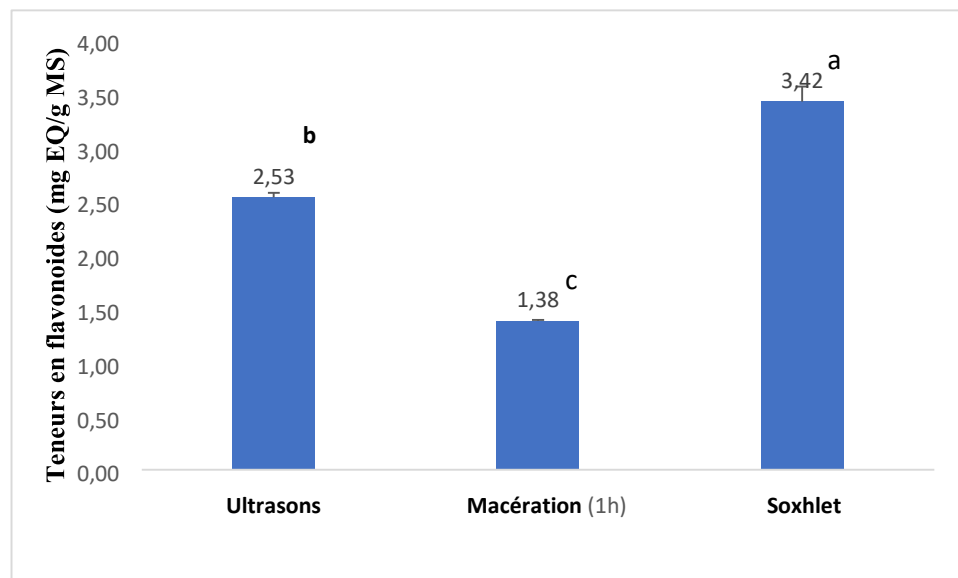


Figure 18 : Teneurs en flavonoïdes de *C. azarolus*

Les résultats qui portent des lettres a>b>c montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de *C. azarolus* est de $2,32 \pm 0,18$ mg EQ/ g MS (Lakache *et al.*, 2014). Cette dernière, corrobore à celle trouvée dans le cas des ultrasons. Par contre, elle est supérieure à celle trouvée dans notre étude dans le cas de la macération.

L'extrait méthanolique pur du fruit de *C. azarolus* récolté au 24^{ème} jour de culture, obtenu par macération à température ambiante pendant 3 jours, présente une teneur en flavonoïdes de $11,00 \pm 0,12$ mg rutine/g MS (Bahri-Sahloul *et al.*, 2014). Cette teneur est supérieure à celle de l'extrait éthanolique à 50% obtenu par macération à un temps d'extraction de 1h.

7.3 Teneurs en tannins

Les teneurs en tannins des différents extraits de fruit de *C. azarolus* sont représentées dans la **Figure 19**.

D'après les résultats de l'étude statistique on constate qu'il existe des différences significatives au niveau des teneurs en tannins pour les trois méthodes d'extraction utilisées.

La méthode d'extraction assistée par ultrasons donne la meilleure teneur en tannins qui est de 0,02 mg EC/g MS.

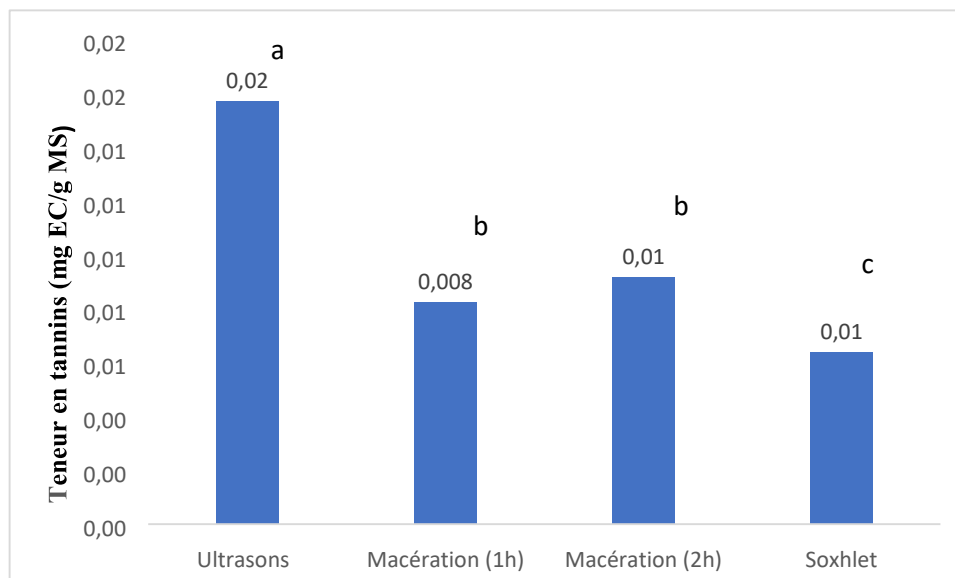


Figure 19 : Teneurs en tannins de *C. azarolus*

Les résultats qui portent des lettres a>b montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

Les teneurs en tannins des extraits aqueux de différentes parties de *C. azarolus* (feuilles, tiges et graines) obtenus par macération pendant 24h sont de 3,03 ; 2,87 et 1,10 mg/kg MS (**Balaky et al., 2021**). Une autre étude, montre que l'extrait méthanolique à 80 % de fruit de *C. azarolus* possède une teneur en tannins condensés de 0,21 % (**Mehdadi et al., 2015**).

La teneur en tannins de l'extrait aqueux du fruit de *C. azarolus* obtenu par décoction est de 6,09 \pm 0,62 mg CE/g MS (**Sammari et al., 2024**).

8 Activités antioxydantes des extraits de *C. azarolus* obtenus par macération et Soxhlet

8.1 Effet de piégeage du radical libre DPPH

L'effet du piégeage du radical libre DPPH des différents extraits du fruit de *C. azarolus* est représenté dans la **Figure 20**.

L'étude statistique montre que les effets de piégeage du radical libre DPPH des extraits obtenus par ultrasons et par macération à un temps d'extraction de 2h ne présentent pas de différence significative à $p \leq 0,05$. Par contre, il existe une différence significative de l'effet de piégeage du radical libre DPPH des autres extraits.

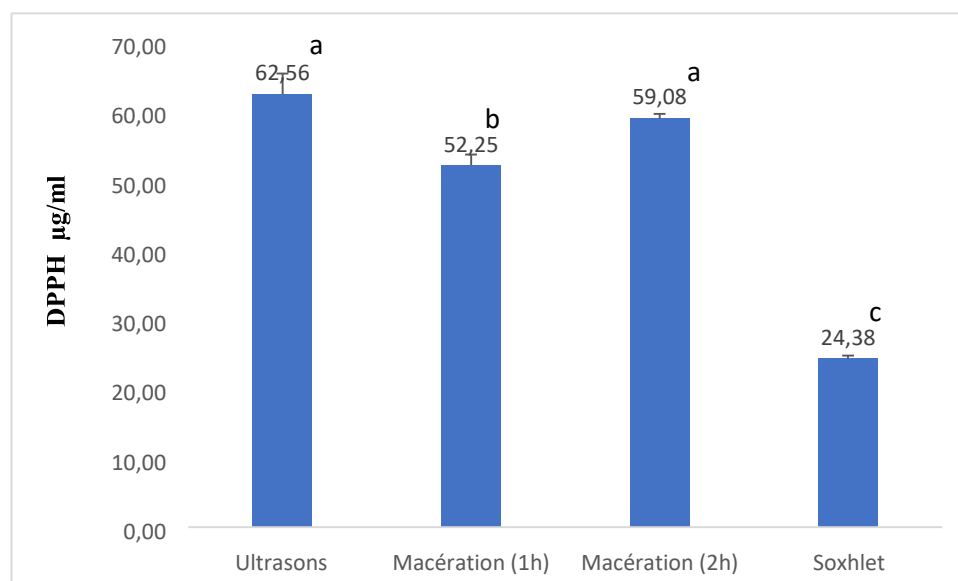


Figure 20 : effets de piégeage du radical libre DPPH de *C. azarolus*
Les résultats qui portent des lettres a>b>c>d montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

La méthode d'extraction assistée par ultrasons et la macération pendant 2h donnent le meilleur effet de piégeage du radical libre DPPH avec une valeur de $62,56 \pm 2,96$ µg/ml. Par contre, l'extraction par le Soxhlet donne le plus faible effet de piégeage du radical libre DPPH avec une valeur de $24,38 \pm 0,42$ µg/ml.

(Razola-Díaz *et al.*, 2024) rapportent dans leur étude que l'effet de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait éthanolique du fruit de *C. azarolus* obtenu par ultrasons est de 5.29 ± 0.08 ET/g MS.

Sammari *et al.* (2024) rapportent dans leur étude que l'effet de piégeage du radical libre DPPH (IC_{50}) de l'extrait aqueux du fruit de *C. azarolus* obtenu par décoction est de 164.17 ± 4.78 µg/ml.

8.2 Effet de piégeage du radical cationique ABTS

L'effet de piégeage du radical cationique ABTS des différents extraits du fruit de *C. azarolus* est représenté dans la **Figure 21**.

L'étude statistique montre que les effets de piégeage du radical cationique ABTS des extraits obtenus par macération et par Soxhlet à un temps d'extraction de 1h et de 120 minutes ne présentent pas de différence significative à $p \leq 0,05$. Par contre, l'effet de piégeage du radical cationique ABTS de l'extrait obtenus par ultrasons est inférieur à celui trouvé dans les deux autres techniques qui est de 14.86 mmol / g MS.

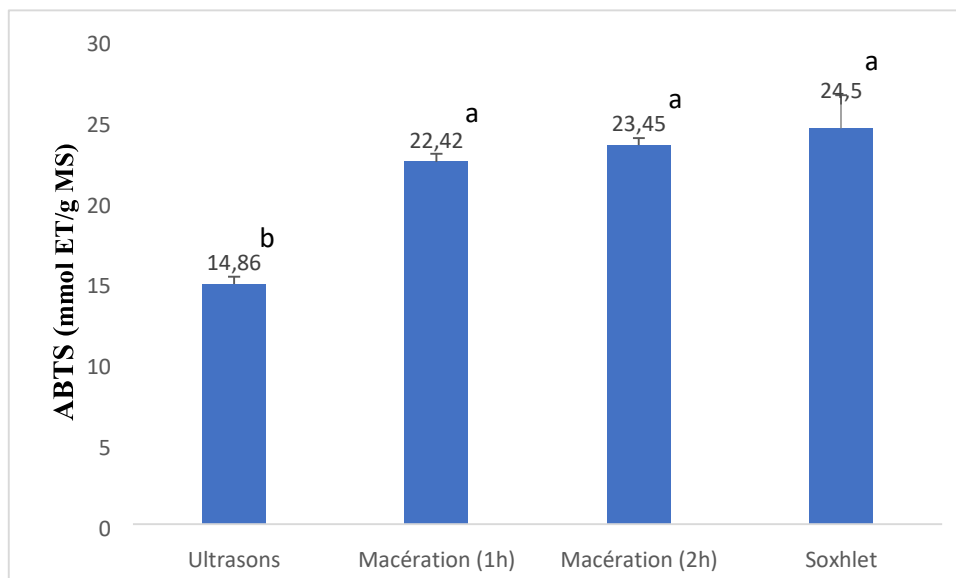


Figure 21 : Effet de piégeage du radical cationique ABTS de *C. azarolus*
Les résultats qui portent des lettres a>b montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

De ce fait, il existe une différence significative de l'effet de piégeage du radical cationique ABTS selon la méthode d'extraction.

L'effet de piégeage du radical cationique ABTS des extraits obtenus par le Soxhlet et la macération ne présente pas de différence significative à $p \leq 0,05$.

Le plus fort effet de piégeage du radical cationique ABTS est obtenu dans le cas d'extraction par le Soxhlet et la macération pendant un temps d'extraction de 2h avec une valeur de $24,50 \pm 2,06$ mmol ET/g MS. Tandis que, le plus faible effet de piégeage du radical cationique ABTS est obtenu dans le cas des ultrasons avec une valeur de $14,86 \pm 0,46$ mmol ET/g MS.

Le plus fort effet de piégeage du radical cationique ABTS des extrait méthanoliques obtenus par macération pendant 3 jours du fruit de *C. azarolus* est de $0,06741 \text{ mmol} \pm 11,4$ Trolox /g MS au 24^{ème} jour de culture (**Bahri-Sahloul et al., 2014**).

Le taux de piégeage des radicaux cationiques ABTS des extrait éthanoliques à 80% du fruit de *C. azarolus* est de $14,00 \pm 0,02$ mg ET/g MS (**Razola-Díaz et al., 2024**).

8.3 Pouvoir réducteur

La figure ci-dessous représente le pouvoir réducteur des différents extraits du fruit de *C. azarolus*.

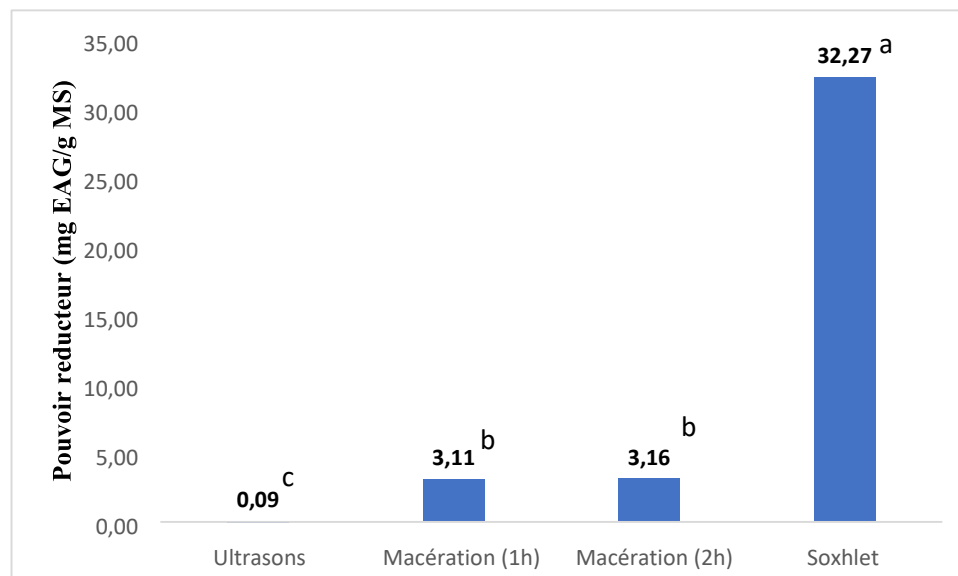


Figure 22 : le pouvoir réducteur des différents extraits de *C. azarolus*
Les résultats qui portent des lettres a>b>c montrent des différences significatives à $p \leq 0,05$

L'étude statistique montre que les pouvoirs réducteurs des extraits obtenus avec les différentes techniques d'extraction ont une différence significative à $p \leq 0,05$.

Le plus fort pouvoir réducteur du fruit de *C. azarolus* a été obtenu dans le cas d'extraction avec le Soxhlet avec une teneur de $32,26 \pm 0,16$ mg EAG/g MS. Tandis que, les extraits obtenus par ultrasons et la macération affichent un pouvoir réducteur moins important (**Figure 22**).

Le pouvoir réducteur des feuilles de *C. azarolus* au stade végétatif, de floraison et de fructification est de $506,04 \pm 1,95$; $262,26 \pm 1,32$ et $379,07 \pm 2$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement (**Amor et Belhattab., 2015**) Une autre étude rapporte le pouvoir réducteur (absorbance à 700 nm) des extraits aqueux et éthanolique du fruit de *C. azarolus* qui est de de 0,123 et 0,19, respectivement (**Keser et al., 2014**). Par ailleurs, l'extrait aqueux des feuilles de *C. meyeri* montre un pouvoir réducteur (absorbance à 700 nm) de $0,2110 \pm 0,001$ (**Ekin et al., 2017**).

Conclusion

La présente étude a pour but l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des extraits des fruits de *C. azarolus* obtenus par la méthode d'extraction assistés par ultrasons en utilisant un plan d'expérience avec trois variables et l'étude de trois réponses.

Les taux d'humidité et en cendres retrouvés dans le fruit de *C. azarolus* de la région de Kendira (Béjaïa) sont de $70,83 \pm 1,89$ % et $3,67 \pm 1,15$ %, respectivement.

Le fruit de *C. azarolus* possède une faible teneur en caroténoïdes qui est de $1,06 \pm 0,17$ mg β -carotène/g MS.

Le meilleur rendement d'extraction en pectine du fruit de *C. azarolus* est obtenu avec l'acide citrique à pH=2, qui est de 12 %.

Le fruit de *C. azarolus* possède une teneur en sucres totaux équivalente à $47,49 \pm 0,6$ g de glucose/100 g MS.

La plus forte teneur en polyphénols totaux des extraits de *C. azarolus* proposée par le plan d'expérience Box-Benken qui est de 17,43 mg EAG/g MS. Cette dernière est obtenue dans les conditions optimales d'extraction de 7 minutes, 50% d'éthanol et une amplitude de 100 %.

Le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *C. azarolus* proposé par le plan d'expérience Box-Benken qui est de 81,86 μ g EAG/ml, dont les conditions optimales sont de 7 min, 100 % d'amplitude et 50% d'éthanol.

Le plus fort effet de piégeage du radical cationique ABTS des extraits de *C. azarolus* proposée par le plan d'expérience Box-Benken est de 22,77 mmol ET/g MS, dont les conditions optimales sont 4,5 minutes, une amplitude de 60% et une concentration de 50% en éthanol.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait optimisé de *C. azarolus* est de $2,53 \pm 0,04$ mg EQ/g MS.

La teneur en tannins condensés de l'extrait optimisé de *C. azarolus* varie de 0,53 à 1,6 mg EC/g MS.

Les fruits de *C. azarolus* possèdent un pouvoir réducteur de 0,089 mg/g MS.

L'optimisation des réponses de surfaces multiples des extraits de *C. azarolus* a permis d'identifier les conditions optimales d'extraction qui sont un temps d'extraction de 4,79 minutes, une amplitude de 79% et un taux de 52% d'éthanol.

Ces derniers permettent d'avoir une teneur en polyphénols totaux de 12,33 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 62,56 μ g EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 14,86 mmol ET/g MS.

La plus forte TPT est obtenue dans le cas de l'extrait obtenu par ultrasons qui est de 12,33 \pm 0,58 mg EAG/g MS.

L'extrait de *C. azarolus* obtenu par le Soxhlet possède la plus forte teneur en flavonoïdes qui est de 3,42 \pm 0,14 mg EQ/ g MS

La méthode d'extraction assistée par ultrasons donne la meilleure teneur en tannins qui est de 0,02 mg EC/g MS.

La méthode d'extraction assistée par ultrasons et la macération pendant 2h donnent le meilleur effet de piégeage du radical libre DPPH avec une valeur de 62,56 \pm 2,96 μ g/ml.

Le meilleur effet de piégeage du radical cationique ABTS est obtenu avec l'extrait obtenu par Soxhlet avec une valeur de 24,50 \pm 2,06 mmol / g MS.

Le pouvoir réducteur le plus fort du fruit de *C. azarolus* a été obtenu dans le cas de l'extrait obtenu par le Soxhlet avec une teneur de 32,26 \pm 0,16 mg EAG/g MS.

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

- D'étudier d'autres variables indépendantes qui pourraient influencer l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques telle que la fréquence des ultrasons,
- Détermination de la composition chimique de l'extrait optimisé de *C. azarolus* par LC/MS pour l'extrait optimisé et ceux obtenus par macération et par Soxhlet,
- Utilisation d'autres méthodes d'extraction (micro-onde), et d'autres solvants d'extraction (méthanol),
- Étudier d'autres parties de la plante (fleurs, tiges),
- Étudier d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire, antibactérienne, anticancéreuses...),

- De faire une étude in vivo pour vérifier l'efficacité des antioxydants du fruit étudié,
- Enrichir certaines denrées alimentaires avec les extraits de ce fruit et l'évaluation de leurs effets sur la conservation et la qualité nutritionnelle des aliments.

Références bibliographiques

- Anonyme 2013.** Ultrasonic Homogenizers for Liquid Processing [WWW Document]. Hielscher Ultrasonics. URL <https://www.hielscher.com/fr/ultrasonic-homogenizers-for-liquidprocessing-3htm> (consulté le 03/05/2024)
- Abdelguerfi A., 2003.** Plan d'action et stratégie nationale sur la biodiversité, Tomes IX à XII, Évaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture, FEM/ PNUD, Projet ALG/97/G31, Minist. Aménagement. Territoire. Environ., Alger, Algérie.
- 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, 2708–2713.
- Alanbari, A., 2021.** Profile of phenols, tannins and antioxidant activity of some medicinal plants by using hplc.
- Alirezalu, A., Ahmadi, N., Salehi, P., Sonboli, A., Alirezalu, K., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., 2020.** Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Hawthorn (*Crataegus* spp.) Fruits species for Potential Use in Food Applications. *Foods* 9, 436.
- Al-Mustafa, A.H., Al-Thuniba, O.Y., 2008.** Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 351–358. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.351.358>
- Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R., Lightfoot, D.A., 2016.** Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE* 11, e0148758.
- Amor et Belhattab., 2015.** Antioxidant activity of aqueous extracts from *Crataegus oxyacantha* leaves. *Pharmacognosy Communications* 5, 229–232.
- Baba Aissa F., 1999.** Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident, Ed. Edas, 178 p
- Bahorun, T., Trotin, F., Vasseur, J., 1994.** Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures. *Phytochemistry* 37, 1273–1276.
- 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. *ArzeimittelForschung*, **Bahri-Sahloul, R., Ben Fredj, R., Boughalleb, N., Shriiaa, J., Saguem, S., Hilbert, J.-L., Trotin,**

- F., Ammar, S., Bouzid, S., Harzallah-Skhiri, F., 2014.** Phenolic Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. Ovaries Calli. *Journal of Botany*, 1–11.
- Balaky, H.H., Khalid, K., Hasan, A., Tahir, S., Ubur, S., Khedir, A., 2021.** Estimation of total tannin and total phenolic content in plant (*Crataegus azarolus* L) by orbital shaker technique. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences* 5, 1–6.
- Banderas-Tarabay., J.A., Cervantes-Rodríguez., M., 2015.** Biological Properties and Antioxidant Activity of Hawthorn *Crataegus mexicana*. *Journal of Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics* 06.
- Belkhir, M., Rebai, O., Dhaouadi, K., Congiu, F., Tuberoso, C.I.G., Amri, M., Fattouch, S., 2013.** Comparative Analysis of Tunisian Wild *Crataegus azarolus* (Yellow Azarole) and *Crataegus monogyna* (Red Azarole) Leaf, Fruit, and Traditionally Derived Syrup : Phenolic Profiles and Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous-Acetone Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 130926133925000.
- Benaggoune, K., Mouss, H., Abdessemed, A.A., Bensakhria, M., 2018.** Agent-based prognostic function for multicomponents system with stochastic dependence, in : *International Conference on Applied Smart Systems (ICASS)*. IEEE.
- Boucher, R.M.G., 1970.** Sonochemistry at low and high ultrasonic frequencies, *British Chemical Engineering Journal*, 15 (3), pp. 363-367.
- Boudjada, A., Touil, A., Bendif, H., Bensouici, chawki, Rhouati, salah, 2018.** Phytochemical constituents, phenolic contents, and antioxidant activity of *crataegus azarolus* extracts. *Asian journal of Pharmaceutical and clinical research* 11, 133.
- Boudraa, S., Hambaba, L., Zidani, S., Boudraa, 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. *Fruits* 65, 75–84.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Bruneton, J., 1999.** *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*. Tec & Doc Lavoisier.
- Buddin, M. M. H. S., Rithuan, M. Z. A., Surni, M. S. A., Jamal, N. H. M., & Faiznur, M. F. 2018.** Ultrasonic assisted extraction (UAE) of *Moringa oleifera* Seed Oil : Kinetic study. *ASM Science Journal*, 11(3), 158–166.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993.** Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14, 303–311.

- Carreira-Casais, A., Carpena, M., Pereira, A.G., Chamorro, F., Soria-Lopez, A., Perez, P.G., Otero, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A., 2021.** Critical Variables Influencing the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds—A Review, in : The 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry. MDPI, Basel Switzerland.
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A.G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A., 2021.** Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, 9153.
- Chang, Q., Zuo, Z., Moses S.S. Chow, Walter K.K. Ho, 2006.** Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. *Food Chemistry* 98, 426–430.
- 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.
- Charpe, T.W., Rathod, V.K., 2015.** Separation of glycyrrhizic acid from licorice root extract using macroporous resin. *Food and Bioproducts Processing* 93, 51–57.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017.** Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560.
- 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., 2004b.** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 188–195.
- Chemat, S., Lagha, A., Ait Amar, H., Chemat, F., 2004a.** Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 5–8.
- Croxton, P.J., Sparks, T.H., 2002.** A farm-scale evaluation of the influence of hedgerow cutting frequency on hawthorn (*Crataegus monogyna*) berry yields. *Agriculture, Ecosystems & amp ; Environment* 93, 437–439.

- Di Pierro, F., Derosa, G., Maffioli, P., Bertuccioli, A., Togni, S., Riva, A., Allegrini, P., Khan, A., Khan, S., Khan, B.A., Altaf, N., Zahid, M., Ujjan, I.D., Nigar, R., Khushk, M.I., Phulpoto, M., Lail, A., Devrajani, B.R., Ahmed, S., 2021.** Possible Therapeutic Effects of Adjuvant Quercetin Supplementation Against Early-Stage COVID-19 Infection : A Prospective, Randomized, Controlled, and Open-Label Study. *International Journal of General Medicine* Volume 14, 2359–2366.
- Dirlik, S., Eser, Y., 2021.** Morphological seedling characteristics in *Crataegus monogyna* and *Crataegus azarolus* species. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 22, 103–108.
- 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.
- Dobignard, Alain.** “Cinq Nouveaux Taxons Pour La Flore Du Maroc.” *Le Journal de Botanique*, vol. 48, 2009, pp. 7–20.
- Dogan, K., Akman, P.K., Törnük, F., 2019.** Improvement of Bioavailability of Sage and Mint by Ultrasonic Extraction. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology* 2, 122–135.
- Dzhangaliev, A.D., Salova, T.N., Turekhanova, P.M., 2002.** The Wild Fruit and Nut Plants of Kazakhstan. *Horticultural Reviews* 305–371.
- Ekin, S., Bayramoglu, M., Goktasoglu, A., Ozgokce, F., Kiziltas, H., 2017.** Antioxidant activity of aqueous and ethanol extracts of *crataegus meyeri* pojark leaves and contents of vitamin, trace element. *Journal of the Chilean Chemical Society* 62, 3661–3667.
- 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.
- Ferhat R., 2008.** Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Cratagus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L et *Ziziphus lotus* L.
- Gerschman, R., 1981.** Historical Introduction to the “Free Radical Theory” of Oxygen Toxicity, in : *Topics in Environmental Physiology and Medicine*. Springer New York, New York, NY, pp. 44–46.
- Ghitescu, R. E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A. M., Gilca, I. A. et Popa, V. I. 2015.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 535–541.
- Giacometti, J., Žauhar, G., Žuvić, M., 2018.** Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.) Using Response Surface Methodology. *Foods* 7, 149.

- Girre, L. (2000).** Les plantes médicinales. Ouest-France (Éd). Rennes. 30p.
- Gordon, M.H., 1990.** The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro, in : Food Antioxidants. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–18.
- Gourguillon L, Destandau É, Lobstein A, Lesellier É. 2016.** Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie* ; 19 :1133–41.
- Grieve, M., 1971.** A Modern Herbal, Vol. I. Courier Corporation.
- Hadiyanto, H., Sutrisnorhadi, S., 2016.** Response Surface Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Phycocyanin from Microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28, 227.
- Han, Y., Shu, D., Wang, J., Sun, B., 2006.** Microstructure and grain refining performance of Al–5Ti–1B master alloy prepared under high-intensity ultrasound. *Materials Science and Engineering : A* 430, 326–331.
- Harman, D., 1992.** Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging* 275, 257–266.
- Jadhav, D., B.N., R., Gogate, P.R., Rathod, V.K., 2009.** Extraction of vanillin from vanilla pods : A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering* 93, 421–426.
- Jeganathan, P.M., Venkatachalam, S., Karichappan, T., Ramasamy, S., 2013.** Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using box–behken design. *Preparative biochemistry and biotechnology* 44, 56–67.
- Jing, C.-L., Dong, X.-F., Tong, J.-M., 2015.** Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method. *Molecules* 20, 15550–15571.
- Johnston, J.W., Dussert, S., Gale, S., Nadarajan, J., Harding, K., Benson, E.E., 2006.** Optimisation of the azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid radical scavenging assay for physiological studies of total antioxidant activity in woody plant germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 193–201.
- Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, O., Turkoglu, I., 2014.** The Investigation of Some Bioactive Compounds and Antioxidant Properties of Hawthorn (*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* jacq.). *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 3, 51.

- Kim, D.-O., 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, 253–273.
- Kim, H.S., Lee, A.Y., Moon, B.C., Kim, W.J., Choi, G., 2019.** Ultrasonic-assisted extraction process and method validation for deoxypodophyllotoxin from the roots of *Anthriscus sylvestris* : Application of response surface methodology and UPLC–PDA–QDa. *Acta Chromatographica* 31, 126–132.
- Koyuncu, T., Pinar, Y., Lule, F., 2007.** Convective drying characteristics of azarole red (*Crataegus monogyna* Jacq.) and yellow (*Crataegus aronia* Bosc.) fruits. *Journal of Food Engineering* 78, 1471–1475.
- Lacoste S., 2006.** Les plantes qui guérissent. LEDUC.s (Ed). Paris, 399p.
- Lainez, P., Torres, T., Del, M., García-Mateos, M., Winkler, R., Barrientos-Priego, A., Angel, N., Aguilar-Rincón, H., García-Velázquez, J., 2019.** Metabolomic study of volatile compounds in the pigmented fruit from Mexico *Crataegus* genotypes. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 92, 15–23.
- Lakache, Z., Tigrine-Kordjani, N., Tigrine, C., Kameli, A., Meklati, B.Y., 2014.** Volatile Constituents, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of *Crataegus azarolus* Leaves and Flowers Growing in Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 50, 1132–1135.
- Leighton, T.G., 1994.** The Forced Bubble, in : *The Acoustic Bubble*. Elsevier, pp. 287–438.
- Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., Londoño, A.M., 2006.** Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rainforest of Colombia. *Food Chemistry* 95, 644–652.
- 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.
- Li, Z., Yang, F., Yang, L., Zu, Y.-G., 2016.** Ultrasonic Extraction of Oil from *Caesalpinia spinosa*(Tara) Seeds. *Journal of Chemistry* 2016, 1–6.
- Liu, N., Yang, W., Li, X., Zhao, P., Liu, Y., Guo, L., Huang, L., Gao, W., 2022.** Comparison of characterization and antioxidant activity of different citrus peel pectins. *Food Chemistry* 386, 132683.

- Liu, T., Cao, Y., Zhao, M., 2010.** Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. major) fruits. *Food Chemistry* 119, 1656–1662.
- Ljubuncic, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A., 2005.** Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 153–161.
- Lust, J., 2014.** *The Herb Book : The Most Complete Catalog of Herbs Ever Published.* Courier Corporation.
- 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.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P., 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine /sciences* 20, 458–463.
- Marcel Jules, Aubépine, Gingembre, 2011., :** *Benezit Dictionary of Artists.* Oxford University Press.
- Mason, T.J., Lorimer, J.P., 2002.** *Applied Sonochemistry.* Wiley. Máthé, Á., Turgut, K., 2023. *Medicinal and Aromatic Plants of Turkey.* Springer Nature.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., Pacheco, N., 2017.** Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* 7, 47.
- Mohd, F., Don, M., 2016.** Ultrasonic-assisted extraction of oil from *calophyllum inophyllum* seeds : optimization of process parameters. *Jurnal teknologi* 78. 6
- Mraihi, F., Journi, M., Chérif, J.K., Sokmen, M., Sokmen, A., Trabelsi-Ayadi, M., 2013.** Phenolic Contents and Antioxidant Potential of *Crataegus* Fruits Grown in Tunisia as Determined by DPPH, FRAP, and β -Carotene/Linoleic Acid Assay. *Journal of Chemistry* 2013, 1–6
- Ngargueudedjim, K., Ngarmaim, N., Bassa, B., Allarabeye, N., Annouar, D., AbdelRahim, M., ... & Fogue, M. 2015.** Physical characteristics of tall-palm (*Borassus Aethiopum* Mart., *Arecaceae*) of Chad/Central Africa. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(3), 553
- 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*.

- Ofori-Boateng, C., Lee, K.T., 2013.** Response surface optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds. *Food Science & Nutrition* 1, 209–221.
- Osborne, D.R. and Voogt, P. 1978** *The Analysis of Nutrients in Foods*. Academic Press, London, 160-239.
- Oyaizu, M., 1986.** Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44, 307–315.
- Özcan, M., Haciseferoğullari, H., Marakoğlu, T., Arslan, D., 2005.** Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit : some physical and chemical properties. *Journal of Food Engineering* 69, 409–413.
- Petigny, L., Périno-Issartier, S., Wajsman, J., Chemat, F., 2013.** Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *International Journal of Molecular Sciences* 14, 5750–5764.
- Pham-Huy, C., Pham Huy, B., 2022.** Free Radicals and Antioxidants, in : *Food and Lifestyle in Health and Disease*. CRC Press, Boca Raton, pp. 109–155.
- Pincemail, J., Vanbelle, S., Gaspard, U., Collette, G., Haleng, J., Cheramy-Bien, J.P., Charlier, C., Chapelle, J.P., Giet, D., Albert, A., Limet, R., Defraigne, J.O., 2007.** Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liège, Belgium. *Human Reproduction* 22, 2335–2343.
- Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, 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, 57–63.
- Prommajak, T., Surawang, S., & Rattanapanone, N. 2014.** Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (*Houttuynia cordata* Thunb.), 36(1), 65–72
- Prouillac, C. 2006.** Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Étude de leur mécanisme d'action in vitro. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, 254p
- Rabiei, Kh., Bekhradnia, S., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Ebrahimzadeh, M.A., 2012.** Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagynasubsp. elburensis*. *Natural Product Research* 26, 2353–2357.
- Rahaman, Md.M., Hossain, R., Herrera-Bravo, J., Islam, M.T., Atolani, O., Adeyemi, O.S., Owolodun, O.A., Kambizi, L., Daştan, S.D., Calina, D., Sharifi-Rad, J., 2023.** Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits : An update. *Food Science & Nutrition* 11, 1657–1670.

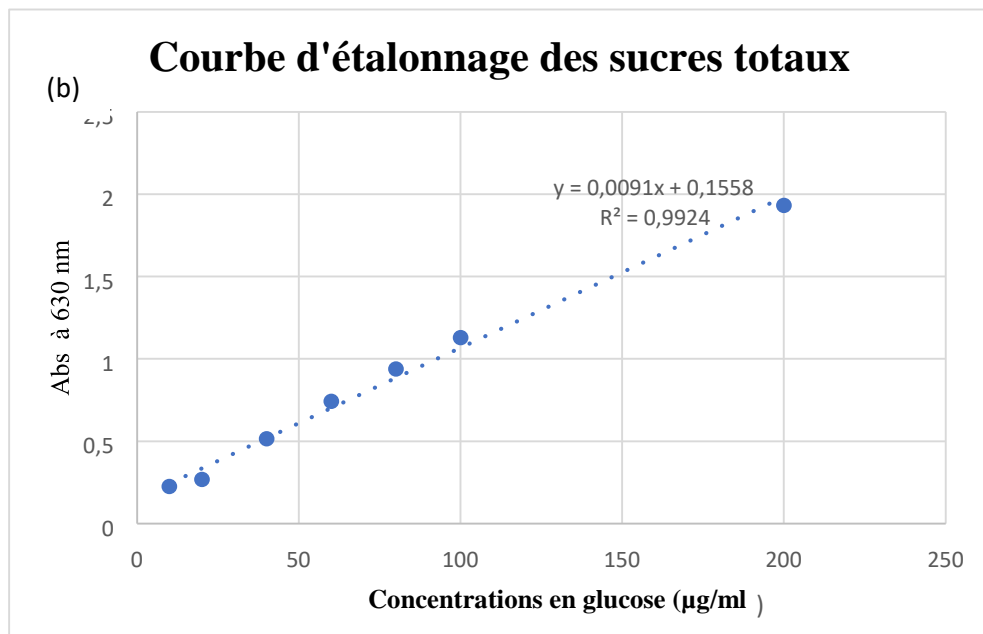
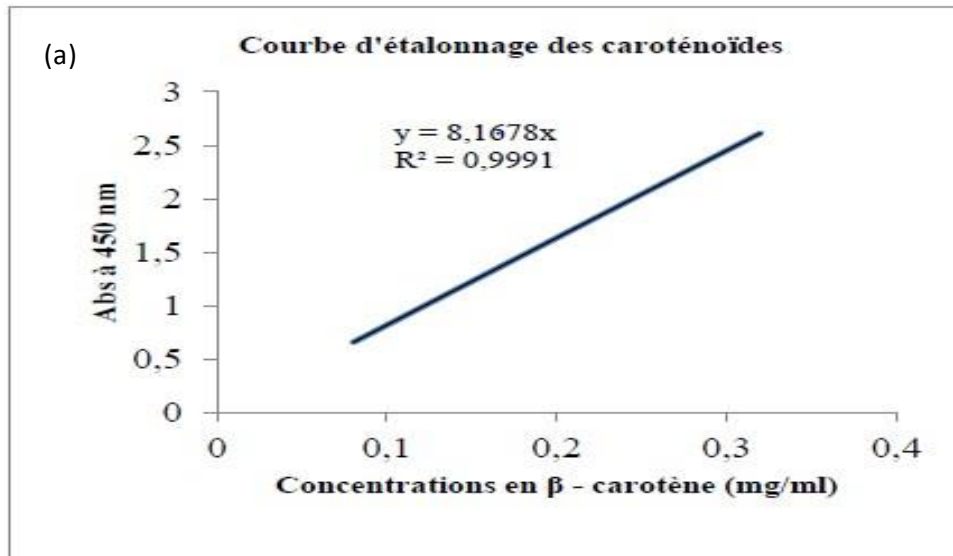
- Razola-Díaz, M. del C., Aznar-Ramos, M. J., Benítez, G., Gómez-Caravaca, A. M., & Verardo, V. 2024.** Exploring the potential of phenolic and antioxidant compounds in new Rosaceae fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(6), 3705–3718.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- Ribereau-Gayon. 1968.** Notions générales sur les composés phénoliques in : les composés phénoliques des végétaux. Ed. Paris : Dunod, p : 1-27.
- Saadoudi M., 2008.** Etude de la fraction glucidique des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Cratagus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L et *Ziziphus lotus* L.
- Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H., 2002.** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 251–265.
- Saklar Ayyildiz, S., Karadeniz, B., Sagcan, N., Bahar, B., Us, A.A., Alasalvar, C., 2018.** Optimizing the extraction parameters of epigallocatechin gallate using conventional hot water and ultrasound assisted methods from green tea. *Food and Bioproducts Processing* 111, 37–44.
- Salar Bashi, D., Mortazavi, S.A., Rezaei, K., Rajaei, A., Karimkhani, M.M., Ahmadi, A., 2011.** Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds. *Clinical Biochemistry* 44, S354.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C., Ghazali, H., 2013.** Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and Solvent Extraction of Papaya Seed Oil : Yield, Fatty Acid Composition and Triacylglycerol Profile. *Molecules* 18, 12474–12487.
- Sammari, H., Jedidi, S., Selmi, H., Jridi, M., Ayari, A., Sebai, H., 2024.** Phytochemical Properties of *Crataegus azarolus* Berries Decoction Extract and Evaluation of its Protective Activity Against Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis in Rats. *Dose-Response* 22.
- Sanchez-Moreno, C., 2002.** Review : Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International* 8, 121–137.
- Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., Toth-Markus, M., 2005.** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International* 38, 1023–1029.
- Schofield P., Mbugua D-M., Pell A N., 2001.** Analysis of condensed tannins : a review. *Animal Food and Technology*, 91 : 21-40

- Serhane K., 2005.** Journée d'Etude et d'Information sur l'Azerolier. Institut de Technologie Moyen Agricole Spécialisé de Sétif. Algérie.
- Sitthiya, K., Devkota, L., Sadiq, M.B., Anal, A.K., 2017.** Extraction and characterization of proteins from banana (*Musa Sapientum* L) flower and evaluation of antimicrobial activities. *Journal of Food Science and Technology* 55, 658–666.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M., Knez, Ž., 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89, 191–198.
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Laakso, I., Hiltunen, R., 2006.** Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 1112, 103–111.
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J.-P., Laakso, I., Hiltunen, R., 2002.** Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry* 60, 821–825.
- Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., Zubaidah Sulaiman, S., 2020.** An Overview : Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering* 778, 012165.
- Tahri, U., Béchar, M., Abdelkrim, C., 2013.** Développement d'une méthode analytique pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits de plantes *Houria Djeradi*.
- Teng, H., Chen, L., Huang, Q., Wang, J., Lin, Q., Liu, M., Lee, W.Y., Song, H., 2016.** Ultrasonic Assisted Extraction of Raspberry Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical Properties, Fatty Acid Compositions and Antioxidant Activities. *PLOS ONE* 11, e0153457.
- Thomas, D., 2016.** Les antioxydants de nos jours : définition et applications these de doctorat. Faculté de pharmacie. Université de limoges.
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., Martin Lo, Y., 2013.** Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 202–208.
- Uchiyama, M., Suzuki, Y., Fukuzawa, K., 1968.** Biochemical Studies of Physiological Function of Tocopheronolactone. 1. *YAKUGAKU ZASSHI* 88, 678–683.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006.** n.d. Phenolic Compounds and their Effects on Human Health, in : *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 235–255.
- Vivar-Vera, M.A., Salazar-Montoya, J.A., Calva-Calva, G., Ramos-Ramírez, E.G., 2007.** Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT - Food Science and Technology* 40, 278–284.

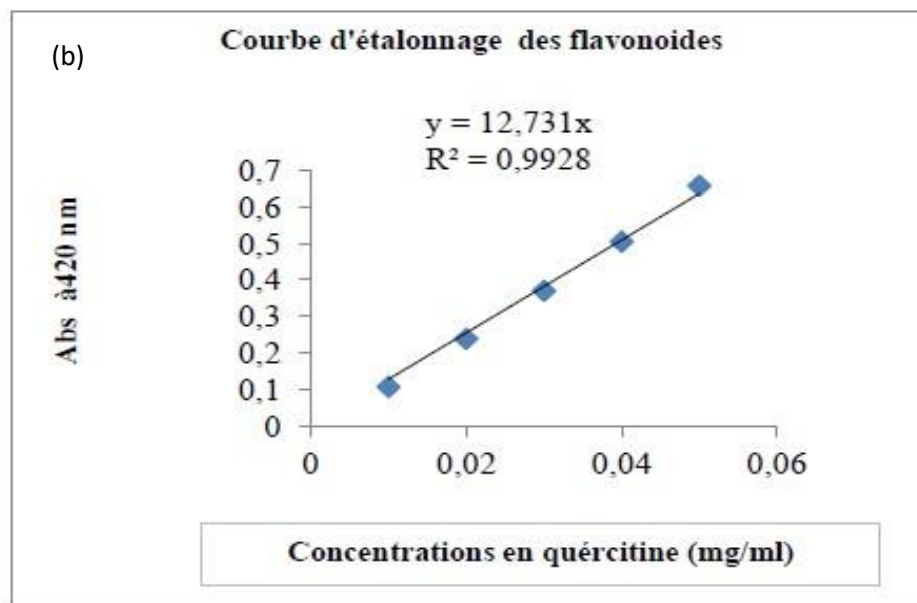
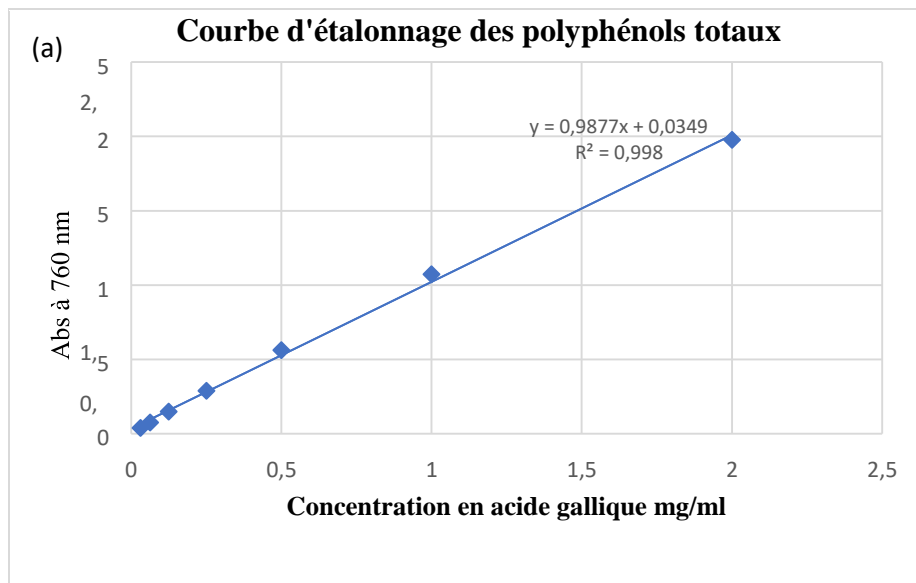
- Wloch, A., Kapusta, I., Bielecki, K., Oszmiański, J., Kleszczyńska, H., 2013.** Activity of Hawthorn Leaf and Bark Extracts in Relation to Biological Membrane. *The Journal of Membrane Biology* 246, 545–556.
- Yahyaoui, A., Arfaoui, M.O., Rigane, G., Hkir, A., Amari, K., Ben Salem, R., Ammari, Y., 2019.** Investigation on the Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Extracts from *Crataegus azarolus* L. : Effect of Growing Location of an Important Tunisian Medicinal Plant. *Chemistry Africa* 2, 361–365.
- Yang, L., Yin, P., Fan, H., Xue, Q., Li, K., Li, X., Sun, L., Liu, Y., 2017.** Response Surface Methodology Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of *Acer truncatum* Leaves for Maximal Phenolic Yield and Antioxidant Activity. *Molecules* 22, 232.
- Yousuf, O., Gaibimej, P., Singh, A., 2018.** Ultrasound Assisted Extraction of Oil from Soybean. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7, 843–852.
- Yves-Marie A., 1988.** Les pratiques du jardinage, Les Arbustes. Larousse (Ed). Paris, 128p.
- Yilmaz, T., Tavman, Ş., 2015.** Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from hazelnut skin. *Food Science and Technology International* 22, 112–121.
- Zhang, Q.-A., Zhang, Z.-Q., Yue, X.-F., Fan, X.-H., Li, T., Chen, S.-F., 2009.** Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry* 116, 513–518.
- Zhou, Y., Zheng, J., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., Li, H.-B., 2017.** Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidants from the Mung Bean Coat. *Molecules* 22, 638.
- Zoheir Mehdadi, Mokhtaria Hamdaoui, and Ali Latreche., 2015** evaluation of parietal polysaccharides and polyphenols of *crataegus monogyna* jacq. and valorization prospects, 2015. , : international conference on agricultural, ecological and medical sciences (aems2015) april 7-8, 2015 phuket (thailand). International institute of chemical, biological & environmental engineering.

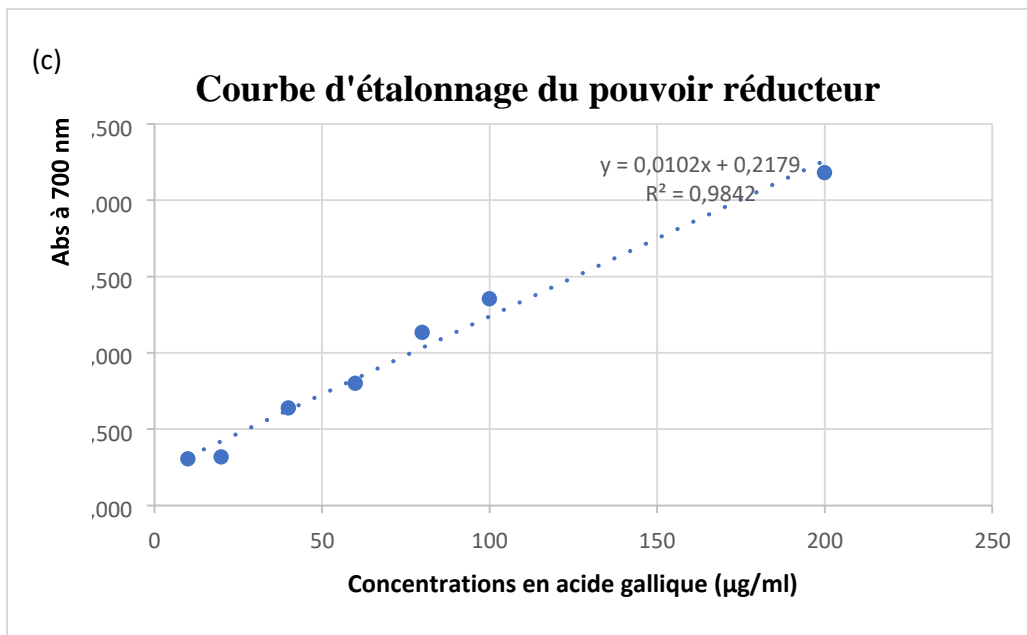
Annexes

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes (a) et des sucres totaux (b)

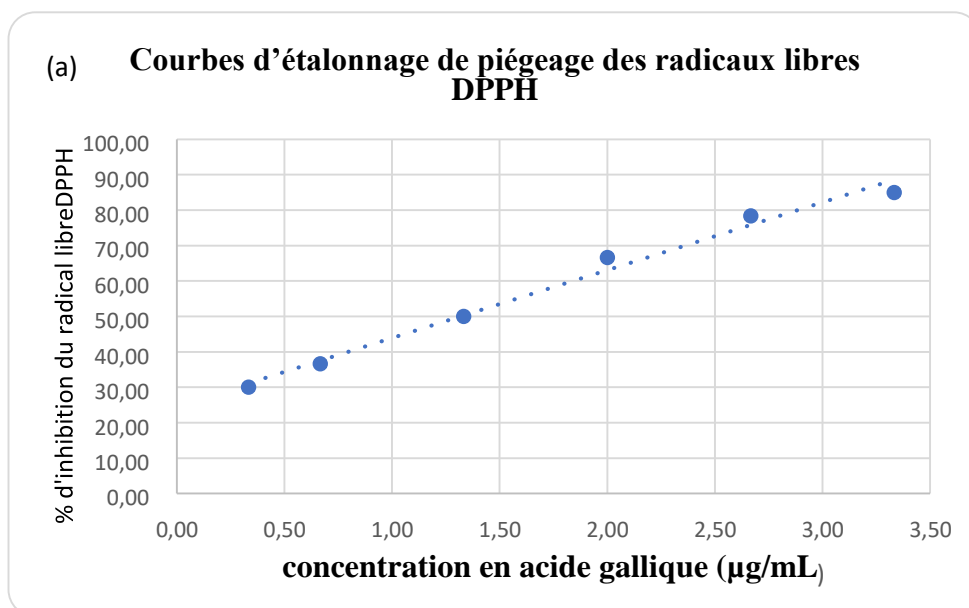


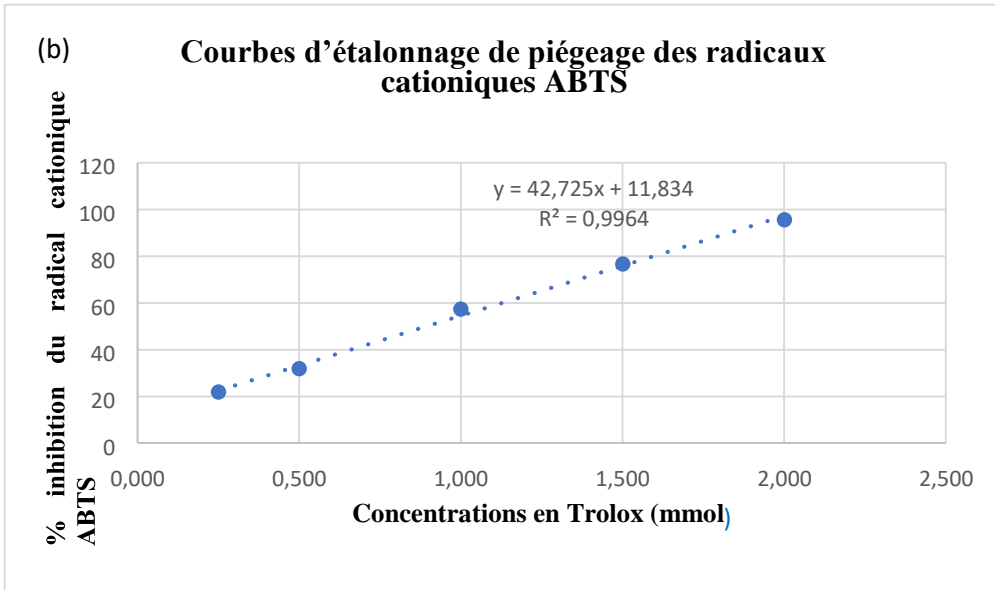
Annexe 02 : Courbes d'étalonnage pour les polyphénols totaux (a), flavonoïdes (b) et le pouvoir réducteur (c)





Annexe 03 : Courbes d'étalonnage de piégeage des radicaux libres DPPH (a) et de piégeage des radicaux cationiques ABTS (b)





Résumé : L'objectif de cette étude est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des fruits de *Crataegus azarolus* par la méthode d'extraction assistée aux ultrasons combinée avec la méthodologie de surface de réponse (RSM). Trois variables qui sont l'amplitude (20, 60 et 100%), la concentration en éthanol (0, 50 et 100%) et le temps d'extraction (2 ; 4 ,5 et 7 min) et trois réponses qui sont la teneur en composés phénoliques totaux et l'étude de l'activité antioxydant par le piégeage du radical ABTS et le radical libre DPPH ont été étudiées. Par ailleurs, la teneur en humidité, en cendre, en caroténoïdes, en pectines, en sucres totaux, des fruits de *C. azarolus* ont été déterminées. En outre l'effet de trois solvants l'eau, l'acide chlorhydrique et l'acide citrique sur le rendement d'extraction en pectines et une étude comparative des teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante de l'extrait obtenu par ultrasons dans les conditions optimales et des extraits obtenus par la macération et le Soxhlet ont été étudiés. Les teneurs en humidité, en cendres, en caroténoïdes et en sucres totaux, sont de $70,83 \pm 1,89$ %, $3,67 \pm 1,15$ %, $1,06 \pm 0,17$ mg β -carotène/g MS, $47,49 \pm 0,6$ g de glucose/100 g MS, respectivement. Le meilleur rendement d'extraction en pectines a été obtenu avec l'acide citrique qui est de 12%.

L'optimisation des réponses de surfaces multiples d'extrait de *C. azarolus* a permis d'avoir une TPT de $12,33 \pm 0,58$ mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de $62,56 \pm 2,96$ μ g EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de $14,86 \pm 0,46$ mmol ET/g MS, dont les conditions optimales d'extraction sont d'un temps d'extraction de 4,79 minutes, une amplitude de 79% et 52% d'éthanol. La plus forte TPT est obtenue dans le cas de l'extrait obtenu par ultrasons qui est de $12,33 \pm 0,58$ mg EAG/g MS. La plus forte teneur en flavonoïdes a été obtenu avec l'extrait obtenu par le Soxhlet qui est de $3,42 \pm 0,14$ mg EQ/ g MS. La plus forte teneur en tannins a été obtenu avec l'extrait obtenu par ultrasons avec une valeur de 0,02 mg EC/g MS. Le meilleur effet de piégeage du radical libre DPPH est obtenu avec les extraits obtenus par ultrasons et macération. Le meilleur effet de piégeage du radical cationique ABTS et le plus fort pouvoir réducteur sont obtenus par le Soxhlet avec des valeurs de $24,50 \pm 2,06$ mmol / g MS et de $32,26 \pm 0,16$ mg EAG/g MS, respectivement.

Mots clés : *Crataegus azarolus*, Plan d'expériences, Optimisation, Polyphénols, Activité antioxydante, Caroténoïdes, Pectines, Ultrasons, Macération et Soxhlet.

Abstract : The aim of this study was to optimise the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from *Crataegus azarolus* fruit using the ultrasound-assisted extraction method combined with response surface methodology (RSM). Three variables, namely amplitude (20, 60 and 100%), ethanol concentration (0, 50 and 100%) and extraction time (2, 4, 5 and 7 min), and three responses, namely total phenolics content and antioxidant activity by scavenging the ABTS and the DPPH free radicals, were studied. In addition, the moisture, ash, carotenoids, pectins and total sugar content of *C. azarolus* fruits were determined. In addition, the effect of three solvents water, hydrochloric and citric acids on the pectin extraction yield and a comparative study of the phenolic compounds content and antioxidant activity of the extract obtained by ultrasounds under optimum conditions and the extracts obtained by maceration and Soxhlet were studied. The moisture, ash, carotenoids and total sugar contents were $70.83 \pm 1.89\%$, $3.67 \pm 1.15\%$, 1.06 ± 0.17 mg β -carotene/g DM and 47.49 ± 0.6 g glucose/100 g DM, respectively. The best extraction yield of pectins was obtained with citric acid, which was 12%. Optimisation of multiple surface responses of *C. azarolus* extracts resulted in a TPC with a value of 12.33 ± 0.58 mg EAG/g DM, free radical scavenging of DPPH effect with a value of 62.56 ± 2.96 μ g EAG/ml and free radical scavenging of ABTS effect with a value of 14.86 ± 0.46 mmol ET/g DM, with optimal extraction conditions of 4.79 min extraction time, 79% amplitude and 52% ethanol. The highest TPC was obtained in the case of the extract obtained by ultrasounds, which was 12.33 ± 0.58 mg EAG/g DM. The highest flavonoids content was obtained with the extract obtained by Soxhlet, which was 3.42 ± 0.14 mg EQ/g DM. The highest tannins content was obtained with the extract obtained by ultrasounds with a value of 0.02 mg EC/g DM. The best DPPH free radical scavenging effect was obtained with the extracts obtained by ultrasounds and maceration. The best scavenging effect for the cationic radical ABTS and the highest reducing power were obtained by Soxhlet with values of 24.50 ± 2.06 mmol / g DM and 32.26 ± 0.16 mg EAG/g DM, respectively.

Key words : *Crataegus azarolus*, Experimental design, Optimisation, Polyphenols, Antioxidant activity, Carotenoids, Pectins, Ultrasounds, Maceration and Soxhlet.

