

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 Biologie Physico -Chimique
Laboratoire ou unité de recherche de rattachement Biotechnologie végétales et
Ethnobotanique (LBVEB)

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

SALEMI Meriam épouse SALMI

Thème

Optimisation de l'extraction assistée par ultrason et
macération des composés phénoliques de
Hammada scoparia, caractérisation et évaluation
de leurs activités biologiques

Soutenue le : 02/07/2025

Devant le Jury composé de : Nom et

Prénom

Grade

Mme FADLOUNE-OUKIL Naima	Prof	Univ. de Béjaia	Président
Mme METROUH-AMIR Hassiba	MCA	Univ. de Béjaia	Rapporteur
Mme BOUGOFFA-SADAOUI Khalida	MCA	Univ. de Béjaia	Examinatrice
Mr DAHMOUNE FARID	Prof	Univ. de Bouira	Examineur
Mr KADRI Nabil	Prof	Univ. de Bouira	Examineur

Année Universitaire : 2024-2025

Remerciements

Avant tout, j'exprime ma profonde gratitude à Dieu, qui m'a accordé la force, le courage, la patience et la persévérance nécessaires pour réussir ce travail.

*J'exprime mes vifs remerciements à ma directrice de thèse **Madame METROUH-AMIR Hassiba** pour ses conseils, sa disponibilité sans faille, sa patience et surtout sa gentillesse.*

*J'exprime ma sincère gratitude à **Monsieur AMIR Nadir** pour son aide précieuse et son soutien tout au long de ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Madame Georgia Spigno** pour son accueil chaleureux dans son laboratoire en Italie, ainsi que pour son accompagnement et sa précieuse collaboration.*

*J'adresse mes sincères remerciements à madame **Gali Roberta** pour son accompagnement et ses précieux conseils tout au long des manipulations, ainsi que pour sa disponibilité.*

*J'adresse mes sincères remerciements à monsieur **Moussa Hamza** pour son aide précieuse, ses conseils avisés et son soutien tout au long de ce travail.*

*J'exprime ma profonde gratitude à **Barbara Kusznierevicz** et **Marika Mróz** pour leur précieuse aide dans la réalisation des analyses.*

*Je suis également reconnaissante à Madame **OUKIL Naima** de m'avoir honoré en acceptant de présider ce jury.*

*Je remercie également Madame **BOUGOFFA Khalida**, Monsieur **DAHMOUNE Farid** et Monsieur **KADRI Nabil** qui ont accepté d'examiner ce travail.*

Enfin J'exprime aussi ma reconnaissance à toutes l'équipe de l'université de Bouira.

Dédicaces

Je dédie de tout mon cœur ce travail :

*À mes très chers parents, **Yahia et Zohra**, vous êtes ma source inépuisable de force et d'inspiration. Votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux et votre foi en moi ont illuminé mon chemin, même dans les moments les plus difficiles. Vous avez toujours cru en moi, me permettant ainsi de réaliser ce rêve, et vous m'avez offert votre confiance lorsque moi-même je doutais. Votre soutien indéfectible, votre présence discrète mais précieuse dans ma vie, et tout ce que vous avez fait pour moi ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Quoi que vous en pensiez, sachez que si je suis arrivée là, c'est grâce à vous. Je vous dédie cette thèse avec tout mon amour et ma profonde gratitude.*

*À mon cher mari **Mohamed**, ton amour, ton soutien indéfectible et ta patience ont été ma plus grande force tout au long de ce parcours. Dans les moments de doute et de fatigue, tu as su être mon pilier, m'encourageant avec bienveillance et me rappelant pourquoi ce rêve en valait la peine. Cette réussite est aussi la tienne, et je te dédie cette thèse avec tout mon amour et ma gratitude infinie.*

*À mon petit ange **Iyad**,*

Tu es la plus belle lumière de ma vie, ma plus grande source de joie et de motivation. Chaque sourire, chaque éclat de rire et chaque instant passé à tes côtés ont été une source infinie de force et d'inspiration. Je te dédie cette thèse avec tout mon amour.

*À ma sœur **Siham**,*

Tu as toujours été une source de motivation et d'encouragement pour moi. Ton soutien indéfectible, tes paroles réconfortantes m'ont aidée à surmonter les moments difficiles et à persévérer jusqu'au bout. Je te dédie cette thèse avec tout

mon amour et ma profonde gratitude.

*À mon frère **Abdelmoumine**, Merci pour ton soutien et ta présence précieuse.*

Ton encouragement m'a toujours donné la force d'avancer.

*À mes adorables neveux **Arinas** et **Firas**,*

À la mémoire de ma chère grande mère,

Tu étais si fière de moi, et ton amour m'a toujours accompagné. Même si tu n'es plus là pour partager ce moment, je sais que tu veilles sur moi. Cette thèse, je te la dédie avec tout mon amour et une infinie gratitude pour tout ce que tu m'as apporté.

À toutes ma famille,

À Tout ce qui me sont chers...

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Présentation de *Hammada scoparia* Pomel 3

I.1. Description botanique.....3

I.2. Synonymes et nomenclature 4

I.3. Classification botanique..... 4

I.4. Propriétés pharmacologiques 4

I.4.1. Utilisation en médecine traditionnelle 4

I.4.2. Activités biologiques5

I.5. Composition chimique..... 6

II. Composés phénoliques..... 7

II.1. Classification des composés phénoliques..... 7

II.1.1. Acides phénoliques et leurs dérivés7

II.1.2. Flavonoïdes.....8

II.1.3. Tanins..... 9

II.2. Propriétés biologiques des polyphénols11

II.3. Bienfaits des polyphénols pour la santé.....12

III. Méthodes d'extraction..... 12

III.1. Extraction assistée par ultrasons 13

III.1.1. Définition des ultrasons.....	13
III.1.2. Principe de d'extraction par ultrasons.....	13
III.2. Extraction par macération	14
III.2.1. Principe de l'extraction par macération.....	14
IV. Plans d'expériences	15
IV.1. Introduction.....	15
IV.2. Définition des plans d'expériences.....	16
IV.3. Intérêt des plans d'expériences.....	16
IV.4. Types des plans d'expériences	16
IV.5. Box-Behnken (BBD)	17
IV.6. Etapes de l'optimisation.....	18

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	19
II. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques.....	19
II.1. Etude préliminaire.....	19
II.1.1. Effet de la nature et de la concentration du solvant d'extraction	19
II.1.2. Effet de la température d'extraction par macération	20
II.1.3. Effet de la vitesse d'extraction par macération	20
II.1.4. Effet de la durée d'extraction.....	20
II.1.5. Effet du rapport solide/liquide	20
III. Conception expérimentale.....	20
IV. Dosage photochimique	22
IV.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux.....	22
IV.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	22
V. Détermination des activités biologiques in vitro.....	23

V.1. Détermination de l'activité antioxydante	23
V.1.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH.....	23
V.1.2. Pouvoir réducteur ferrique.....	23
V.1.3. Activité de piégeage des radicaux ABTS	24
V.1.4. Réduction de l'activité du molybdate	25
VI. Détermination de l'activité antibactérienne	25
VI.1. Souches bactériennes utilisées.....	25
VI.2. Aromatogramme.....	26
VI.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	26
VII. Test de stabilité à l'oxydation d'une huile végétale	27
VIII. Caractérisation des extraits optimaux	28
VIII.1. Caractérisation par UHPLC MS/MS.....	28
VIII.2. Analyse des groupes fonctionnels par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	29
VIII. Analyse statistique	29

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques	30
I.1 Extraction assistée par ultrasons	30
I.1.1. Etude préliminaire	30
I.1.1.1. Effet de la nature du solvant.....	31
I.1.1.2. Effet de la concentration du solvant	31
I.1.1.3. Effet de la température.....	32
I.1.1.4. Effet de la durée.....	32
I.1.1.5. Effet du ratio solide/liquide.....	33
I.1.2. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse	34

I.1.2.1. Estimation du paramètre du model	36
I.1.2.2. Effet des facteurs	36
I.1.2.3. Validation du model	39
I.1.2.3. Conditions optimales	40
I.1.2.4. Analyse des surfaces de réponse	41
I.2. Extraction par macération	44
I.2.1. Etude préliminaire	45
I.2.1.1. Effet de la nature du solvant	45
I.2.1.2. Effet de la concentration du solvant	45
I.2.1.3. Effet du temps d'extraction	46
I.2.1.4. Effet du Ratio solide/liquide	46
I.2.1.5. Effet de la vitesse	47
I.2.2. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse	48
I.2.2.1. Estimation du paramètre du model	50
2.2.2. Effet des facteurs	50
I.2.2.3. Validation du model	51
I.2.2.4. Conditions optimales	52
I.2.2.5. Analyse de surface	54
II. Activité biologiques des extraits optimums	56
II.1. Activité antioxydante	56
II.2. Activité antibactérienne	59
II.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	61
II.3. Test de stabilité à l'oxydation sur huile végétale	62
III. Caractérisation des composés phénoliques des extraits optimisés de <i>H. scoparia</i>	67
III.1. UHPLC MS/MS	67

III.2. Analyse FTIR	74
Conclusion et perspectives.....	76
Références bibliographiques	78
Annexe.	

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AVC : Accident vasculaire cérébrale

BBD : Box benhken design

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

ENSA: Ecole Nationale supérieure Agronomique d'Alger

FTIR: Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier

UHPLC : Chromatographie liquide en tendance haute résolution

MSR: Méthodologie de surface de réponse

RMSE: Root mean square error

TCA : acide trichloracétique

UAE : Ultrasound-assisted extraction

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	<i>Hammada scoparia</i>	3
2	Structures de base des acides hydroxybenzoïque et des acides hydroxycinnamiques	8
3	Structures de base des acides phénoliques et des flavonoïdes	9
4	Structure des acides gallique (A) et ellagique (B) et d'un tanin hydrolysable (C)	10
5	Structure de flavan-3-ol (A), flavan-3,4-ol (B) et d'un tanin condensé (C)	10
6	Représentation schématique du phénomène de cavitation.	14
7	Schéma de la démarche associée à un plan d'expériences	16
8	Effet de la nature et de la concentration du solvant sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i> .	32
9	Effet de la température et du temps sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i> .	33
10	Effet du ratio solide /liquide sur la teneur en composés phénoliques	34
11	Profileur de prédiction de l'extrait de <i>H. scoparia</i> obtenu par	40
12	Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i> .	42
13	Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur la teneur en flavonoïdes de <i>H. scoparia</i> .	43
14	Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur l'activité antioxydante de <i>H.</i>	44
15	Effet de la nature et de la concentration du solvant d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i> .	46
16	Effet du temps et du ratio solide/liquide d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i>	47
17	Effet de la vitesse d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de <i>H. scoparia</i> .	48

18	Profileur de prédiction de l'extrait de <i>H. scoparia</i> obtenu par macération.	53
19	Graphique de surface de réponse illustrant l'influence de la concentration d'éthanol et la vitesse sur l'extraction par macération	54
20	Graphiques illustrant l'effet des paramètres d'extraction par macération sur la teneur en flavonoïdes de <i>H. scoparia</i>	55
21	Graphiques illustrant l'effet des paramètres d'extraction par macération sur l'activité antioxydante DPPH	56
22	Activité de piégeage de l'ABTS des extraits de <i>H. scoparia</i> obtenus par macération et ultrasons.	57
23	Activités réductrices du fer et du molybdate des extraits de <i>H. scoparia</i> obtenus par macération et ultrasons	58
24	Valeur la période d'induction (IP) d'huile de tournesol	63
25	Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (0,01%).	64
26	Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (0,1%).	65
27	Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (1%).	66
28	Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (2%).	66
29	Chromatogramme d'ions totaux des extraits de <i>H.scoparia</i> L, UAE et ME détecté par LC-Q-Orbitrap en mode positif, avec chromatogramme enregistré par détecteur UVVis à 270 nm	68
30	Visualisation du contenu différentiel des composés bioactifs identifiés et non identifiés de ME et d'UAE avec le diagramme Volcano.	69
31	Spectres des extraits de <i>H. scoparia</i> obtenus par la spectroscopie FTIR.	71

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Composition chimique de <i>Hammada scoparia</i>	6
II	Bienfaits des polyphénols pour la santé.	12
III	Caractéristiques, fréquences et applications des ultrasons de	13
IV	Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons.	21
V	Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction par macération.	21
VI	Valeurs observées et prédites de polyphénols, flavonoïdes et activités anti oxydantes des extraits obtenus par ultrasons du plan Box-Behnken	35
VII	Résultats de régression et analyse de variance pour les résultats expérimentaux de l'extraction par ultrasons	38
VIII	Conditions optimales de l'extraction assistée par ultrasons	41
IX	Valeurs observées et prédites de polyphénols, flavonoïdes et activités anti oxydantes des extraits obtenus par macération du plan Box-Behnken	49
X	Résultats de régression et analyse de variance pour les résultats expérimentaux de l'extraction par macération	51
XI	Conditions optimale de macération	53
XII	Activité antimicrobienne des extraits de <i>H. scoparia</i> (mm) obtenu par par ultrason et macération	60

XIII	Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en mg/mL d'extrait de <i>H. scoparia</i> obtenu par EAU.	62
XIV	Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en mg/mL d'extrait de <i>H. scoparia</i> obtenu par macération	62
XV	Composition d'extrait phénolique de <i>H.scoparia</i> obtenue par UHPLC-HRMS	70

Introduction

Introduction

Depuis les premiers temps, confronté à un environnement souvent hostile, l'homme a su exploiter les ressources de la nature pour subvenir à ses besoins essentiels, notamment se nourrir et se soigner. Ces savoirs traditionnels, transmis de génération en génération, ont progressivement constitué la base de la pharmacopée, un vaste répertoire de remèdes naturels à l'origine de nombreux médicaments modernes.

L'Algérie, avec plus des deux tiers de son territoire recouvert par le Sahara, possède un écosystème unique qui mérite une attention particulière. Ce vaste désert, le plus chaud du monde, abrite dans sa partie nord, le Sahara septentrional, une végétation clairsemée mais adaptée aux conditions extrêmes de ce milieu (Fellous, 2003).

Malgré l'aridité du climat, le Sahara septentrional recèle une biodiversité remarquable, notamment une grande variété de plantes aromatiques et médicinales poussant à l'état sauvage. Ces espèces, connues pour leurs propriétés thérapeutiques, aromatiques et odorantes, revêtent un intérêt scientifique et économique considérable (Chehma *et al.*, 2008).

Ces dernières années, la recherche sur les composés bioactifs, en particulier les composés phénoliques issus des plantes, a considérablement progressé (Ghafoor *et al.*, 2009). Ces métabolites secondaires sont reconnus pour leur puissante activité antioxydante (Plyuta *et al.*, 2013) et leur rôle dans la prévention de diverses maladies (Gülçin *et al.*, 2019). Par ailleurs, ces composés peuvent interagir avec les bactéries via divers mécanismes, ce qui les rend particulièrement efficaces pour limiter la propagation des souches résistantes aux médicaments (Ecevit *et al.*, 2022). Ces caractéristiques en font des cibles d'intérêt majeur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et de produits naturels innovants.

Parmi les plantes potentiellement riches en composés bioactifs, *Hammada scoparia* suscite un intérêt croissant, bien que son potentiel demeure encore sous-exploité et mal documenté dans la littérature scientifique. En effet, malgré ses nombreux usages traditionnels, peu d'études ont approfondi l'identification et la valorisation de ses composés phénoliques, ainsi que leurs effets biologiques potentiels. Cela soulève une problématique centrale : comment optimiser l'extraction de ces

composés pour en révéler pleinement les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, et ainsi envisager leur valorisation dans divers domaines d'application ?

Hammada scoparia (Pomel) Iljin, appartenant à la famille des Amaranthaceae, est une espèce largement répandue dans les régions arides et semi-arides, notamment dans le Sahara septentrional algérien (Benaradj et al., 2013 ; Boucherit et al., 2018). Utilisée de longue date en médecine traditionnelle, cette plante est réputée pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est employée dans le traitement des piqûres de scorpion, de l'indigestion, des dermatoses, des dorsalgies et de certains troubles oculaires. De plus, son potentiel a été reconnu dans la prise en charge de pathologies telles que l'obésité, les hépatites, les inflammations, ainsi que certaines affections tumorales ou cancéreuses (Ould El Hadj et al., 2003 ; Chao et al., 2013).

Il est donc raisonnable de supposer que cette plante, en raison de son adaptation aux conditions extrêmes du Sahara et de ses usages empiriques variés, renferme des composés phénoliques bioactifs ayant une efficacité biologique mesurable, notamment en termes d'activité antioxydante et antibactérienne.

Ce travail est consacré à l'étude des potentialités biologiques des composés phénoliques de *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. Pour être valorisés, ces composés bioactifs doivent d'abord être extraits de leur matrice végétale d'origine, ce qui fait de l'extraction une étape essentielle et un sujet de recherche toujours d'actualité.

Dans ce contexte cette étude vise à optimiser l'extraction des composés phénoliques totaux et l'activité de piégeage du DPPH de *Hammada scoparia*, en utilisant deux techniques ; extraction par macération et extraction assistée par ultrasons.

L'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques de *H. scoparia* a été réalisée à l'aide de la méthodologie de surface de réponse (MSR) et du plan de Box-Behnken (BBD).

Les extraits obtenus avec les paramètres optimaux ont été utilisés pour évaluer leur activité antioxydante à travers divers tests, ainsi que leur activité antibactérienne contre plusieurs souches. Un test de stabilité à l'oxydation d'une huile végétale a également été mené pour examiner l'efficacité antioxydante des extraits de la plante étudiée.

Enfin, une caractérisation des extraits optimisés a été réalisée par chromatographie liquide en tandem haute résolution-spectrométrie de masse (UHPLC MS/MS) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

*Synthèse
bibliographique*

I. Présentation de *Hammada scoparia* Pomel

I.1. Description botanique

Hammada scoparia (pomel) Iljin (*Haloxylon scouparium*), est une plante médicinale de la famille des Chénopodiacées (Saidi *et al.*, 2015, Bouaziz *et al.*, 2016). Elle est originaire d'Afrique du Nord et elle prospère dans les régions arides de l'Atlas saharien à des altitudes de 800 à 1 400 m (Boucherit *et al.*, 2018).

Hammada scoparia est un petit arbuste halophyte à structure très ramifiée (Bouaziz *et al.*, 2016), glabre, gris-brun et ligneux, pouvant atteindre une hauteur maximale de 1 mètre (Boucherit *et al.*, 2017). Il présente des inflorescences de petite taille ainsi que des fruits munis d'ailes colorées, souvent roses ou rouges. Ses tiges fines noircissent après séchage (Drioichea *et al.*, 2019) (Figure 1). Cette plante se distingue par ses feuilles articulées et ses fleurs, solitaires ou groupées, situées à l'extrémité des branches. Elle possède un système racinaire vertical et latéral qui contribue à préserver le sol et à limiter l'érosion (Boucherit *et al.*, 2018).

Hammada scoparia pousse à l'état sauvage dans les habitats arides de la région méditerranéenne et du Proche-Orient, où elle s'adapte aux conditions climatiques difficiles (Taïr *et al.*, 2016).



Figure 1 : *Hammada scoparia* (Benine *et al.*, 2023).

I.2. Synonymes et nomenclature

Hammada scoparia est connue sous plusieurs synonymes taxonomiques. Ceux-ci incluent *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin, *Arthrophytum scoparium* (Pomel) Iljin, *Salsola articulata* ‘Cav.) et *Haloxylon articulatum* (Cav.) (Nounah *et al.*, 2019, Benine *et al.*, 2023). Il est connu sous le nom de « rimth » en Algérie (Taïr *et al.*, 2016).

I.3. Classification botanique

La classification botanique de *Hammada scoparia* est décrite par (Benine *et al.*, 2023) comme suit :

- Embranchement : Spermaphytes ;
- Sous embranchement : Angiospermes ;
- Classe : Eudicots ;
- Ordre : Caryophyllales ;
- Famille : Chénopodiacees ;
- Genre : *Hammada* ;
- Espèce : *Hammada scoparia*.

I.4. Propriétés pharmacologiques

I.4.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Hammada scoparia, une espèce de la famille des Chenopodiaceae, est largement utilisée dans la médecine traditionnelle en Afrique du Nord et au Moyen- Orient pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques (Benine *et al.*, 2023). Au Maroc, les parties aériennes réduites en poudre et préparées en infusion sont utilisées pour leurs effets antidiabétiques, antiseptiques et anti-inflammatoires (Drioichea *et al.*, 2019). En outre, cette plante est reconnue pour traiter diverses maladies, notamment l'hépatite, l'obésité et l'inflammation (Ezzeddine *et al.*, 2017).

Elle est également employée pour soigner les troubles oculaires, accélérer la cicatrisation des plaies et réduire les cicatrices grâce à son écorce en poudre (Drioichea *et al.*, 2019).

I.4.2. Activités biologiques

De nombreuses études ont mis en évidence les multiples activités biologiques de *Hammada scoparia*. Les extraits aqueux et méthanoliques de la plante ont montré des effets hépatoprotecteurs et antioxydants significatifs en réduisant le stress oxydatif et les lésions hépatiques causées par la toxicité de l'éthanol chez des modèles animaux (Bourogaa *et al.*, 2014, Bourogaa *et al.*, 2013).

Les travaux de (Bourogaa *et al.*, 2011) ont démontré que *Hammada scoparia* est efficace contre les cellules leucémiques, grâce aux flavonols triglycosides. En outre, des extraits éthanoliques de la plante ont révélé une capacité à inhiber la mélanogenèse *in vitro*, effet attribué à la présence de catéchol et de dérivés tétrahydro- isoquinoliniques (Chao *et al.*, 2013).

Hammada scoparia a également montré des propriétés molluscicides, en particulier contre *Galba truncatula*. L'alcaloïde N-méthylisosalsoline a été identifié comme la molécule responsable de cette activité (Mezghani-Jarraya *et al.*, 2009). En parallèle, des activités larvicides ont été rapportées par (Drioichea *et al.*, 2019).

D'autres études ont confirmé l'efficacité de cette plante dans le traitement des piqûres de scorpion, des infections cutanées telles que la gale, et des empoisonnements alimentaires. Les extraits de *Hammada scoparia* ont également démontré des propriétés antidiabétiques et anticoagulantes (Nounah *et al.*, 2019) ainsi que des activités antiplasmodiales et antiprolifératives (Nounah *et al.*, 2019, Bouaziz *et al.*, 2016).

Récemment, une fraction enrichie en flavonoïdes de *H. scoparia* a montré une protection contre les lésions hépatiques induites par l'ischémie/reperfusion, un problème fréquemment rencontré lors des chirurgies et transplantations hépatiques (Taïr *et al.*, 2016).

Dans leurs travaux de recherche (Bouaziz *et al.*, 2016) ont démontré que divers extraits alcooliques de l'espèce de *Hammada scoparia* tunisienne, possédaient une activité antibactérienne.

Ces multiples usages, tant traditionnels que scientifiques, soulignent l'importance de *Hammada scoparia* comme source prometteuse de composés bioactifs pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

I.5. Composition chimique

La composition chimique de *H. scoparia*, a été bien étudiée, les structures des principaux métabolites secondaires ont été identifiées. Les principales molécules isolées et identifiées sont montrées dans le tableau I.

Tableau I : Composition chimique de *Hammada scoparia*.

Composés chimiques	Références
Cargenine	Benkrief <i>et al.</i> 1(990).
N-méthylisosalsoline, Isosalsoline, Salsolidine, Isosalsolidine, Déhydrosalsolidine, Tryptamine, N-méthyltryptamine, Isorhamnétin 3-O-β-Dapiofuranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside, 2-Méthyl-1,2,3,4-tétrahydroβ-carboline.	El-Shazly <i>et al.</i> (2003)
Flavonol triglycosides: Isorhamnetin 3-O-β-D-xylopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-Galactopyran-oxide, Isorhametin 3-O-Dgalactopyranoside, Isorhametin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl -α-L-rhamnopyranosyl - β-D-alactopyranoside.	Drionchea <i>et al.</i> (2019)
Chrysoeriol, Catéchol, Acide coumarique, Acide cinnamique, Acide cafféoylquinique.	Chao <i>et al.</i> (2013)
Acide catéchique, Acide syringique, Acide vanillique, Acide benzoïque	Benkherara <i>et al.</i> (2021)

II. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, spécifiques au règne végétal, représentent un vaste ensemble de substances aux structures variées, témoignant de la capacité remarquable des plantes à produire une grande diversité de molécules naturelles (Macheix *et al.*, 2005).

La structure de base des composés phénoliques est un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) (Khoddami *et al.*, 2013).

Plus de 8000 structures phénoliques ont été identifiées, allant de molécules phénoliques simples dont les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques ; la voie shikimate et la voie polyacétate (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

De plus, la diversité structurale des composés phénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte : les flavonoïdes (Santos-Sánchez *et al.*, 2019, Martin *et al.*, 2002).

Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

II.1. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols constituent le groupe de molécules bioactives le plus nombreux et le plus largement distribué. Les principales classes de ces composés sont : les acides phénoliques et leurs dérivés, les flavonoïdes et les tanins (Naczki *et al.*, 2004).

II.1.1. Acides phénoliques et leurs dérivés

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques non flavonoïdes, caractérisés par un groupe carboxyle lié à un noyau benzénique. Ils dérivent principalement des acides benzoïque et cinnamiques (Durazzo *et al.*, 2019, Białecka-Florjańczyk *et al.*, 2018).

Les acides hydroxybenzoïques se distinguent par leurs propriétés antioxydantes, ce qui leur confère un potentiel protecteur contre les maladies chroniques. Des recherches épidémiologiques ont montré qu'une consommation accrue de ces acides est associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires et d'obésité (Durazzo *et al.*, 2019).

Les acides hydroxycinnamiques se distinguent par leurs fortes propriétés antioxydantes, susceptibles de réduire le risque de maladies cardiovasculaires.

Les acides férulique, caféique, p-coumarique et sinapique figurent parmi les acides hydroxycinnamiques les plus répandus (Sova *et al.*, 2020). Tandis que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont constitués d'acides gallique, d'acides vanillique, d'acide syringique et d'acide protocatéchique (Khoddami *et al.*, 2013).

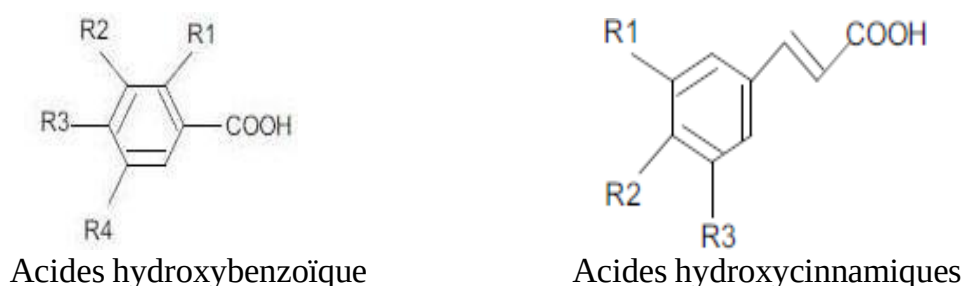


Figure 2: Structures de base des acides hydroxybenzoïque et des acides hydroxycinnamiques (Macheix *et al.*, 2006).

II.1.2. Flavonoïdes

Identifiés à partir de plus de 4 000 sources végétales, les flavonoïdes sont des composés réputés pour leur large éventail d'activités pharmacologiques, incluant des effets antioxydants, antibactériens, hépatoprotecteurs, anti-inflammatoires et antihyperlipidémiques (Abbas *et al.*, 2017, Durazzo *et al.*, 2019).

Les sous-groupes de flavonoïdes diffèrent principalement par la configuration de leur structure chimique (figure 3), notamment le degré d'hydroxylation, les liaisons entre les anneaux et la présence ou non de groupes fonctionnels spécifiques (Abbas *et al.*, 2017).

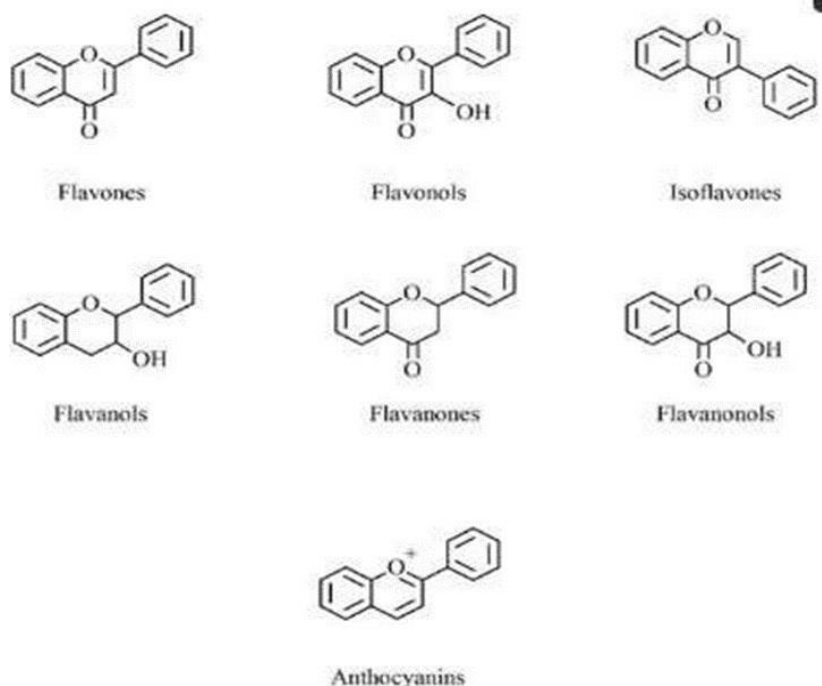


Figure 3: Structure des sous classes des flavonoïdes (Abbas *et al.*, 2017).

II.1.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques d'un poids moléculaire de 500 à 3500 Daltons (Lambraki *et al.*, 1994). La caractéristique la plus déterminante des tanins est leur capacité à former des complexes (par précipitation) avec des polymères naturels comme les protéines, les polysaccharides et les minéraux (Galvez *et al.*, 1997 ; Rubanza *et al.*, 2005).

Les tanins sont classés en deux groupes majeurs : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Silanikove *et al.*, 2001 ; Landau *et al.*, 2004). Les tanins hydrolysables sont des esters de glucose avec des acides galliques ou les acides éllagiques (Figure 4) ((Buzzini *et al.*, 2008 ; Derbel *et al.*, 2005). Tandis que les tanins condensés, ce sont des polymères de flavan-3-ol et de flavan-3,4-diol, ou un mélange des deux (Figure 5) (Labieniec *et al.*, 2003).

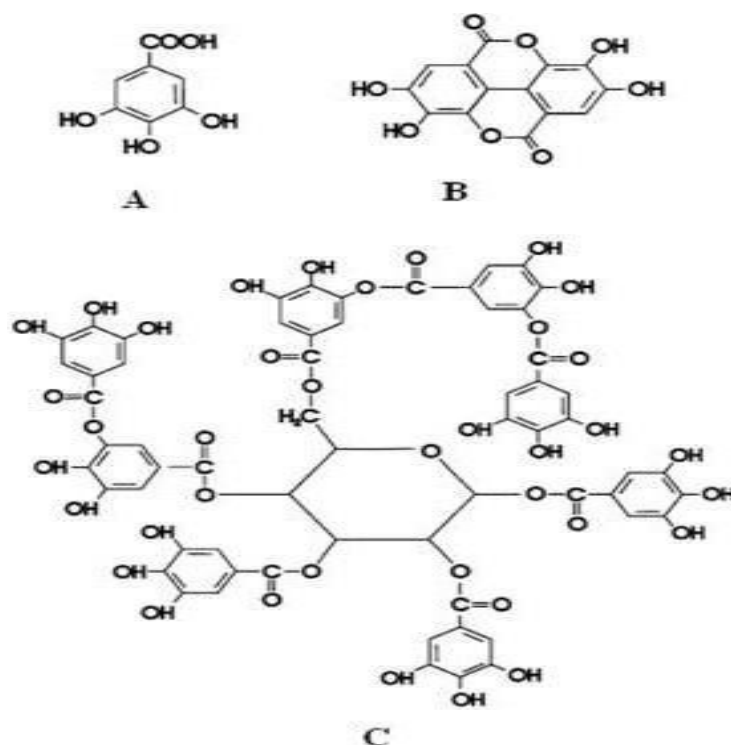


Figure 4: Structure des acides gallique (A) et ellagique (B) et d'un tanin hydrolysable (C) (Labieniec *et al.*, 2003).

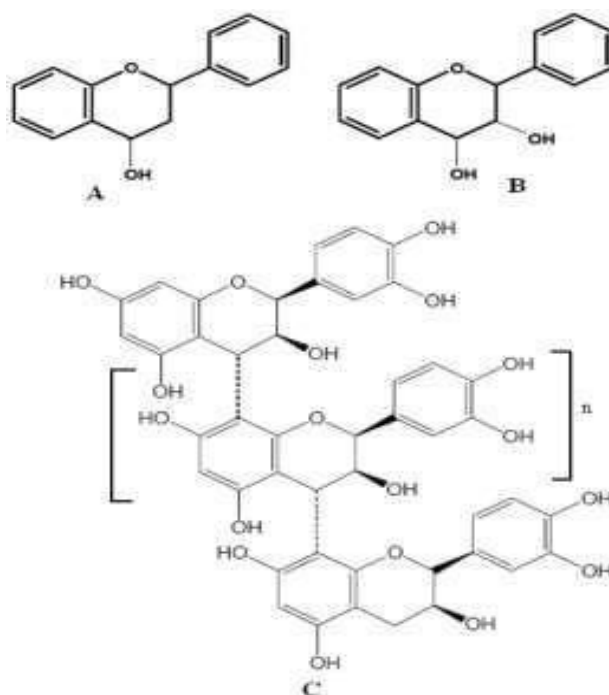


Figure 5: Structure de flavan-3-ol (A), flavan-3,4-ol (B) et d'un tanin condensé (C) (Bennick., 2002).

II.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols forment une vaste classe de molécules aux structures variées, ce qui leur confère une large gamme d'activités biologiques. Bien qu'ils partagent une caractéristique phénolique commune, leurs différences structurales influencent leurs propriétés physicochimiques (Abbas *et al.*, 2017 ; Rajbhar *et al.*, 2015).

Les polyphénols jouent un rôle essentiel dans la plante, intervenant dans sa croissance, sa fertilité et sa reproduction. Ils participent également aux réactions de défense contre divers stress biotiques et abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments végétaux, influençant leur couleur, astringence, arôme et amertume (Lattanzio *et al.*, 2006 ; Kuhnert., 2013).

Les polyphénols sont des composés végétaux omniprésents, connus pour leur large spectre d'activités biologiques (Han *et al.*, 2007 ; Hennebelle *et al.*, 2004), notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens et cardioprotecteurs (Hadidi *et al.*, 2024). Leur structure chimique variée influence directement leurs propriétés physicochimiques et leur efficacité biologique (Hennebelle *et al.*, 2004).

Leur rôle antioxydant est bien documenté, en particulier dans la prévention de la peroxydation lipidique, où ils s'insèrent spontanément dans les vésicules lipidiques. Initialement considérés comme de simples antioxydants, ils agissent également sur des mécanismes plus complexes, comme l'activation des systèmes de défense endogènes et l'interaction avec les processus de signalisation cellulaire (Fadel, 2012).

Des études suggèrent leur implication dans la prévention de diverses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète, l'inflammation et l'obésité. Grâce à ces propriétés, les polyphénols présentent un fort potentiel pour des applications biotechnologiques dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Nsemi, 2010).

II.3. Bienfaits des polyphénols pour la santé

Les polyphénols, ont suscité une attention considérable en raison de leurs bienfaits potentiels pour la santé. En tant qu'antioxydants naturels, ils aident l'organisme à se défendre contre le stress oxydatif et l'inflammation. Des études montrent qu'ils peuvent améliorer le taux de lipides, réguler la pression artérielle et renforcer la sensibilité à l'insuline, contribuant ainsi à réduire les risques de maladies cardiovasculaires, d'accident vasculaire cérébrale (AVC) et de diabète (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Menat, 2006).

Tableau II: Bienfaits des polyphénols pour la santé.

Polyphénol	bienfaits	Références
Acid caféique	Antitumoral, antidiabétique, anti-inflammatoire, antiviral.	Pavlíková (2022, Rajbhar <i>et al.</i> (2015).
Resvératrol	Antioxydant, anti-inflammatoire, activité antiprolifératif	Rajbhar <i>et al.</i> (2015)
Acide gallique	Anti-inflammatoires, anticancéreux et antimicrobiens	Hadidi <i>et al.</i> , (2024)
Quercetine	Anti-inflammatoires, antiprolifératifs, anticancérigènes et antidiabétiques	(Deepika <i>et al.</i> (2022)
Acide chlorogénique	Antioxydant, analgésique, antipyrétique	Rajbhar <i>et al.</i> (2015)

III. Méthodes d'extraction

Parmi les étapes essentielles de l'analyse et de l'identification des molécules bioactives, l'extraction occupe une place primordiale. Cette étape consiste à désorber les molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, déterminant ainsi la nature et la quantité des composés extraits, ce qui influence directement la réussite des étapes suivantes.

Généralement, l'extraction des produits naturels s'effectue par un procédé solide-liquide, dans lequel un solide, représentant la matrice végétale, est mis en contact avec un liquide servant de solvant d'extraction.

III.1. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale (Ebringerová *et al.*, 2010 ; Yusoff *et al.*, 2022).

III.1.1. Définition des ultrasons

Les ultrasons sont des ondes inaudibles avec des fréquences dans la gamme de 16KHz à 500MHz. Ils peuvent être transmis par n'importe quel milieu élastique comprenant l'eau, l'eau saturée en gaz et la boue (Melon, 1996).

En raison du large spectre de fréquences couvert par les ultrasons, on distingue généralement deux catégories principales ; ultrasons de puissance et ultrasons de diagnostic (Seidi *et al.*, 2012). Le tableau suivant résume les différentes caractéristiques, les fréquences et les applications des ultrasons de puissance et des ultrasons de diagnostic.

Tableau III: Caractéristiques, fréquences et applications des ultrasons de puissance et des ultrasons de diagnostic (Seidi *et al.*, 2012).

Type d'ultrasons	Caractéristiques	Gammes de fréquences	But
Ultrasons de puissance	Forte intensité et faible fréquence	16kHz à 1MHz	Modifier le milieu irradié par les ultrasons grâce à la cavitation, permettant d'obtenir des effets physico-chimique sur le milieu.
Ultrasons de diagnostic	Faible intensité et haute fréquence	1 à 10MHz	Observer l'impact du milieu sur l'onde ultrasonore sans modifier le milieu traversé pour en déduire ses caractéristiques.

III.1.2. Principe de d'extraction par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons repose sur la propagation des ondes ultrasonores dans un milieu liquide, où elles génèrent des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (Dias *et al.*, 2021). Ces cycles induisent des mouvements moléculaires et, lors des phases de raréfaction, la distance entre les molécules augmente. Lorsque cette distance dépasse un seuil propre au milieu, des bulles de cavitation se forment. Ces bulles croissent pendant les phases de raréfaction et diminuent lors des phases de compression. La répétition de ces cycles conduit à l'implosion des bulles, libérant une grande quantité d'énergie (Figure 6) (Kim *et al.*, 2011).

Cette énergie, associée aux puissantes forces de cisaillement générées par la cavitation, améliore le transfert de masse des composés extractibles (Ji *et al.*, 2006). L'implosion des bulles produit des micro-jets qui provoquent l'écaillage, la fragmentation et la destruction des particules solides, exposant de nouvelles surfaces et augmentant l'efficacité de l'extraction (Shotipruk *et al.*, 2001). De plus, cette énergie favorise la pénétration du solvant et peut détruire les membranes cellulaires, surtout à des intensités ultrasonores élevées, optimisant ainsi le processus d'extraction (Li *et al.*, 2004) .

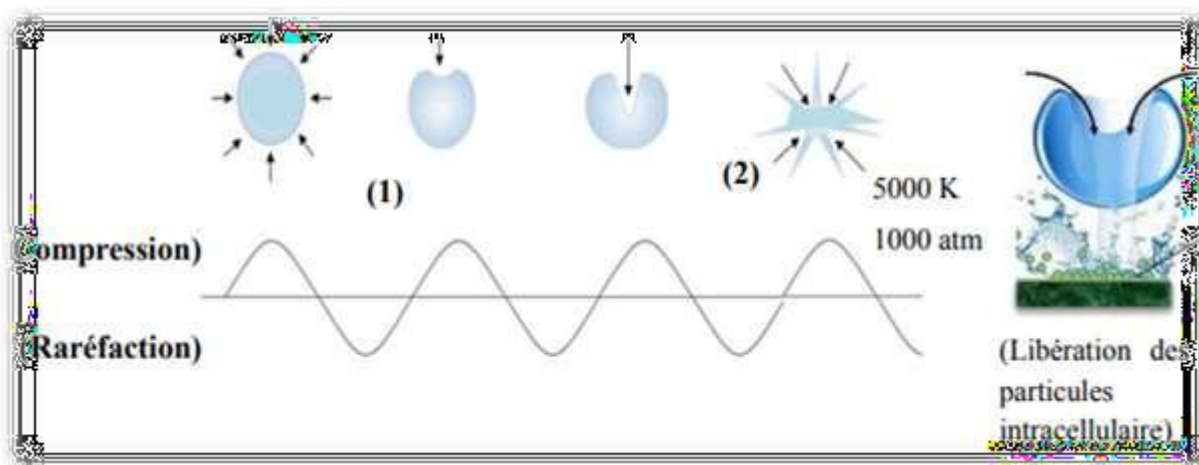


Figure 6 : Représentation schématique du phénomène de cavitation (Higuchi *et al.*, 2019).

(1): Formation des bulles de cavitation ; (2) : Implosion .

III.2. Extraction par macération

La macération est une technique simple d'extraction solide-liquide qui consiste à mettre en contact le matériel végétal avec un solvant, avec ou sans agitation, généralement à température ambiante. Bien que cette méthode soit souvent longue et donne un rendement parfois faible, elle reste privilégiée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur. Une macération sans agitation peut durer entre 4 et 10 jours, mais cette durée prolongée présente certains inconvénients, comme le risque de fermentation ou de contamination bactérienne, surtout lorsque l'eau est utilisée comme solvant. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des composés actifs. Pour minimiser ces risques, il est conseillé de réaliser la macération dans un récipient couvert, à l'abri de la lumière (Lefebvre *et al.*, 2021 ; Cravotto *et al.*, 2007).

III.2.1. Principe de l'extraction par macération

Le principe de la macération repose sur la mise en contact du matériel végétal avec un solvant d'extraction approprié, à température ambiante ou élevée, pour une durée déterminée. Ce procédé exploite la solubilité des composés bioactifs dans le solvant. Il débute par la diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales, suivie de la solubilisation des composés bioactifs. Ces derniers migrent ensuite de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à atteindre un équilibre de partage de concentration. Cette technique est influencée par plusieurs facteurs, notamment la nature du matériel végétal, la nature et la concentration du solvant, ainsi que la durée d'extraction (Handa, 2008).

IV. Plans d'expériences

IV.1. Introduction

Les expériences modernes de fabrication et de laboratoire sont devenues de plus en plus complexes, impliquant un grand nombre de variables difficiles à maîtriser intuitivement. Pour comprendre et modéliser ces phénomènes, la réalisation d'expériences est essentielle (Belaubre, 2014). Cependant, sans une méthodologie rigoureuse, ces essais peuvent entraîner des difficultés telles que des modèles difficiles à ajuster, des résultats incohérents ou des conclusions peu fiables. Dans ce contexte, la méthode des plans d'expérience se révèle être un outil incontournable pour optimiser les

démarches expérimentales et garantir des résultats fiables et pertinents (Tinsson, 2010).

IV.2. Définition des plans d'expériences

Un plan expérimental est une approche structurée utilisée pour organiser des tests afin d'obtenir des résultats fiables de manière efficace et rentable. Un cadre expérimental bien conçu simplifie l'analyse statistique et l'interprétation des données (Goupy, 2006). La méthodologie du plan expérimental est fondée sur l'idée qu'une expérience correctement organisée aboutira souvent à une analyse statistique et à une interprétation des résultats relativement simples (Linder, 2005).

En règle générale, une conception expérimentale nécessite l'évaluation et la démonstration de l'interaction entre deux types de variables : le facteur et la réponse.

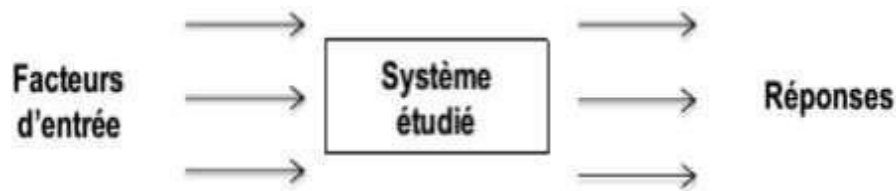


Figure 7: Schéma de la démarche associée à un plan d'expériences (Goupy, 2006).

IV.3. Intérêt des plans d'expériences

Les plans d'expérience jouent un rôle essentiel dans l'optimisation des essais expérimentaux en permettant d'obtenir des résultats fiables tout en minimisant le nombre d'expérimentations nécessaires (Goupy, 1999), ce qui met en évidence l'importance de l'expérimentation pour acquérir des connaissances. Cependant, la réalisation d'expériences peut être coûteuse et chronophage. Il est donc crucial de maximiser l'efficacité des essais en extrayant les informations les plus pertinentes avec un minimum de ressources (Hoinard, 2009).

Les plans d'expérience répondent précisément à cette problématique en permettant de déterminer les facteurs et les interactions les plus influents sur un système étudié, évitant ainsi des tests inutiles et favorisant une analyse rigoureuse des résultats. Cette approche facilite également la modélisation des relations de cause à effet entre les facteurs étudiés et la réponse mesurée, améliorant ainsi la compréhension et le contrôle des phénomènes expérimentaux (Linder, 2005).

IV.4. Types des plans d'expériences

Actuellement, un grand nombre de plans variés est disponible. Chacun d'eux, grâce à ses caractéristiques, permet de traiter des problèmes spécifiques. Toutefois, il est possible de classer les plans d'expériences en deux grandes catégories (Hanna, 2010).

Les plans destinés à analyser les effets des paramètres, facilitant l'évaluation et la comparaison de leur impact ;

- Les plans élaborés pour optimiser les paramètres, en modifiant leurs valeurs dans le but d'atteindre un optimum.

IV.5. Box-Behnken (BBD)

Le modèle Box-Behnken (BBD) est un modèle expérimental multivarié utilisé pour optimiser les processus et estimer les besoins avec moins de combinaisons de traitement (De Leon *et al.*, 2010). Le modèle Box-Behnken est particulièrement utile pour modéliser les surfaces de réponse du second ordre, offrant une économie de conception et une variance de prédiction précise (Box et Wilson, 1992). L'efficacité de la conception dans la génération de surfaces de réponse permet aux chercheurs de prédire les niveaux optimaux de variables indépendantes et leurs effets sur les variables dépendantes, ce qui en fait un outil précieux pour l'optimisation des processus dans divers domaines (Ham et Jeswiet, 2007).

IV.6. Etapes de l'optimisation

Le processus d'optimisation par plans d'expérience s'articule autour de quatre étapes fondamentales :

- La phase de planification comprend :
 - L'identification de problème ;
 - La sélection des réponses et la sélection des paramètres.
- La conception de plans :
 - Le choix du type du plan (plans de criblage et plans d'optimisation) (Narendran *et al.*, 2019).

- Application du plan :
 - La réalisation des expériences planifiées
 - L'obtention des résultats.
- La phase d'analyse :
 - La validation et de l'interprétation des résultats (Pratama et Supijo, 2020).

Matériel et méthode

I. Matériel végétal

La récolte de la plante *Haloxylon scoparium* a été effectuée durant le mois de mars de l'année 2021, dans la région de Oued Souf (wilaya d'El Oued). Après la récolte, l'échantillon a été séché à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, en utilisant une étuve ventilée. La poudre séchée a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisée. La poudre dont la granulométrie est inférieure à 200µm a été conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière et d'humidité dans un flacon en verre.

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude a été identifié et authentifié par l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger (ENSA).

II. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

II.1. Etude préliminaire

Dans ce travail, une étude préliminaire a été réalisée pour déterminer les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques de *Haloxylon scoparium*.

L'extraction a été réalisée en testant l'effet de la nature et de la concentration du solvant, la température, la vitesse de la macération, la durée d'extraction, et le rapport solide/liquide, tout en appliquant deux techniques d'extraction, à savoir ; extraction par macération et extraction assistée par ultrasons.

II.1.1. Effet de la nature et de la concentration du solvant d'extraction

Afin d'étudier l'effet de la nature du solvant d'extraction, l'éthanol 50%, l'acétone 50% et l'eau distillée ont été sélectionnés pour l'extraction en utilisant un rapport solide/liquide de 1/20 (g/mL) pour les deux techniques d'extractions appliquées.

L'extraction par ultrason a été réalisée en fixant la durée d'extraction à 10 min et la température à 40°C. Tandis que pour l'extraction par macération, l'extraction a été réalisée à température ambiante en fixant la durée d'extraction à 30 min et la vitesse de macération à 200 rpm.

Le solvant qui a permis d'extraire les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux a été sélectionné et utilisé à des concentrations de 30, 50 ,70 et 90 % (v/v) pour étudier l'effet de la concentration du solvant.

II.1.2. Effet de la température d'extraction par macération

L'effet de la température sur la teneur en composés phénoliques a été étudié uniquement pour la technique d'extraction assistée par ultrasons.

Afin de déterminer l'impact de la température, l'extraction a été réalisée pendant 10 min à des températures de 20, 30, 40, 50 et 60°C, en fixant un rapport d'extraction solide/ liquide à 1/20 (g/mL) et en utilisant une concentration du solvant de 50%.

II.1.3. Effet de la vitesse d'extraction par macération

L'effet de la vitesse de la macération a été évalué en testant les vitesses suivantes 200, 400, 600, 800 et 1000 rpm, et en utilisant une concentration du solvant de 50% et un rapport solide/liquide de 1/20 (g/mL). La vitesse qui a donné les valeurs les plus élevées en composés phénoliques a été sélectionnée pour étudier l'effet de la durée d'extraction et du rapport solide/liquide.

II.1.4. Effet de la durée d'extraction

L'impact de la durée d'extraction sur la teneur en composés phénoliques de *Haloxylon scouparium* a été déterminé en réalisant des extractions par macération pendant : 30min, 1h, 2h et 3h, et par ultrasons pendant 5min, 10min, 15min, 20min, 25min et 30min.

II.1.5. Effet du rapport solide/liquide

Pour les deux techniques d'extraction étudiée, l'évaluation de l'effet du ratio solide/liquide a été réalisée en fixant la masse de la poudre à 1mg et en variant le volume du solvant. L'extraction a été effectuée en testant des volumes de 10 ,20, 30, 40, 50 et 60 mL et en appliquant les paramètres d'extraction qui ont permis d'extraire le maximum de composés phénoliques.

III. Conception expérimentale

L'optimisation de la méthode d'extraction a été réalisée en employant le plan de Box-Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes :X1, X2, X3 et X4.

Pour l'extraction par macération les variables indépendantes étudiées sont : X1 : Concentration d'éthanol (%) ; X2: Temps (min) ; X3: Rapport solvant/solide (mL/g);

X4: Vitesse (rpm). Concernant l'extraction assistée par ultrasons, la variable indépendante X4 est représentée par la température (°C).

Ces variables indépendantes ont été étudiées de manière à optimiser les trois réponses suivantes : la teneur en composés phénoliques (TCP), la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante évaluée par le test d'inhibition du radical DPPH.

L'étude préliminaire effectuée, a permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans les tableaux (IV) et (V).

Tableau IV : Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction assistée par ultrasons.

Les variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
X ₁ : Ethanol (%)	30	50	70
X ₂ : Temps (min)	10	20	30
X ₃ : Ratio liquide/solide/ (mL/g)	30	45	60
X ₄ : Température (°C)	20	40	60

Tableau V: Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant sur l'extraction par macération.

Les variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
X ₁ : Ethanol (%)	30	60	90
X ₂ : Temps min	30	105	180
X ₃ : Ratio liquide/solide/ (mL/g)	30	45	60
X ₄ : Vitesse (rpm)	200	500	800

Le modèle polynomial généralisé du second ordre utilisé pour exprimer les réponses étudiées en fonction des variables indépendantes a été donné par l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k B_i x_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k B_{ij} x_i x_j + e.$$

Y : la variable de réponse (TPC ,TFC,DPPH), x_i et x_j représentent les variables indépendantes, β_0 , β_i , β_{ii} et β_{ij} sont respectivement les coefficients de régression des termes linéaires, d'interaction et quadratiques ; e : l'erreur.

IV. Dosage phytochimique

IV.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

- **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Blouin *et al.*, 1972).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques de *Haloxylon scouparium* a été évaluée selon la méthode décrite par (George *et al.*, 2005).

Un volume de 625 μ L du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 125 μ L d'extrait. Après 2 min d'incubation à l'obscurité, 500 μ L de la solution du carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7.5%) sont ajoutés. Après 15 minutes d'incubation à 50°C au bain Marie, l'absorbance a été mesurée à 760 nm. La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en milligrammes équivalent acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche, est déterminée en se référant à la droite d'étalonnage (Annexe I).

IV.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de former avec le groupement (CO) un complexe jaunâtre en présence de chlorure d'Aluminium (Ribereau-Gayon, 1968).

- **Mode opératoire**

La teneur flavonoïdes de *H. scoparia* est déterminée selon la méthode décrite par (Serra Bonvehí *et al.*, 2001). Un volume de 1mL de la solution de chlorure d'aluminium (2%) est additionné à 1mL d'extrait. Après 10 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent quercitrine (EQ) par gramme de matière sèche, à partir de la droite d'étalonnage (Annexe II).

V. Détermination des activités biologiques *in vitro*

V.1. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de *Hammada scoparia* a été déterminée en utilisant 4 tests différents à savoir :

V.1.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

- **Principe**

Un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH $\cdot$ (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) de coloration violette (forme oxydée) pour le réduire en DPPH-H (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine) de coloration jaune-verte (Molyneux, 2004).

- **Mode opératoire**

L'activité antiradicalaire du DPPH a été déterminée selon la méthode de (Dudonne *et al.*, 2009). Une aliquote de 50 μ L de l'extrait a été ajoutée à 1,5 mL de la solution méthanolique de DPPH (60 μ M). Après 20 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été enregistrée à 515 nm. L'activité de piégeage des radicaux DPPH $\cdot$ a été exprimée en milligrammes équivalent acide ascorbique (EAA) par gramme de poids sec (Annexe III).

V.1.2. Pouvoir réducteur ferrique

- **Principe**

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe $^{3+}$) du complexe ferricyanure-Fe $^{3+}$ en fer ferreux (Fe $^{2+}$), en présence d'antioxydants réducteurs (Bijoy Muktan *et al.*, 2008). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Gülçin *et al.*, 2003).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur ferrique a été déterminé par la méthode de (Oyaizu, 1986). Un volume de 1 mL de chaque extrait a été mélangé avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50°C pendant 20 min, 2,5 mL d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés au mélange.

Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, 2,5 mL du surnageant sont mélangés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide ascorbique (EAA) par gramme de matière sèche à partir d'une droite d'étalonnage (Annexe IV).

V.1.3. Activité de piégeage des radicaux ABTS

- **Principe**

La méthode qui détermine l'activité « scavenger » du radical $ABTS^{•+}$ est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) de coloration bleue verte en le transformant en $ABTS-H^+$ incolore, par un don d'hydrogène (Antolovich *et al.*, 2002). La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

- **Mode opératoire**

Le pouvoir du piégeage du radical $ABTS^{•+}$ est déterminé par la méthode de (Re *et al.*, 1999) avec une légère modification. La solution du radical $ABTS^{•+}$ a été préparée en mélangeant 2,45 mM d'ABTS avec 7 mM de persulfate de potassium. Après 16 h d'incubation la solution a été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Un volume de 50 μ L d'extrait a été ajouté à 1,5 mL de la solution d' $ABTS^{•+}$. L'absorbance a été lue à 734 nm après 6 min d'incubation dans l'obscurité.

Afin de déterminer l'IC₅₀, différentes concentrations d'extrait de *H. scoparia*, allant de 0,2 à 1,2 mg/mL, ont été testées.

Le pourcentage de l'activité de piégeage du radical ABTS^{•+} est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

A contrôle : Absorbance de la solution de l'ABTS ; A échantillon : Absorbance de l'échantillon mélangé avec la solution d'ABTS.

V.1.4. Réduction de l'activité du molybdate

- **Principe**

Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo(VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo(V) MoO_2^+ , en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) dans un milieu acide (Prieto *et al.*, 1999).

- **Mode opératoire**

L'extrait a été évalué par la méthode au phosphomolybdène de (Prieto *et al.*, 1999). Un volume de 0,3 mL d'extrait a été ajouté à 3 mL d'une solution préparée en mélangeant 0,6 M d'acide sulfurique, 28 Mm de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium. L'absorbance a été mesurée à 695 nm après 90 minutes d'incubation dans un bain-marie à 95°C. L'activité réductrice du molybdate est exprimée en milligrammes équivalents acide ascorbique (EAA) par gramme de matière sèche (Annexe V).

VI. Détermination de l'activité antibactérienne

VI.1. Souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne des extraits de *Hammada scoparia* a été testée sur des bactéries isolées, identifiées et caractérisées par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) de l'université de Bejaia ; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistante à la Méthicilline (SARM).

VI.2. Aromatogramme

L'approche de l'aromatogramme a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait optimal de *H. scoparia*. Cette technique est basée sur la diffusion sur milieu gélosé (Muller Hinton), en appliquant la méthode des puits (Zeidan et al., 2013). Dans des boîtes contenant du milieu Muller Hinton préalablementensemencé avec une suspension bactérienne standardisée par spectrophotométrie à 600 nm (absorbance ajustée entre 0,08 et 0,10, correspondant à 1×10^8 UFC/mL), et répartie à l'aide d'écouvillons, des puits de 6 mm de diamètre ont été formés. Ces puits ont ensuite été remplis de 50 µL de chaque extrait (50 mg/mL). Après deux heures de diffusion à 4°C, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif, tandis que la Tétracycline et la Ciproflaxine ont servi de témoins positifs. Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré, et les résultats sont exprimés en millimètres (mm).

VI.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus petite concentration de la substance antibactérienne pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée (Martini *et al.*, 1998). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée en utilisant la méthode des dilutions puis diffusion en milieu gélosé (Mueller Hinton). La concentration minimale inhibitrice (CMI) n'a été déterminée que pour les souches contre lesquelles l'extrait a montré une zone d'inhibition. L'extrait choisi (50 mg/ml) a subi une série de dilution allant de 1/2 à 1/64, donnant des concentrations de 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,13 mg/mL, 1,56 mg/mL et 0,78 mg/mL.

Après ensemencement des boites à l'aide d'écouvillons, des puits de 6 mm de diamètre sont remplis avec 50 µL de chaque dilution des extraits choisis. Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 18 à 24 h après une diffusion de deux heures à 4°C. Les résultats représentés par les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en millimètres (mm).

VII. Test de stabilité à l'oxydation d'une huile végétale

- **Principe**

Dans cette étude l'évaluation de la stabilité d'une huile végétale face aux processus d'oxydation, a été réalisée par la méthode d'Oxitest. Cette dernière soumet les échantillons à un stress oxydatif qui accélère les processus qui, dans des conditions normales, durent des semaines ou des mois grâce à l'effet combiné de la pression et de la température élevée.

En soumettant l'échantillon à une surpression établie d'oxygène pur (6 bar, degré 5,0) et à une température constante élevée (90 °C), l'instrument mesure le changement de pression absolue à l'intérieur de deux chambres indépendantes, en surveillant l'absorption d'oxygène par les composants réactifs présents dans l'échantillon et donne comme résultat la période d'induction (IP).

L'IP est le temps nécessaire pour atteindre le point de départ de l'oxydation, correspondant soit à un niveau de rancissement détectable, soit à un changement brutal de la vitesse d'oxydation. Plus la période d'induction est longue, plus la stabilité à l'oxydation dans le temps est élevée.

- **Mode opératoire**

Afin d'étudier l'efficacité des extraits de *H. scoparia* à augmenter la durée de la stabilité à l'oxydative d'une huile végétale, différentes concentrations ont été utilisés à savoirs :

- 0.01% : 0.0015g de poudre dans 15 g de l'huile ;
- 0.1% : 0.015g d'extrait dans 15 g de l'huile ;
- 1% : 0.15g de poudre dans 15 g de l'huile ;
- 2% : 0.3g de poudre dans 15 g de l'huile.

Les solutions des différentes concentrations formées (extrait plus huile) ont été analysées par OXITEST pour déterminer la stabilité oxydative. Chaque test d'oxydation accélérée a été opté en utilisant deux réacteurs différents, chaque réacteur est équipé de deux chambres d'oxydation, sous surpression d'oxygène pur (0,6 MPa, degré 5,0) et haute température constante (90°C).

La réponse OXITEST est la période d'induction (IP), exprimé en « temps de stabilité » avant l'oxydation des graisses et correspondant à une chute de pression d'O₂ due à la consommation d'oxygène par l'échantillon. La valeur IP est automatiquement calculée à partir de la courbe d'oxydation par méthode graphique (deux méthodes tangentes) en utilisant le programme L'ogiciel VELP Oxitest–Oxisoft inclus dans l'appareil (Caruso *et al.*, 2017).

VIII. Caractérisation des extraits optimaux

VIII.1. Caractérisation par UHPLC MS/MS

Pour évaluer les profils des composés bioactifs des extraits de la plante *H. scoparia* obtenus par extraction assistée aux ultrasons et par macération, la chromatographie liquide en tandem haute résolution-spectrométrie de masse (UHPLC- HRMS, Dionex Ultimate 3000, RS Autosampler) a été utilisée comme indiqué dans les travaux précédents de Kusznierevich *et al.* (2021).

La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne C18 (LUNA OMEGA 1,6 µm Polar C18, 100 Å, 150 × 2,1 mm). Dans ce cas, la phase mobile composée de 0,1 % (v/v) d'acide formique dans l'eau (A) et de 0,1 % (v/v) d'acide formique dans l'acétonitrile (B) a été pompée à un débit de 0,3 mL/min avec élution en gradient : 0 min, 15 % B ; 15 min, 40 % B ; 16 min, 100 % B ; 24 min, 100 % B et enfin, les conditions initiales ont été maintenues pendant 7 min comme étape de rééquilibrage. Le volume d'injection était de 1 µL pour les extraits obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrason et celle de macération.

L'UHPLC a été couplé à un spectromètre de masse (Dionex Ultimate 3000 RS-DAD et Q-Exactive™ Focus quadripolaire-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne)) avec une source d'ionisation par électrospray chauffée (HESI II).

Le logiciel Compound Discoverer (CD), version 2.1 (Thermo à Waltham, États-Unis) a été utilisé pour analyser les données UHPLC-HRMS traitées à des fins d'identification. Les constituants des extraits ont été déterminés en analysant leur masse précise et leurs modèles de fragmentation. L'identification de ces substances a été facilitée par une base de données spécialisée englobant diverses classes phytochimiques.

Cette base de données a été construite à l'aide d'informations recueillies dans la littérature sur *H. scoparia* et ensuite intégrée au logiciel CD. Un workflow spécifique intégré au logiciel CD a été utilisé pour le processus d'identification, impliquant le traitement des données brutes de répliques expérimentales de la plante et du solvant d'extraction (blanc).

VIII.2. Analyse des groupes fonctionnels par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les extraits ont été analysés à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Thermo Scientific NICOLT iS20 SMART iTx) avec une plage d'enregistrement variant entre 400 et 4000 cm^{-1} . La spectroscopie infrarouge (IR) est utilisée pour connaître la structure et la composition chimique des extraits de *Hammada scoparia*. En enregistrant les spectres d'absorption dans le domaine de 400 à 4000 cm^{-1} , il est possible d'identifier les liaisons entre les atomes et de déterminer les groupements fonctionnels qui composent les molécules (Scano, 2021).

VIII. Analyse statistique

La conception expérimentale a été réalisée à l'aide du logiciel JMP 13 (Statistical Analysis System Inc., SAS). Des triples de chaque expérience ont été réalisés. Afin de vérifier la signification du modèle et des coefficients de régression, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (one way) et à deux facteurs (two way) a été réalisée. La significativité des coefficients de régression a été déterminée par le test de Student. Les graphiques de l'activité antioxydante ont été créés à l'aide du programme Graph Pad prism 8.0.2.

Résultats et discussion

La présente étude a été consacrée à la détermination de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux et sur l'activité anti-radicalaire de *Hammada scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse (MSR) et du plan de Box-Behnken (BBD).

Les extraits obtenus avec les paramètres optimaux ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante en utilisant plusieurs tests, l'activité antibactérienne contre plusieurs souches, et la capacité des extraits de la plante étudiée à augmenter la stabilité à l'oxydation d'une huile végétale.

Enfin, une caractérisation des composés phénoliques des extraits optimisés a été réalisée par chromatographie liquide en tandem haute résolution-spectrométrie de masse (UHPLC MS/MS) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

I. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques de *H. scoparia* a été réalisée en utilisant deux techniques différentes : extraction assistée par ultrasons et extraction par macération.

I.1 Extraction assistée par ultrasons

Afin de déterminer les niveaux inférieurs et supérieurs des variables du plan expérimental utilisés pour sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des composés phénoliques pour chaque variable indépendante, cette étude a été précédée par une étude préliminaire.

I.1.1. Etude préliminaire

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer les variables qui donnent les meilleures teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et la plus importante activité "scavenger " vis-à-vis du DPPH.

Dans cette partie de l'étude, les quatre paramètres utilisés pour optimiser l'extraction des composés phénoliques totaux (CPT) de *H. scoparia* sont : la nature et la concentration du solvant (%), le temps (min), le rapport solide /liquide (mg/mL) et la température (°C).

I.1.1.1. Effet de la nature du solvant

Le choix du solvant joue un rôle clé dans l'extraction des composés phénoliques totaux. Selon les résultats présentés dans la figure N°8, l'extraction réalisée avec l'éthanol diluée à 50 % a permis d'obtenir la plus grande quantité en composés phénoliques, suivie par l'acétone diluée à 50 %, tandis que l'eau distillée a permis d'extraire la teneur la plus faible. Ces résultats montrent que les solvants organiques en solution aqueuse améliorent significativement l'extraction des polyphénols, comparé à l'utilisation d'eau seule.

Boeing *et al.* (2014) ainsi que Atik *et al.* (2011) ont démontré que les mélanges solvant-eau sont généralement plus efficaces que les solvants purs pour extraire les polyphénols à partir des matrices végétales. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la présente étude.

I.1.1.2. Effet de la concentration du solvant

L'étude de l'effet de la nature du solvant d'extraction a révélé que le meilleur solvant est l'éthanol dilué, ainsi, il a été choisi pour étudier l'effet de la concentration du solvant (Figure 8).

L'étude statistiques a révélé que les teneurs en composés phénoliques obtenus ont présentés des variations significatives selon la concentration testée ($p < 0,05$). Les teneurs les plus importantes ont été trouvées en utilisant l'éthanol dilué à 50% et à 70%, tandis que les plus faibles teneurs en été trouvées dans les extraits préparés avec l'éthanol dilué à 30% et à 90%. Ces observations indiquent que des concentrations d'éthanol trop basses ou trop élevées ne permettent pas une extraction optimale des composés phénoliques.

Dans cette étude des concentrations en éthanol de 30 %, 50 %, 70 %, et 90 % ont été testés. L'association de l'eau avec des solvants organiques permet de créer un milieu modérément polaire, favorisant ainsi l'extraction des composés phénoliques (Zemouri-Alioui *et al.*, 2018).

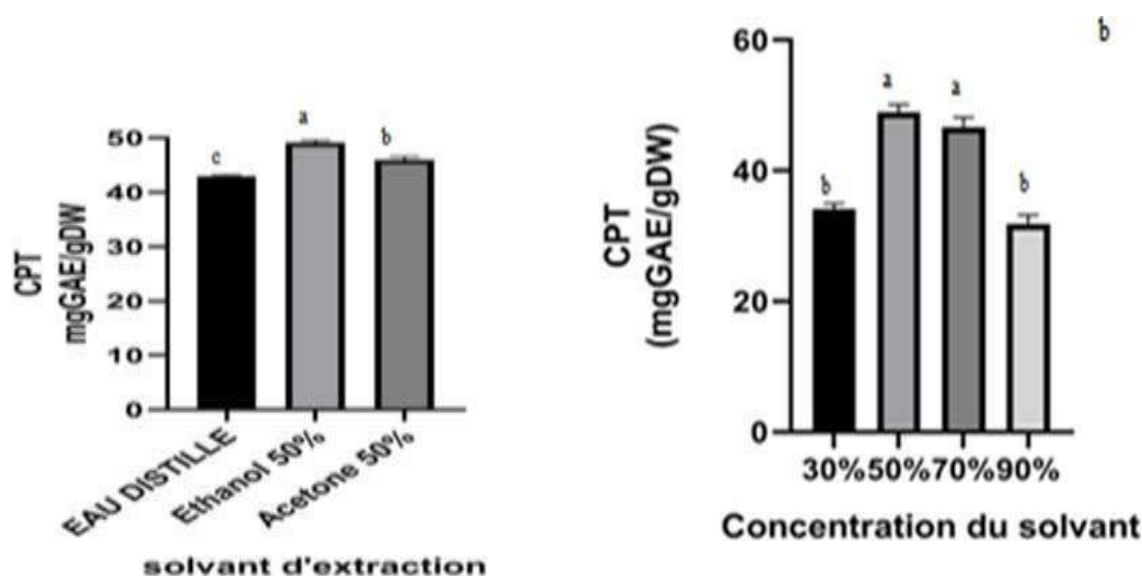


Figure 8: Effet de la nature et de la concentration du solvant sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

I.1.13. Effet de la température

L'effet de la température d'extraction sur la teneur en composés phénoliques est évalué dans la gamme de 20 à 60°C (Figure 9).

D'après les résultats obtenus, la meilleure teneur en composés phénoliques a été enregistrée à 20, 40 et 60°C.

L'augmentation de la température améliore la solubilisation des polyphénols et leur diffusion vers le solvant, optimisant ainsi l'extraction (Altemimi *et al.*, 2015 ; Khemakhem *et al.*, 2017). En revanche des températures élevées peuvent induire la dégradation thermique des polyphénols (Dzah *et al.*, 2020).

I.1.1.4. Effet de la durée

L'extraction des composés phénoliques totaux est significativement influencée par la durée d'extraction (Kuzma *et al.*, 2014). Ce qui a été confirmé par les résultats de la présente étude (Figure 9).

Les teneurs en composés phénoliques les plus élevées ont été extraites après 30 min d'extraction, tandis que les plus faibles ont été obtenus après 5 min d'extraction.

L'analyse de ces résultats a révélé que la teneur en composés phénoliques augmente avec le temps d'extraction, ce que suggère qu'une durée prolongée favorise la diffusion des polyphénols de la matrice solide vers le solvant, optimisant ainsi l'extraction. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Benmeziane *et al.*, 2014), qui ont montré que le rendement en composés phénoliques augmente avec la durée d'extraction, atteignant un pic entre 30 et 60 minutes, selon le matrice végétale source.

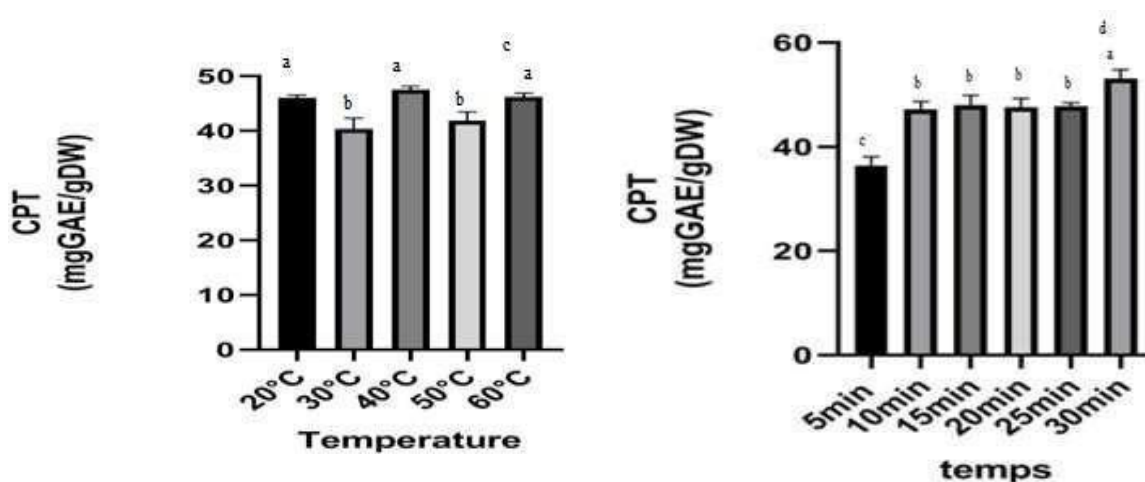


Figure 9: Effet de la température et du temps sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

I.1.1.5. Effet du ratio solide/liquide

L'analyse statistique de l'effet du ratio solide/liquide a montré qu'en augmentant le rapport solide/liquide de 1/10 à 1/60, les teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) augmentent significativement ($p < 0,05$), comme l'illustre la figure 10. Cette tendance est conforme aux principes du transfert de masse, où un gradient de concentration plus élevé entre la matrice solide et le solvant favorise l'extraction des composés bioactifs (Al-Farsi *et al.*, 2008). L'augmentation du volume de solvant disponible améliore ainsi la diffusion des polyphénols, conduisant à une meilleure récupération des CPT. Tandis que l'augmentation de la masse de la poudre entraîne une saturation du solvant avant l'épuisement complet du substrat, limitant ainsi l'efficacité de l'extraction, comme le suggèrent les résultats de (Bey *et al.*, 2013).

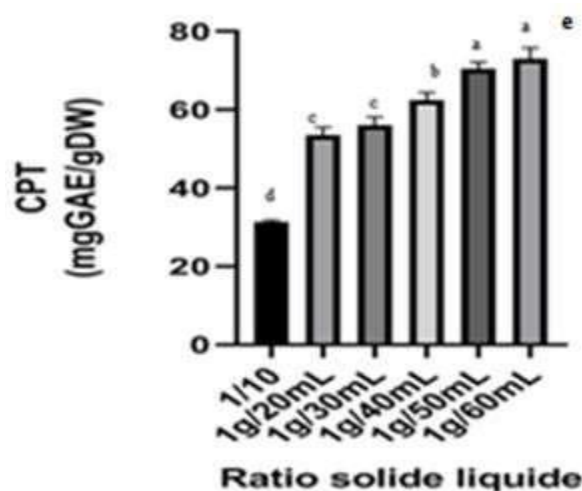


Figure 10 : Effet du ratio solide /liquide sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

I.1.2. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse

Cette étude a été consacrée à l'étude de l'effet des paramètres d'extraction assistée par ultrasons sur la teneur totale en composés phénoliques, la teneur totale en flavonoïdes et l'activité DPPH de *H. scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Cette méthodologie présente plus d'avantages que l'optimisation traditionnelle à paramètre unique et s'est avérée être une excellente alternative favorisant l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques avec un nombre réduit d'expériences, ce qui conduit à la réduction des coûts et du temps d'analyse (Böhmer-Maas *et al.*, 2020).

En se basant sur les observations de l'étude préliminaire, les gammes de chaque variable indépendante (X_1 : Concentration d'éthanol (%) ; X_2 : Temps (min) ; X_3 : Rapport solvant/solide (g/mL) ; X_4 température (°C)) influençant les réponses étudiées (teneur en polyphénols, teneur en flavonoïdes et le test d'inhibition du DPPH) ont été introduits dans le logiciel JMP10 en utilisant le plan Box-Behnken.

Les valeurs observées et prédites des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et de l'activité de l'activité anti-radicalaire (DPPH) obtenues avec les différentes conditions expérimentales, à partir des 27 essais proposés par le plan Box-Behnken, sont

illustrés dans le tableau VI.

Tableau VI: Valeurs observées et prédites de polyphénols, flavonoïdes et activités anti oxydantes des extraits obtenus par ultrasons du plan Box-Behnken.

N eaux varié bles					Valeurs observées			Valeurs prédites		
Run	x1	x2	x3	x4	TCP (mg EAG/g)	TFC (mg EQ/g)	DPPH (mg EAA/g)	TCP (mg EAG/g)	TFC (mg QE/g)	DPPH (mg AAE/g)
1	50	20	45	40	72.37±1.51	2.65±0.09	39.62±0.76	71.23	2.56	40.01
2	30	10	45	40	67.58±0.45	2.44±0.07	33.14±0.36	68.79	2.47	32.95
3	30	20	60	40	80.18±0.43	2.79±0.09	37.94±0.52	77.63	2.84	38.19
4	50	20	45	40	70.71±0.23	2.50±0.03	39.96±0.47	71.23	2.56	40.00
5	50	30	60	40	75.96±0.35	3.13±0.12	40.86±0.28	79.02	3.23	41.09
6	50	10	60	40	68.93±0.16	3.48±0.07	38.69±1.12	69.84	3.22	38.18
7	70	20	45	60	86.89±0.19	2.88±0.14	27.92±0.20	86.09	2.90	27.98
8	70	20	45	20	69.65±1.34	2.84±0.13	28.39±0.36	70.56	2.81	28.76
9	50	20	60	60	78.17±0.56	3.38±0.11	41.52±0.80	77.96	3.44	42.01
10	50	10	45	60	77.76±0.25	3.27±0.00	36.01±0.46	78.34	3.49	37.05
11	50	20	45	40	70.60±0.39	2.53±0.06	40.42±0.90	71.23	2.56	40.00
12	50	30	30	40	63.02±0.12	2.60±0.09	28.58±0.66	63.08	2.72	28.36
13	50	10	30	40	61.48±0.91	2.80±0.11	29.63±0.06	59.38	2.57	28.67
14	70	20	30	40	67.29±0.66	2.56±0.05	22.14±0.14	67.52	2.63	21.22
15	50	30	45	20	78.42±0.32	3.77±0.08	39.99±0.27	75.52	3.68	38.28
16	70	20	60	40	83.15±0.95	2.74±0.13	30.23±0.70	80.21	2.63	29.32
17	50	20	60	20	76.56±0.21	2.91±0.03	41.56±0.08	78.28	3.07	42.01
18	70	30	45	40	78.18±0.32	2.95±0.08	26.83±0.27	78.32	2.93	28.40
19	30	20	45	20	71.96±1.42	2.79±0.16	34.54±0.57	73.73	2.64	33.75
20	30	20	45	60	76.67±0.19	2.40±0.18	35.78±0.96	76.73	2.31	34.68
21	30	30	45	40	75.40±0.54	2.49±0.05	29.19±1.11	74.29	2.41	30.75
22	70	10	45	40	68.48±0.92	2.64±0.04	23.78±0.22	70.94	2.71	23.61
23	50	10	45	20	62.85±1.23	2.58±0.13	35.24±0.33	59.79	2.75	36.01
24	30	20	30	40	63.30±0.15	1.44±0.01	23.79±0.31	63.92	1.67	24.04
25	50	20	30	60	74.72±1.02	2.53±0.01	30.02±0.02	74.35	2.37	30.96
26	50	20	30	20	53.94±0.69	3.03±0.05	29.90±0.08	55.50	2.98	30.81
27	50	30	45	60	74.76±0.23	2.74±0.10	38.81±1.08	75.50	2.70	37.38

x1 :Concentration en éthanol (%); x2 : Temps (min); x3 : ratio liquide/solide (mL/g); x4:Temperature (°C); CPT: Composés phénoliques total (mg EAG/ g MS); TF : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g MS); DPPH: Activité inhibitrice du DPPH (mg EAA/g MS).

I.1.2.1. Estimation du paramètre du model

Les modèles mathématiques du plan Box-Behnken appropriés à la teneur en composés phénoliques totaux (CPT), la teneur en flavonoïdes (TF) et l'activité DPPH, relatives aux 27 essais sont respectivement représentés par les équations suivantes :

$$\text{TCP (mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{MS}}) = 71.23 + 1.54 x_1 + 3.22 x_2 + 6.60 x_3 + 4.63 x_4 + 3.13 x_1 x_4 - 4.64 x_2 x_4 - 4.80 x_3 x_4 + 3.17 x_1^2 + 2.37 x_4^2$$

$$\text{TF (mg}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{MS}}) = 2.55 + 0.18 x_1 + 0.29 x_3 - 0.29 x_1 x_3 - 0.43 x_2 x_4 + 0.24 x_3 x_4 - 0.20 x_1^2 + 0.28 x_2^2 + 0.31 x_4^2$$

$$\text{DPPH piégeage des radicaux libres (mg}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{MS}}) = 39.66 - 2.92 x_1 + 5.56 x_3 + 1.74 x_1 x_2 - 1.51 x_1 x_3 - 8.47 x_1^2 - 2.59 x_2^2 - 3.32 x_3^2$$

L'analyse des résultats de l'optimisation de l'extraction par la méthodologie de surface de réponse a révélé que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, ainsi que l'activité DPPH, présentaient des différences selon les conditions d'extraction testées. Les teneurs en composés phénoliques obtenues varient de 53,94 à 86,89 mg EAG/g MS. Celles des flavonoïdes sont comprises entre 1,44 et 3,77 mg EQ/g MS. Concernant l'activité DPPH, les valeurs obtenues sont comprises entre 22,14 et 41,56 mg EAA/g MS (Tableau VI).

I.1.2.2. Effet des facteurs

L'analyse des résultats ont montré que les paramètres testés ont présenté différents effets sur les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire (DPPH) (Tableau VII).

- **Effet linéaire**

Cette étude a révélé que tous les paramètres linéaires testés, la concentration du solvant, temps d'extraction, le ratio solide liquide et la température d'extraction, ont une influence significative sur la teneur en polyphénols, avec des probabilités de 0,0463 ; 0,0006 ; <0,0001 et <0,0001, respectivement.

Les seuls paramètres linéaires qui ont un effet significatif sur la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante, sont la concentration du solvant, avec $p=0,0041$ et $p<0,0001$, respectivement, et le ratio solide/liquide avec $p=0,0002$ et $p<0,0001$, respectivement.

- **Effet d'interaction**

Les effets d'interaction suivants : (x_1*x_4) , (x_2*x_4) et x_3*x_4 ont influencé significativement la teneur en polyphénols avec des probabilités de 0,0233 ; 0,0023 et 0,0018, respectivement.

Cependant que seule trois effets ont un effet significatif sur l'extraction des flavonoïdes, (x_1*x_3) , (x_2*x_4) (x_3*x_4) avec des probabilités de 0,0084 ; 0,0006 et 0,0218, respectivement.

Les deux interactions qui ont exercé un effet significatif sur l'activité antioxydante sont (x_1*x_2) , (x_1*x_3) avec des valeurs de probabilités de 0,017 et 0,0336, respectivement.

- **Effet quadratiques**

Les deux effets quadratiques qui ont un effet significatif sur la teneur en composés phénoliques sont (x_1*x_1) et (x_4*x_4) avec des probabilités de 0,0103 et 0,042, respectivement.

Concernant l'extraction des flavonoïdes, trois effets quadratiques à savoir (x_1*x_1) (x_2*x_2) (x_4*x_4) ont un effet significatif avec des valeurs de 0,0227; 0,0042 et 0,0021, respectivement.

Les effets quadratiques (x_1*x_1) et (x_3*x_3) avec un $p<0,0001$ et (x_2*x_2) avec un $p=0,0005$, ont un effet significatif sur l'activité antioxydante, tandis que l'effet (x_4*x_4) n'est pas significatif.

Tableau VII : Résultats de régression et analyse de variance pour les résultats expérimentaux de l'extraction par ultrasons.

	Source	TCP		TFC		DPPH	
		Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F
Paramètres estimés	X1	1.5465333	0,0463*	0.1888042	0.0041*	-2.92344	<.0001*
	X2	3.2213025	0,0006*	0.03926	0.4766	0.6489417	0.1005
	X3	6.5992142	<,0001*	0.2901958	0.0002*	5.5612433	<.0001*
	X4	4.63285	<,0001*	-0.06049	0.2797	0.0347583	0.9256
	X1 X2	0.4713	0,7027	0.068675	0.4724	1.749175	0.0170*
	X1 X3	-0.255625	0,8357	-0.291173	0.0084*	-1.515295	0.0336*
	X2 X3	1.3722325	0,2773	-0.036875	0.6973	0.806225	0.2260
	X1 X4	3.133225	0,0233*	0.1047	0.2801	-0.42895	0.5100
	X2X4	-4.642625	0,0023*	-0.43016	0.0006*	-0.483375	0.4589
	X3 X4	-4.7934	0,0018*	0.24375	0.0218*	-0.0403	0.9502
	X_1^2	3.1740029	0,0103*	-0.209327	0.0227*	-8.475332	<.0001*
	X_2^2	-1.314776	0,2319	0.2823446	0.0042*	-2.590384	0.0005*
	X_3^2	-2.081026	0,0695	0.0921233	0.2728	-3.326382	<.0001*
	X_4^2	2.3762029	0,0420*	0.3125696	0.0021*	-0.225759	0.6871
Résultats de la régression	R^2	0.950063		0.914878		0.979965	
	R_{Adj}^2	0.891803		0.815569		0.956592	
	RMSE	2.41136		0.185109		1.263332	
	C.V(%)	3.34		6.66		3.77	
	ANNOVA	<.0001*		0.0002*		<.0001*	
	Lack of fit	0.1343		0.1431		0.0813	

I.1.2.3. Validation du modèle

Les valeurs élevées de R-carré pour le modèle testé (0,95 et 0,81 ; 0,91 et 0,81 ; 0,97 et 0,95 pour R2 et R2 Adj. pour TCP, TF et DPPH, respectivement) indiquent une corrélation remarquable entre les valeurs trouvées dans la présente étude et celles prédites.

Dans un bon modèle statistique, R2 Adj. devrait être comparable à R2, ce qui est le cas des résultats de ce travail. Lorsque le coefficient de détermination R2 est égal ou supérieur à 80 %, le modèle est jugé bon (Fadil *et al.*, 2021). L'adéquation du modèle est déterminée essentiellement par le R-carré ajusté (R2 Adj.) (Zakaria *et al.*, 2021).

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes et l'activité antioxydante sont illustré dans le tableau VII. Les coefficients de variation (C.V%) obtenus de l'activité CPT, TF et DPPH étaient respectivement de 3,34 ; 6,66 et 3,77%. Si un coefficient de variation (C.V%) dépasse 10%, la valeur moyenne présente des variations significatives et le modèle de réponse développé n'est pas suffisamment adéquat (Dahmoune *et al.*, 2015). Par conséquent, la reproductibilité des modèles de la présente étude a été satisfaite par les résultats obtenus.

La forme du modèle a été examinée à l'aide d'un test d'inadéquation, qui a indiqué la capacité du modèle à prédire correctement sa variabilité. L'inadéquation du modèle de prédiction de la surface de réponse n'est pas significative avec une valeur p inférieure à 0,05, et le modèle est considéré comme adapté avec une valeur p supérieure à 0,05 (Kong *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, les valeurs de manque d'ajustement de la teneur en composés phénoliques, de la teneur en flavonoïdes et de l'activité de récupération du DPPH de *H. scoparia* sont respectivement de 0,1343 ; 0,1431 et 0,0813. La validité des modèles est réalisée en analysant le manque d'ajustement, de sorte que le modèle s'adapte précisément aux données réelles si une valeur p insignifiante est supérieure à 0,05 (Zakaria *et al.*, 2021). Tous les modèles polynomiaux quadratiques obtenus dans ce travail étaient précis et fiables pour prédire les réponses correspondantes.

I.1.2.3. Conditions optimales

Les extractions assistées par les ultrasons ont été réalisées dans les conditions optimales prédites par les modèles mathématiques de surface de réponse (MSR) pour chaque paramètre étudié, à savoir la teneur en composés phénoliques totaux (CPT), la teneur en flavonoïdes (TF) et l'activité antioxydante DPPH. Les résultats expérimentaux obtenus ainsi que les valeurs prédites par le modèle sont présentés dans la figure 11 et le tableau VIII.

La valeur optimale en composés phénoliques, en flavonoïdes et l'activité antiradicalaire (DPPH) est obtenue par les conditions suivantes : une concentration du solvant de 46,96%, une durée d'extraction de 30 min, un rapport S/L de 1g/60mL et une température d'extraction de 20°C.

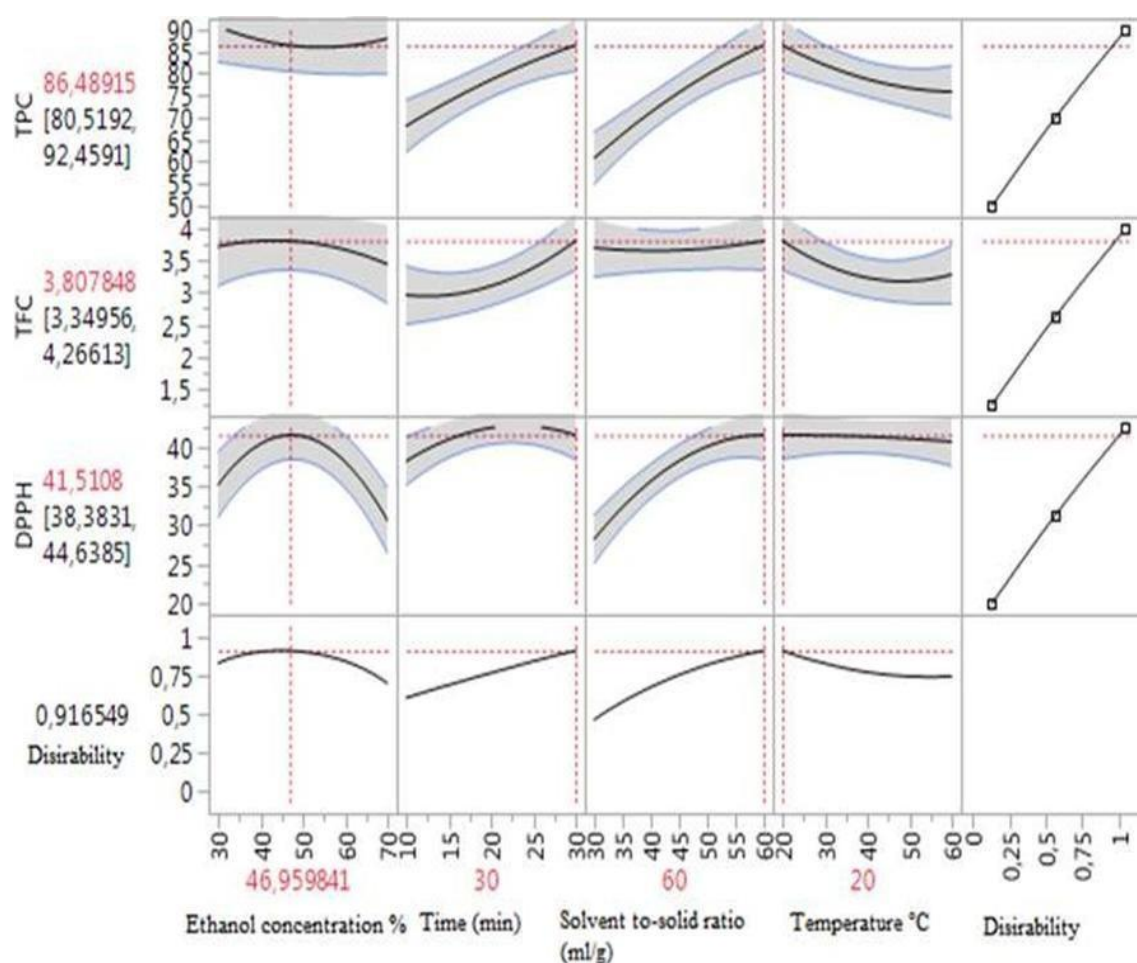


Figure 11: Profileur de prédiction de l'extract de *H. scoparia* obtenu par l'extraction assistée par ultrasons.

Tableau VIII : Conditions optimales de l'extraction assistée par ultrasons.

Facteurs	Conditions Optimal
Concentration d'éthanol (%)	46,96
Temps (min)	30
Ratio solide /liquide (g/mL)	60
Temperature (°C)	20
Résultats	
TCP (mg EAG/g MS)	81,39±0,81
TF (mg EQ/g MS)	3,48±0,15
DPPH (mg EAA/g MS)	42,44±0,39

I.1.2.4. Analyse des surfaces de réponse

Afin d'étudier les effets interactifs des variables indépendantes testées et leur interaction mutuelle sur la teneur en composés phénoliques, la teneur en flavonoïdes et l'activité DPPH, des profils de surface de réponse tridimensionnels de plusieurs modèles de régression non linéaire ont été représentés.

L'effet des effets d'interaction de la concentration en éthanol, du temps, du rapport liquide/solide et de la température d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totale de *H. scparia*, a été illustré dans la figure 12.

L'interaction entre la concentration en éthanol et la température a exercé un effet exponentiel sur la teneur en composés phénoliques totale (Figure 12(a)).

L'augmentation du temps d'extraction améliore le rendement en composés phénoliques à basse température, la valeur optimale (80 mg EAG/g) a été trouvée à 20°C après 30 min d'extraction (Figure 12(b)). Les substances phénoliques sont plus facilement extraites avec une période d'extraction plus longue (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation du temps d'extraction par ultrasons conduit à une plus grande pénétration du solvant, ce qui facilite la libération et la solubilité de différentes substances des matières premières, ce qui favorise l'extraction de quantités plus élevées de composés phénoliques (Hachani *et al.*, 2020).

Le rendement en composés phénoliques augmente avec l'augmentation de la température après un court temps d'extraction, une valeur d'approximation de 82 mg EAG/g a été trouvée à 60°C après 10 min. La température élevée conduit à une augmentation du taux d'extraction en favorisant le taux de transfert de masse en promettant la solubilité du soluté (Prasad *et al.*, 2012). Les résultats obtenus montrent que l'exposition à une température élevée pendant plus de 10 min a conduit à une réduction de la teneur totale en phénols, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces composés sont dégradables à haute température.

La figure 12(c) révèle que l'interaction entre la température et le rapport liquide/solide exerce un effet inversement proportionnel sur la teneur totale en composés phénoliques avec des valeurs approximatives de 80 mg EAG/g et 75 mg EAG/g, en utilisant un rapport de 60mL/mg à 20°C et 30mL/mg à 60°C, respectivement. La teneur totale en composés phénoliques augmente avec le rapport solvant/solide à basse température. La teneur en composés bioactifs augmente avec le volume de solvant d'extraction, car les composés phénoliques sont plus facilement solubles dans des volumes plus élevés que dans des volumes plus faibles de solvant d'extraction (Silva *et al.*, 2007). Le rapport liquide/solide élevé permet des phénomènes de transfert de masse élevés ((Al-Farsi *et al.*, 2008 ; Chaalal *et al.*, 2012), ce qui confirme les résultats obtenus.

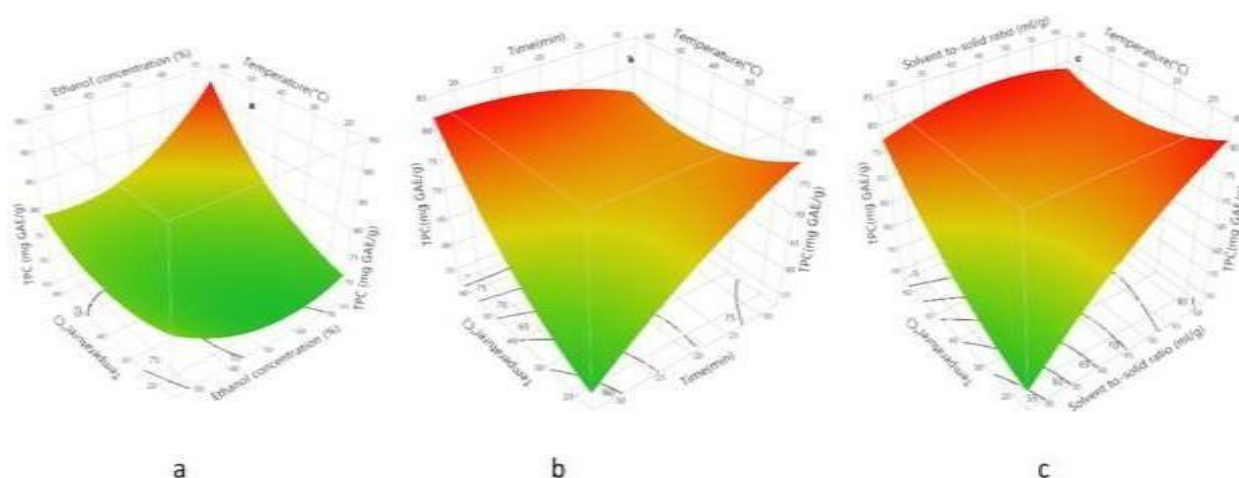


Figure 12 : Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*. (a)Température/Concentration du solvant ; (b)Température/Temps ; (c):Température/ Rapport liquide/solide.

Les effets des interactions entre la concentration d'éthanol et le rapport liquide/solide, entre le temps et la température et entre le rapport solide/solvant et la température sur teneur en flavonoïdes totaux de *H. scoparia* ont été représentés dans la figure 13.

La teneur maximale en flavonoïdes (Figure 13(a)) a été observée avec une concentration d'éthanol de 50 % et un rapport liquide/solide allant jusqu'à 1/60 mg/mL, avec une teneur approximative de 3 mg EQ/g.

Les résultats de la figure 13(b) montrent que la teneur en flavonoïdes augmente avec l'augmentation de la température pour un temps d'extraction court, par exemple après 10 min d'extraction à 60°C, une valeur de 4 mg EQ/g a été observée, cependant à basse température, l'augmentation du temps d'extraction améliore la teneur en flavonoïdes, par exemple, après 20 min d'extraction à 20°C, le rendement obtenu est de 4,5 mg EQ/g.

Les résultats de l'interaction entre le rapport liquide/solide et la concentration du solvant ont montré que la teneur en flavonoïdes augmente avec le rapport solide/solvant à des concentrations d'éthanol inférieures à 40 %, et avec la concentration d'éthanol à des faibles rapports solvant/solide (inférieurs à 30mL/mg) (Figure 13(c)).

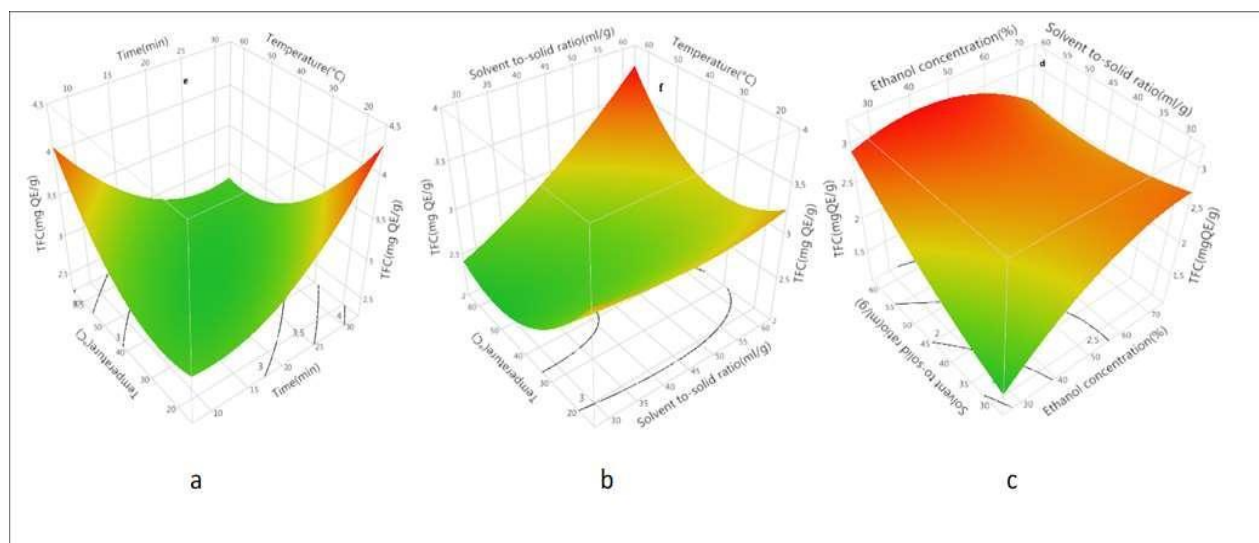


Figure 13 : Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur la teneur en flavonoïdes de *H. scoparia*.

(a)Température/Temps ; (b)Température/Concentration du solvant ; (c): Rapport liquide/solide/ Concentration du solvant .

La figure 14 montre les effets d'interaction de la concentration d'éthanol et du rapport solvant/solide, de la concentration de solvant et du rapport liquide/solide sur l'activité DPPH de *H. scoparia*. L'inhibition du DDPH augmente avec le rapport liquide/solide à des concentrations d'éthanol inférieures à 50 %. Ces résultats montrent que l'activité DPPH dépend significativement du rapport liquide/solide et de la concentration d'éthanol car leurs effets d'interaction linéaire et quadratique étaient hautement significatifs ($P < 0,0001^*$), comme le montre le tableau VII.

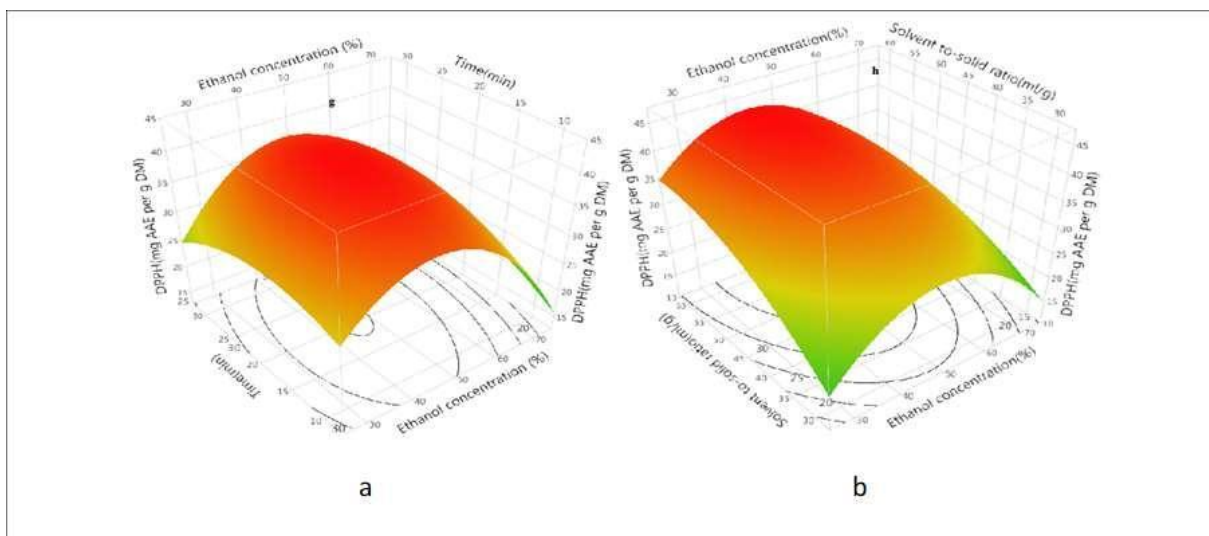


Figure 14 : Graphiques de surface de réponse illustrant l'influence des facteurs de l'extraction assistée par ultrasons sur l'activité antioxydante de *H. scoparia*.

(a) Concentration du solvant/rapport solvant/solide ; (b) : Concentration du solvant/rapport solide/liquide.

I.2. Extraction par macération

Cette partie de l'étude vise à optimiser plusieurs paramètres d'extraction des composés phénoliques totaux de *H. scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse.

La technique d'extraction utilisée est la macération et les paramètres testés sont : la concentration en éthanol, le temps, le ratio liquide/solide et la vitesse d'extraction.

I.2.1. Etude préliminaire

Dans le but de déterminer les variables qui donnent les meilleures teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et la plus importante activité "scavenger " vis-à-vis du DPPH, une étude préliminaire a été réalisée.

I.2.1.1. Effet de la nature du solvant

La figure 15(a) représente la teneur en composés phénoliques totaux (TCP) en fonction du solvant d'extraction utilisé.

Les résultats montrent que l'éthanol 50 % a donné les meilleurs rendements en composés phénoliques, suivi de l'acétone 50 %, tandis que l'eau distillée s'est révélée être le solvant le moins efficace. Ces résultats suggèrent que l'éthanol aqueux favorise une meilleure solubilisation des polyphénols, probablement en raison de son équilibre entre polarité et affinité pour ces composés. L'efficacité légèrement inférieure de l'acétone pourrait être due à une différence dans la nature des polyphénols extraits ou à une moindre compatibilité avec la matrice végétale. Ces observations sont en accord avec les travaux de (Spigno *et al.*, 2009), qui ont démontré que l'éthanol est le solvant adéquat pour l'extraction des composés phénoliques.

I.2.1.2. Effet de la concentration du solvant

La solubilité des polyphénols dépend de la polarité du solvant utilisé (Naczki *et al.*, 2004). Après avoir déterminé le meilleur type du solvant pour l'extraction, différentes concentrations de l'éthanol (30 %, 50 %, 70 % et 90 %, v/v) ont été testées afin de choisir la concentration la plus adaptée au solvant d'extraction. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 15(b).

La concentration en composés phénoliques totaux augmente avec l'augmentation de la concentration en éthanol de 30 jusqu'à 70% ; où elle atteint son maximum, puis diminue progressivement lorsque la concentration d'éthanol augmente de 70 à 90%.

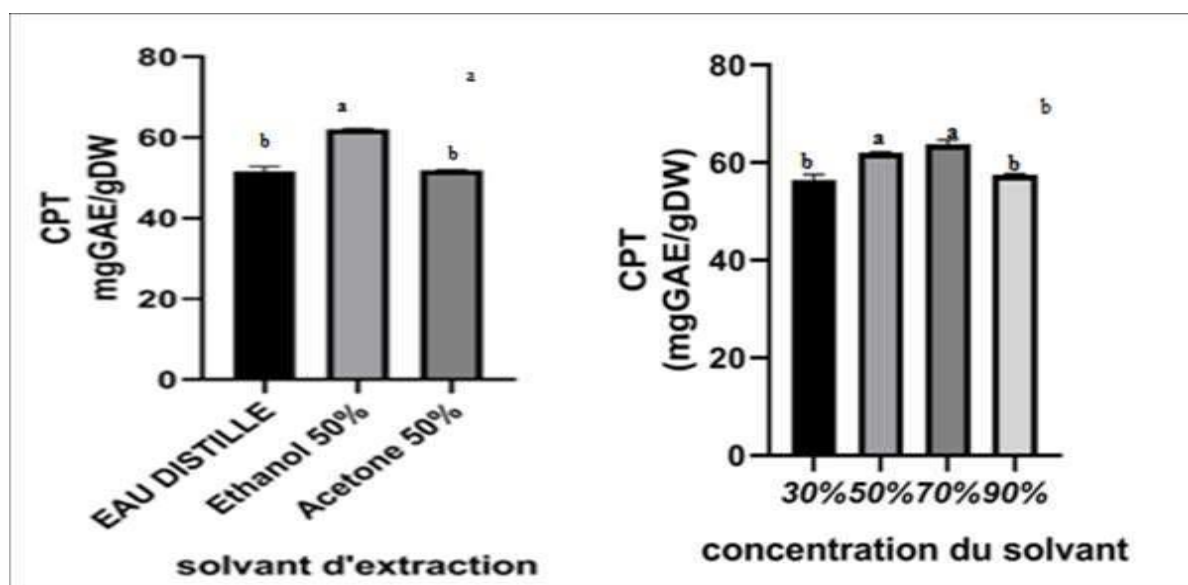


Figure 15 : Effet de la nature et de la concentration du solvant d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

I.2.1.3. Effet du temps d'extraction

La figure 16 représente l'évolution de la teneur en composés phénoliques totaux (TCP) en fonction du temps de macération (30, 60, 120 et 180 minutes).

La concentration en polyphénols augmente avec le temps d'extraction pour atteindre le pic maximum à 120 minutes, puis a présenté une diminution après 180 min. Selon les travaux de Santos-Buelga et *al.* (2012), un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction, en effet, il peut également favoriser l'oxydation des composés phénoliques.

I.2.1.4. Effet du Ratio solide/liquide

Les résultats de la figure 16 montrent que la variation du ratio solide/liquide a un effet sur le taux d'extraction des polyphénols totaux, ce qui a été confirmé par l'étude de Hossain et *al.* (2012).

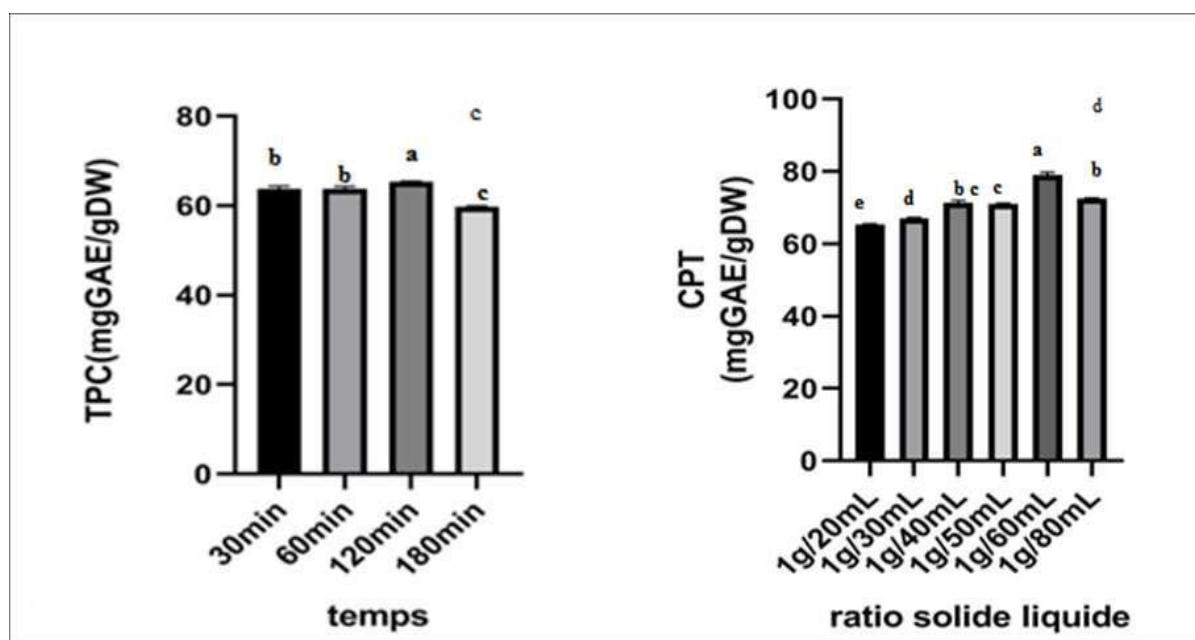


Figure 16 : Effet du temps et du ratio solide/liquide d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

Les teneurs en composés phénoliques augmentent avec le volume du solvant d'extraction. Dans cette étude, la meilleure teneur en composés phénoliques a été attribuée à un ratio de 1g/60mL, alors que la plus faible teneur est celle du ratio solide/liquide 1g/20mL.

I.2.1.5. Effet de la vitesse

Le figure 17 montre que la vitesse d'agitation influence significativement l'extraction des polyphénols.

La concentration en composés phénoliques augmente avec la vitesse d'extraction jusqu'à une vitesse de 600 rpm, atteignant un maximum, puis diminue à la vitesse 800 rpm, probablement en raison de la dégradation des composés ou d'une turbulence excessive. A une vitesse de 1000 rpm, une augmentation significative a été observée.

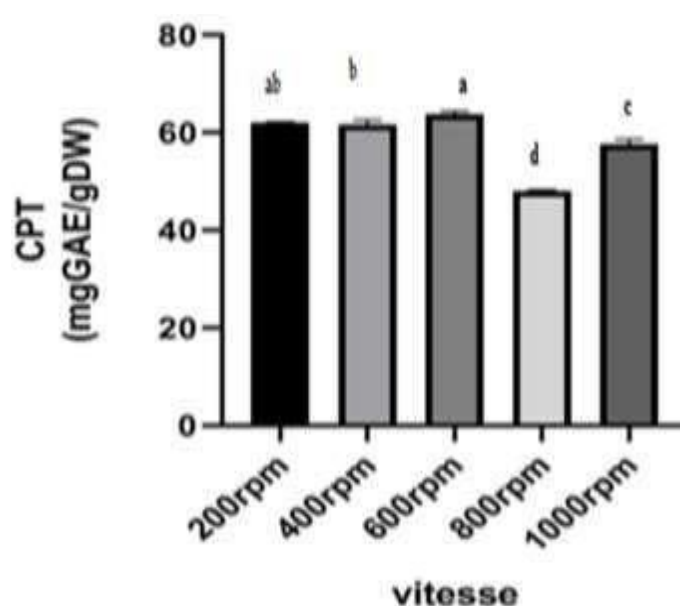


Figure 17: Effet de la vitesse d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$).

I.2.2. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse

L'optimisation de l'extraction par macération des polyphénols totaux de *H. scoparia*, par la méthodologie de surface de réponse, a été réalisée en étudiant les quatre facteurs suivants : la concentration en éthanol (X1), le temps d'extraction (X2), le ratio liquide/solide (X3) et la vitesse (X4).

Les résultats des expériences de ce plan sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Valeurs observées et prédites de polyphénols, flavonoïdes et activités anti oxydantes des extraits obtenus par macération du plan Box-Behnken.

Niveaux variables					Valeurs observées			Valeurs prédites		
Run					TCP	TFC	DPPH	TCP	TFC	DPPH
	x ₂	x ₃	x ₄		(mg EAG/g)	(mg EQ/g)	(mg EAA/g)	(mg EAG/g)	(mg EQ/g)	(mg EAA/g)
x ₁										
1	60	30	45	200	79.18±0.53	2.53±0.07	34.98±0.45	79.07	2.47	34.33
2	60	180	45	800	81.03±0.30	2.24±0.03	31.89±0.34	79.17	2.32	33.63
3	30	105	45	200	66.92±1.34	2.26±0.09	31.99±0.49	66.80	2.30	33.03
4	90	30	45	500	74.56±0.70	2.33±0.03	36.63±0.37	76.41	2.38	37.24
5	60	30	45	800	89.09±1.16	2.72±0.12	37.68±0.39	86.85	2.77	40.28
6	60	180	30	500	64.33±1.64	2.28±0.08	28.07±1.02	66.10	2.30	27.89
7	60	105	60	800	79.23±0.62	2.60±0.11	43.30±0.29	81.62	2.66	41.53
8	60	105	30	800	76.84±0.72	2.07±0.13	27.61±0.26	76.06	2.04	28.46
9	60	105	45	500	73.09±0.16	2.84±0.03	40.28±0.19	73.78	2.77	40.65
10	60	180	60	500	77.99±0.21	2.37±0.15	41.08±0.52	77.68	2.43	42.37
11	90	105	45	800	71.37±0.49	2.53±0.06	33.09±0.65	71.84	2.48	31.13
12	30	105	60	500	71.72±0.92	2.42±0.10	41.13±0.26	67.71	2.38	42.09
13	90	180	45	500	67.52±0.51	2.78±0.07	35.62±0.15	67.86	2.71	35.06
14	90	105	60	500	73.75±0.16	2.50±0.09	38.98±0.44	73.71	2.43	40.24
15	60	105	45	500	72.85±0.44	2.75±0.05	40.44±0.22	73.78	2.77	40.65
16	30	180	45	500	70.72±0.30	2.10±0.13	39.21±0.63	71.48	2.04	38.44
17	60	30	30	500	71.79±0.60	2.36±0.04	30.58±0.19	72.45	2.30	28.36
18	60	105	30	200	70.85±0.82	2.44±0.00	27.87±0.25	71.08	2.37	29.47
19	30	105	30	500	66.49±1.43	1.89±0.01	27.61±0.37	63.56	1.97	27.44
20	60	105	60	200	77.77±0.69	2.29±0.06	44.18±0.42	81.17	2.32	43.17
21	90	105	30	500	61.17±0.24	2.21±0.01	28.01±1.09	62.21	2.27	28.13
22	90	105	45	200	84.69±0.52	2.34±0.00	42.32±0.14	81.01	2.42	42.86
23	30	30	45	500	65.86±1.33	2.64±0.04	34.60±0.23	68.13	2.70	35.01
24	60	30	60	500	77.96±0.34	2.77±0.12	41.40±0.21	76.53	2.74	40.65
25	60	105	45	500	74.40±1.10	2.72±0.01	41.22±0.22	73.78	2.77	40.65
26	60	180	45	200	81.26±0.57	2.63±0.05	43.75±0.39	81.54	2.61	42.23
27	30	105	45	800	78.37±0.26	2.34±0.06	43.56±1.05	81.40	2.25	42.10

x₁ :Concentration en éthanol (%); x₂ : Temps (min); x₃ : ratio liquide/solide (mL/g); x₄:Temperature (°C); CPT: Composés phénoliques total (mg EAG/ g MS); TF : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g MS); DPPH: Activité inhibitrice du DPPH (mg EAA/g MS).

I.2.2.1. Estimation du paramètre du model

Cette partie est consacrée à l'étude de l'effet des paramètres d'extraction par macération sur la teneur en composés phénoliques, la teneur en flavonoïdes et l'activité DPPH de *H. scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Le modèle de régression pour la teneur en composés phénolique, la teneur en flavonoïdes et l'activité DPPH a été présenté dans les équations qui suit :

$$TCP (mg_{EAG}/g_{Ms}) = 73.44 + 3.91 x_3 - 6.19 x_1 x_4 - 4.26 x_1^2 + 6.16 x_4^2$$

$$TF (mg_{EQ}/g_{Ms}) = 2.77 + 0.08 x_1 - 0.07 x_2 + 0.14 x_3 + 0.24 x_1 x_2 - 0.14 x_2 x_4 + 0.16 x_3 x_4 - 0.24 x_1^2 - 0.26 x_3^2 - 0.16 x_4^2$$

$$DPPH \text{ piégeage des radicaux libres } (mg_{AAE}/g_{Ms}) = 40.65 + 6.69 x_3 - 5.20 x_1 x_4 - 3.64 x_2 x_4 - 2.27 x_1^2 - 1.93 x_2^2 - 3.89 x_3^2$$

I.2.2.2. Effet des facteurs

Les résultats obtenus ont montré que les paramètres testés ont présenté différents effets sur les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes et sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) (Tableau X).

- **Effet linéaire**

Cette étude a révélé que les paramètres linéaires qui ont une influence significative sur la l'extraction des flavonoïdes sont la concentration du solvant (0,0040), le temps d'extraction (0,0066) et le ratio liquide/solide (0<0,0001), tandis que seul le ratio solide/liquide a un effet significatif sur l'extraction des polyphénols (0,0003) et l'activité antioxydante (<0,0001).

- **Effet d'interaction**

La seule interaction ($x_1 * x_4$) à $p=0.0007$ a un effet significatif sur l'extraction des polyphénols tandis que les autres paramètres n'ont pas aucun effet significatif.

Cependant les trois effets ($x_1 * x_2$), ($x_2 * x_4$) et ($x_3 * x_4$) ont un effet significatif sur l'extraction de flavonoïdes avec des probabilités de <0,0001; 0,0045; 0,0018, respectivement.

Concernant l'activité antioxydante, les deux interactions qui ont exercé un effet significatif sont ($x_1 * x_4$), ($x_2 * x_4$) avec des valeurs de $p<0,0001$ et $p=0,0017$, respectivement.

• Effet quadratiques

Les deux effets quadratiques qui ont un effet significatif sur l'extraction des polyphénols sont (x_1^2) et (x_4^2) avec $p=0.0037$ et $p=0.0002$, respectivement.

Concernant l'extraction des flavonoïdes trois effets quadratiques à savoirs (x_1^2), (x_3^2) et (x_4^2) ont un effet significatif avec des probabilités de $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p=0,0008$, respectivement.

Les effets quadratiques (x_1^2), (x_3^2) et (x_2^2) avec des probabilités de 0,013 ; 0,0291 et 0,0003, respectivement, ont un effet significatif sur l'activité antioxydante tandis que l'effet (x_4^2) n'est pas un effet significatif.

Tableau X : Résultats de régression et analyse de variance pour les résultats expérimentaux de l'extraction par macération.

	Source	TCP		TFC		DPPH	
		Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F
parameters estimés	X_1	1,0806946	0,1978	0,0862266	0,0040*	-0,287347	0,5913
	X_2	-1,301132	0,1267	-0,079411	0,0066*	0,3128417	0,5593
	X_3	3,9132509	0,0003*	0,1426467	<,0001*	6,6916388	<,0001*
	X_4	1,2708485	0,1349	0,0006482	0,9791	-0,662619	0,2274
	$X_1 X_2$	-2,975	0,0511	0,2464152	<,0001*	-1,404682	0,1454
	$X_1 X_3$	1,8364198	0,2059	-0,059301	0,1834	-0,637124	0,4935
	$X_2 X_3$	1,8734568	0,1975	-0,077989	0,0880	0,548495	0,5545
	$X_1 X_4$	-6,19301	0,0007*	0,0265407	0,5393	-5,201505	<,0001*
	$X_2 X_4$	-2,537037	0,0894	-0,146608	0,0045*	-3,64007	0,0017*
	$X_3 X_4$	-1,133334	0,4253	0,168149	0,0018*	-0,157191	0,8646
	X_1^2	-4,266733	0,0037*	-0,246728	<,0001*	-2,274739	0,0130*
	X_2^2	1,7534285	0,1661	-0,068188	0,0854	-1,935055	0,0291*
	X_3^2	-2,172343	0,0927	-0,262616	<,0001*	-3,893886	0,0003*
	X_4^2	6,168606	0,0002*	-0,162847	0,0008*	-1,091827	0,1876
resultats de la regression	R^2	0,916567		0,944806		0,953784	
	R^2_{Adj}	0,819227		0,880414		0,899865	
	RMSE	2,746176		0,084001		1,804339	
	C.V(%)	3.70		3.43		4.93	
	ANNOVA	0,0002*		<,0001*		<,0001*	
	Lack of fit	0,0745		0,4018		0,0635	

I.2.2.3. Validation du model

Les valeurs élevées de R-carré pour le modèle testé (0,91 et 0,81 ; 0,94 et 0,88 ; 0,95 et 0,89 pour R^2 et R^2_{Adj} pour TCP, TFC et DPPH, respectivement) indiquent une corrélation remarquable entre les valeurs trouvées dans la présente étude et celles prédites.

Dans un bon modèle statistique, R^2_{Adj} devrait être comparable à R^2 , ce qui est le cas avec les résultats obtenus. Lorsque le coefficient de détermination R^2 est égal ou

supérieur à 80 %, le modèle est jugé bon (Fadil *et al.*, 2021) ; L'adéquation du modèle est déterminée essentiellement par le R-carré ajusté (R^2 Adj.) (Zakaria *et al.*, 2021).

Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes et l'activité antioxydante sont illustré dans le tableau X.

Les coefficients de variation (C.V%) obtenus de TCP, TFC et de l'activité DPPH étaient respectivement de 3,70, 3,43 et 4,93 %. Si le coefficient de variation (C.V%) est inférieur à 10 %, la valeur moyenne présente une faible variation, indiquant que le modèle de réponse développé est adéquat et fiable ((Dahmoune *et al.*, 2015).

Dans la présente étude, les valeurs de manque d'ajustement de la teneur en composés phénoliques, de la teneur en flavonoïdes et de l'activité de récupération du DPPH de *H. scoparia* sont respectivement de 0,0745 ; 0,4018 et 0,0635. La validité des modèles est réalisée en analysant le manque d'ajustement, de sorte que le modèle s'adapte précisément aux données réelles si une valeur p insignifiante est supérieure à 0,05 (Zakaria *et al.*, 2021) Tous les modèles polynomiaux quadratiques obtenus dans ce travail étaient précis et fiables pour prédire les réponses correspondantes

I.2.2.4. Conditions optimales

Les extractions par macération ont été réalisées dans les conditions optimales prédites par les modèles mathématiques de surface de réponse (MSR) pour chaque paramètre étudié, à savoir la teneur en composés phénoliques totaux (CPT), la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante DPPH. Les résultats expérimentaux obtenus ainsi que les valeurs prédites par le modèle sont présentés dans la figure 18 et le tableau XI.

Les conditions qui ont permis de donner les teneurs les plus élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes et la plus forte activité DPPH sont : concentration du solvant de 46,96%, temps d'extraction de 30 min, ratio liquide/solide de 55,5 mL/mg et une vitesse d'extraction de 800 rpm.

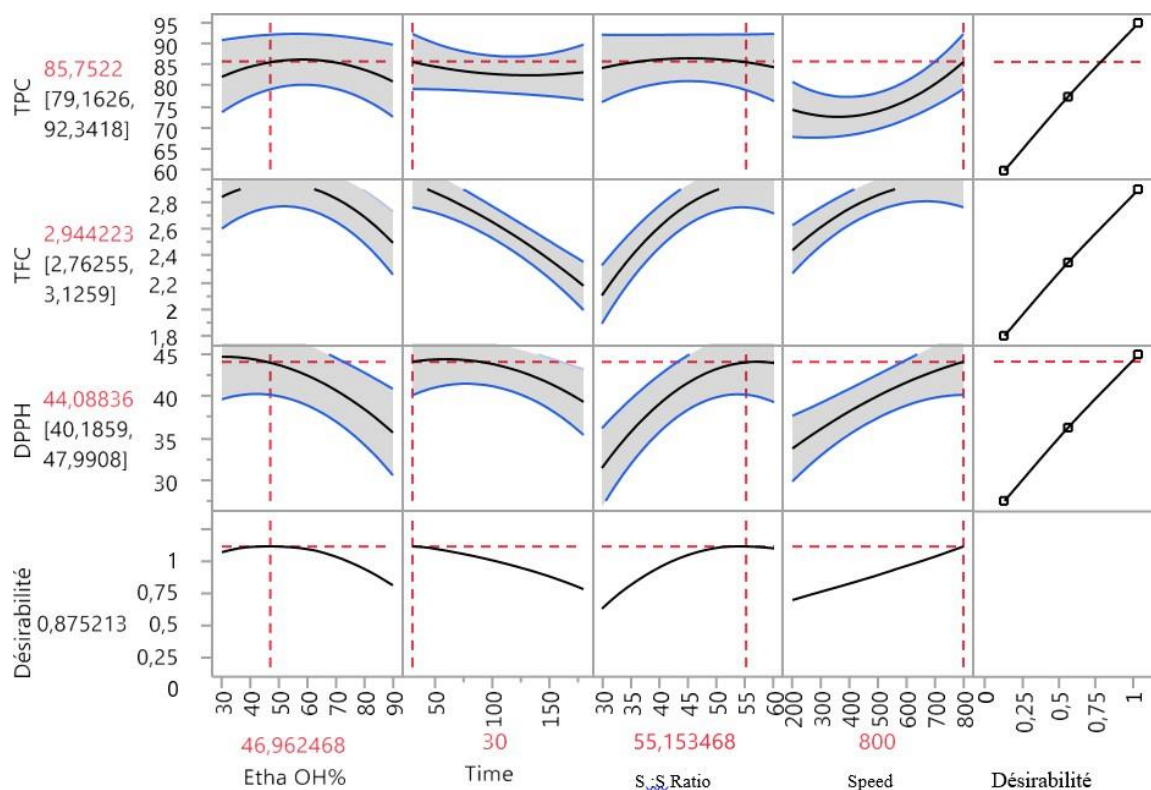


Figure 18 : Profileur de prédiction de l'extrait de *H. scoparia* obtenu par macération.

Tableau XI : Conditions optimale de macération.

Facteurs	Conditions Optimal
Concentration d'éthanol (%)	46,96
Temps (min)	30
Ratio liquide/solide (mL/g)	55,15
Vitesse (rpm)	800
Résultats	
TCP (mg EAG/g Ms)	48,60±0,49
TF (mg EQ/g Ms)	2,88±0,35
DPPH scavenging (mg EAA/g Ms)	43,20±0,23

I.2.2.5. Analyse de surface

Les profils de surface de réponse tridimensionnels de plusieurs modèles de régression non linéaire sont représentés dans cette partie qui suit, afin d'étudier les effets interactifs des variables indépendantes testées et leur interaction mutuelle sur la teneur en composés phénoliques, la teneur en flavonoïdes et l'activité DPPH.

L'interaction entre la concentration en éthanol et la vitesse d'agitation a un impact significatif sur l'extraction des composés phénoliques totaux (CPT), comme illustré dans la figure 19. Cette interaction a exercé un effet inversement proportionnel sur la teneur en polyphénols, avec une valeur maximale de 85 mg EAG/g observée à 30 % d'éthanol et à une vitesse de 800 rpm, ainsi qu'à 90 % d'éthanol et à une vitesse de 200 rpm.

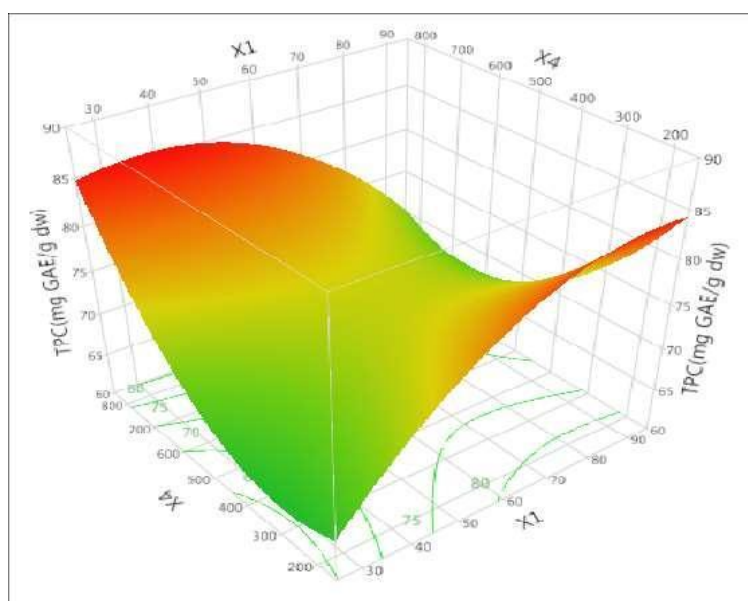


Figure 19 : Graphique de surface de réponse illustrant l'influence de la concentration d'éthanol et la vitesse sur l'extraction par macération des composés phénoliques de *H. scoparia*.

Les effets des interactions entre la concentration d'éthanol et le temps, entre le temps et la vitesse d'extraction et entre le rapport liquide/ solide et la vitesse d'extraction sur les flavonoïdes totaux de *H. scoparia* sont représentés dans la figure 20.

L'analyse des résultats de la figure 20(a) a montré que la teneur en flavonoïdes augmente avec la concentration du solvant après 120 min de macération.

La figure 20(b) met en évidence une relation inverse entre la vitesse et le temps

d'extraction sur la teneur en flavonoïdes totaux de *H. scoparia*. Par exemple, une teneur approximative de 2,8 mg EQ/g a été observée pour un temps d'extraction de 20 minutes à une vitesse de 800 rpm. Cette tendance suggère que l'augmentation de la vitesse d'extraction peut compenser une réduction du temps d'extraction, permettant d'atteindre des rendements similaires en flavonoïdes.

Le graphique 20(c) présente l'influence du rapport liquide/solide ainsi que de la vitesse d'extraction sur la teneur en flavonoïdes de la plante *H. scoparia*. Il a été constaté que la concentration en flavonoïdes augmente avec une élévation modérée de ces deux facteurs, atteignant un pic avant de décliner aux valeurs extrêmes. Cette observation indique qu'un équilibre entre la quantité du solvant et l'intensité de l'agitation est crucial pour obtenir une extraction optimale.

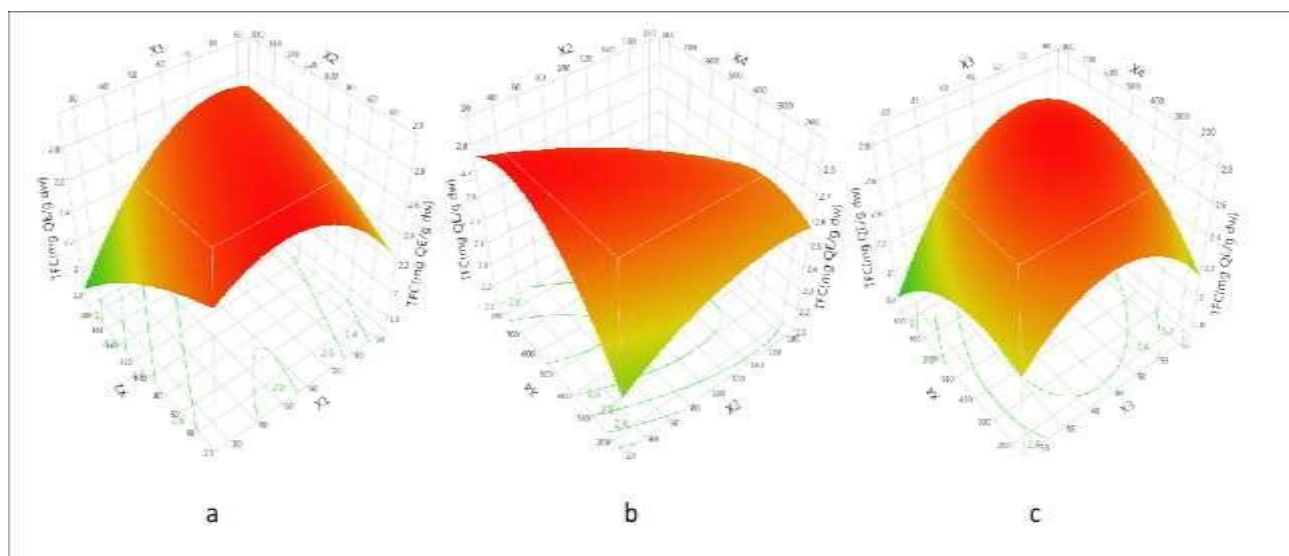


Figure 20 : Graphiques illustrant l'effet des paramètres d'extraction par macération sur la teneur en flavonoïdes de *H. scoparia*.

(a) : Concentration d'éthanol/Temps ;(b) : Temps/Vitesse ;(c): Ratio liquide/solide/ Vitesse.

L'inhibition du DPPH augmente avec la vitesse d'extraction lorsque la concentration en éthanol et le temps d'extraction sont faibles. En revanche, à des concentrations élevées d'éthanol et pour des temps d'extraction prolongés, cette tendance s'inverse (Figure 21 a, b).

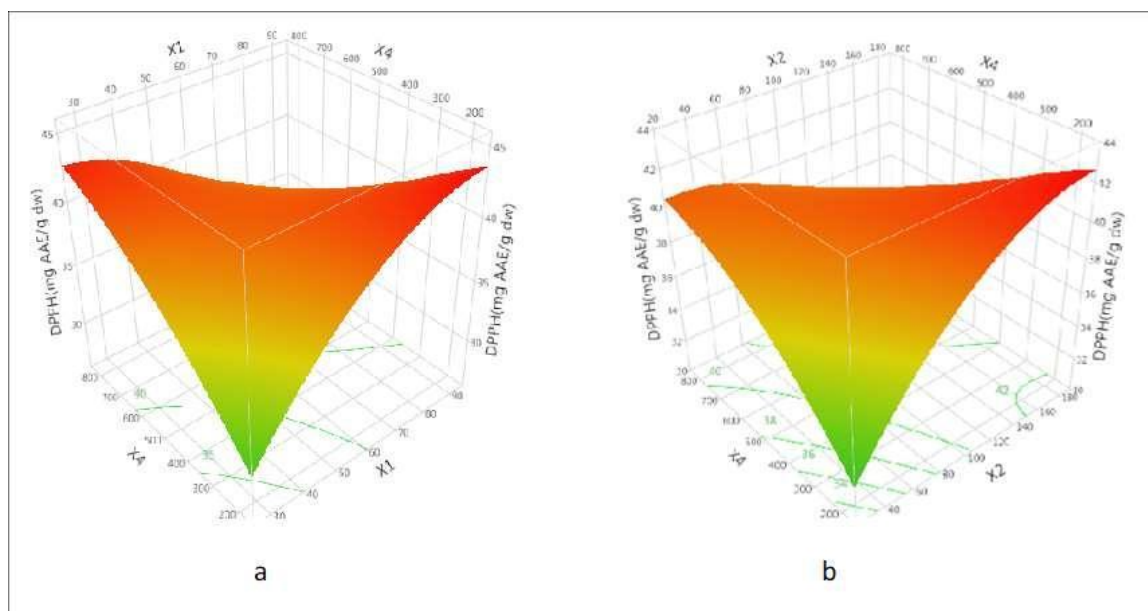


Figure 21 : Graphiques illustrant l'effet des paramètres d'extraction par macération sur l'activité antioxydante DPPH.

(a) : Concentration du solvant/Vitesse ; (b) : Temps/Vitesse.

II. Activité biologiques des extraits optimums

II.1. Activité antioxydante

Les extraits obtenus par les paramètres d'extraction optimaux ont été utilisés pour évaluer l'activité inhibitrice de l'ABTS et les activités réductrices du fer et du molybdate (Figure 22).

Les résultats de l'activité inhibitrice de l'ABTS de l'extrait de *H. scoparia* obtenu par extraction assistée par ultrasons ont montré que le pourcentage d'inhibition du radical ABTS augmente avec la concentration de l'extrait, le pourcentage d'inhibition le plus élevé (93,81 %) a été trouvé avec la concentration de 1 mg/mL.

Afin de déterminer l'IC₅₀, paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% du radical ABTS, différentes concentration d'extrait, allant de 0,2 à 1,2 mg/mL, ont été testées. Une IC₅₀ de 0,408±0,001 mg/mL a été exercée par l'extrait de *H. scoparia* (Figure 22).

A la même concentration qui de 1 mg/mL, l'extrait obtenu par macération a exercé un pourcentage d'inhibition de l'ABTS de 89,90%, avec une IC₅₀ de 0,51±0,004 mg/mL.

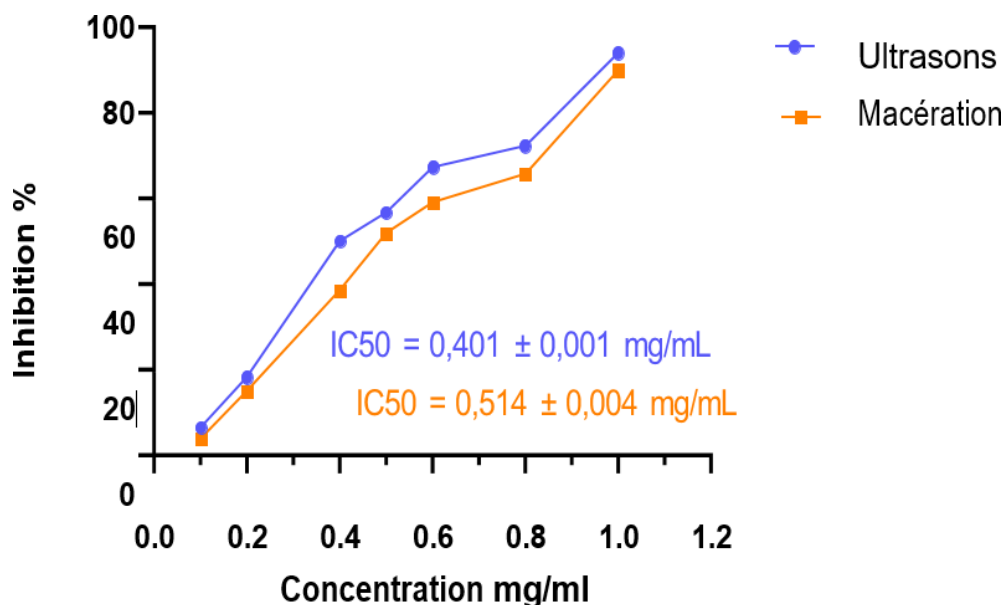


Figure 22 : Activité de piégeage de l'ABTS des extraits de *H. scoparia* obtenus par macération et ultrasons.

L'activité réductrice du fer et du molybdate a été testée sur différentes concentrations des extraits de *H. scoparia* obtenus par l'extraction assistée par ultrasons et par macération et (Figure 23).

Les résultats obtenus ont révélé que en augmentant la concentration de l'extrait de 0,2 à 1,2 mg/mL les activités réductrices du fer et du molybdate des extraits étudiés augmentent d'une façon significative.

Les activités réductrices du fer les plus élevées ont été enregistrées à 1 mg/mL, avec des valeurs de 19,54 et 19,09 mg EAA/g MS pour les extraits obtenus par macération et par extraction assistée par ultrasons, respectivement (Figure 23(a)). L'analyse statistique montre une différence significative avec $P < 0,0001$.

Concernant l'activité réductrice du molybdate, la meilleure activité réductrice a été observée à la même concentration qui est de 1mg/mL avec une valeur de 31,41 mg EAA/g MS pour l'extrait obtenu par macération, et 31,45 mg EAA/g MS pour l'extrait obtenu par ultrasons (Figure 23(b)). L'analyse statistique de l'activité réductrice du molybdate montre une différence significative avec p value de 0,0003.

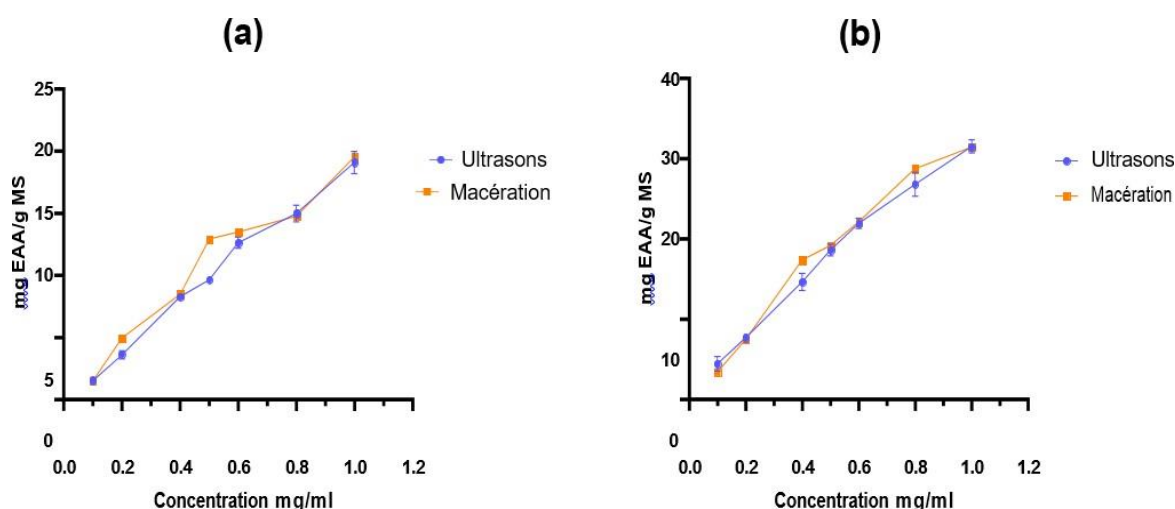


Figure 23 : Activités réductrices du fer et du molybdate des extraits de *H. scoparia* obtenus par macération et ultrasons

(a) : Activité réductrice du fer ; (b) : Activité réductrice du molybdate.

Cette étude a révélé que les extraits de *H. scoparia* ont permis d'inhiber les radicaux libres DPPH et ABTS et de réduire le fer et le molybdates d'une manière différente. Cela pourrait être dû à la diversité structurale des antioxydants présents dans l'extrait et aux interactions entre ces composés qui influencent leurs mécanismes fonctionnels (Santos-Sánchez *et al.*, 2019 ; Teng *et al.*, 2014). Bouaziz *et al.* (2016) ont confirmé dans leurs travaux que l'extrait éthanolique de *H. scoparia* exerçait une activité inhibitrice du DPPH et une activité réductrice du molybdate. L'étude menée par Benkherara et Bordjiba, (2018) a rapporté que la même plante présentait des activités de piégeage du DPPH et de l'ABTS, ainsi qu'un pouvoir réducteur ferrique, ce qui justifie les résultats obtenus.

II.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits obtenus par les conditions optimales a été évaluée à l'aide de la méthode de dilution en gélose contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistante à la Méthicilline (SARM).

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de *H. scoparia* obtenu par ultrasons a exercé une activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées, à l'exception d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (Tableau XII). L'activité antibactérienne la plus élevée a été exercée contre les souches SARM et *Salmonella sp.*, avec un diamètre d'inhibition de 16 mm. *Klebsiella pneumonia* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 ont été également inhibés par le même extrait, avec des zones d'inhibition de 13,66 et 12,33 mm, respectivement. Tandis que la plus faible zone d'inhibition (12,33 mm) a été trouvée chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633.

Concernant l'extrait de *H. scoparia* issu de la macération, l'effet inhibiteur le plus marqué a été observé contre *Salmonella sp.* avec une zone d'inhibition de 19,33 mm, suivi par la souche *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) avec une zone d'inhibition de 16 mm. L'effet antibactérien le plus faible a été exercé sur la souche *Klebsiella pneumonia* BAR 32, avec une zone d'inhibition de 13,66 mm.

Cette étude a révélé que l'extrait obtenu par macération n'a aucun effet inhibiteur sur *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, ce qui pourrait être dû à une résistance intrinsèque de ces bactéries ou à une concentration insuffisante en composés actifs à effet antibactérien.

L'étude statistique des résultats de l'activité antibactérienne a mis en évidence des différences significatives entre les extraits testés selon la méthode d'extraction employée (macération ou ultrasons).

Tableau XII : Activité antimicrobienne des extraits de *H. scoparia* (mm) obtenu par ultrason et macération.

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6633	SARM
Tetracycline (TE)	10	9	10	–	–
Ciproflaxine (CIP)	30	36	30	28	34
Extrait de <i>H. scoparia</i> (Macération)	–	13.66±0.57 ^b	16±1.00 ^a	12.33±1.52 ^b	16±1.00 ^a
Extrait de <i>H. scoparia</i> (Ultrasons)	–	13.66±0.57 ^c	19.33±1.00 ^b	–	16±0.9 ^a

Les chiffres qui portent des lettres différentes sont significativement différent ($p < 0,05$).

Les résultats de cette étude ont montré que les activités antibactériennes les plus élevées ont été exercées par le standard Ciproflaxine (CIP), suivi de celles de l'extrait de *H. scoparia* obtenu par extraction assistée aux ultrasons, puis celles de l'extrait préparé par macération, tandis que les activités les plus faibles ont été exercées par le standard Tétracycline (TE).

Les fortes zones d'inhibition exercées par les extrait de *H. scoparia* contre les souches *Salmonella sp.* et *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline (SARM), pourraient être attribuées aux niveaux élevés de composés phénoliques et de flavonoïdes dans l'extrait de *H. scoparia*. Les polyphénols ont été reconnus pour leurs propriétés antibactériennes potentielles (Bouarab Chibane *et al.*, 2019). Parmi les polyphénols, les flavonoïdes ont été largement étudiés et il a été démontré qu'ils exercent des effets antibactériens par le biais de multiples mécanismes. Premièrement, les flavonoïdes peuvent inhiber directement les bactéries en perturbant la membrane bactérienne, en inhibant la respiration cellulaire ou en interférant avec la réplication de l'ADN. Deuxièmement, ils peuvent également améliorer l'activité des antibiotiques en augmentant leur puissance ou en inversant la résistance aux antibiotiques des bactéries (Xie *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que l'extrait de *H. scoparia* a un potentiel en

tant qu'agent antibactérien naturel et que son efficacité peut être liée à sa teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes.

Le rôle des composés phénoliques dans divers extraits de plantes a fait l'objet de recherches approfondies, en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la santé (Kalili *et al.*, 2011). La présente étude a révélé la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait de *H. scoparia*, indiquant son activité antibactérienne potentielle contre les bactéries pathogènes. Ces résultats sont cohérents avec des recherches antérieures qui suggèrent la capacité de la plante à combattre les organismes Gram positifs et Gram négatifs (Metrouh-Amir *et al.*, 2015).

L'étude de Nounah *et al.* (2019) a montré que l'extrait éthanolique de *H. scoparia* présente une activité antimicrobienne contre *Klebsiella pneumonia* et *Salmonella sp.* De même, l'étude menée par Drioichea *et al.* (2019) a rapporté une activité antibactérienne de l'extrait de *H. scoparia* contre *Klebsiella pneumonia* ; *Salmonella sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus dans ce travail.

II.2.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Une concentration minimale inhibitrice faible signifie une forte activité antibactérienne (Coulidiati *et al.*, 2009). La concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *H. scoparia*, obtenu par extraction assistée aux ultrasons, a été évaluée contre *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistante à la Méthicilline (SARM) (Tableau XIII). Les résultats obtenus ont montré une CMI de 12,5 mg/mL contre *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella sp.* et SARM. En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, la CMI était de 25 mg/mL.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait de *H. scoparia* obtenu par macération a été évaluée contre *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300 (SARM) (Tableau XIV). Les résultats obtenus ont montré une CMI de 12,5 mg/mL contre *Klebsiella pneumoniae* BAR 32 et SARM, indiquant une activité antibactérienne modérée contre ces souches. En revanche, une CMI plus faible de 6,25 mg/mL a été observée contre *Salmonella sp.*, suggérant une efficacité inhibitrice plus élevée contre cette bactérie.

Tableau XIII : Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en mg/mL d'extrait de *H. scoparia* obtenu par EAU.

Souches bactériennes	Extrait de <i>H. scoparia</i> EAU
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12,5
<i>Salmonella</i> sp	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6633	25
SARM	12,5

Tableau XIV : Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en mg/mL d'extrait de *H. scoparia* obtenu par macération.

Souches bactériennes	Extrait de <i>H. scoparia</i> macération
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12,5
<i>Salmonella</i> sp	6,25
SARM	12,5

II.3. Test de stabilité à l'oxydation sur huile végétale

Afin de déterminer l'efficacité des extraits de *Hammada scoparia* à protéger les lipides contre l'oxydation, un test Oxitest a été réalisé sur l'huile de tournesol enrichie avec différentes concentrations de chaque extrait.

L'évolution de la pression a été suivie afin d'évaluer la période d'induction (PI), qui reflète la stabilité oxydative de l'huile. Les résultats obtenus pour chaque concentration sont présentés dans les figures ci-dessous, mettant en évidence l'impact des extraits sur le retardement du processus d'oxydation.

L'évaluation de l'oxydation de l'huile de tournesol à l'aide du test Oxitest a permis de comparer la stabilité oxydative de l'huile seule (Figure 24) et de l'huile enrichie avec différentes concentrations de l'extrait de *Hammada scoparia*.

L'analyse des courbes de pression au fil du temps montre que la période d'induction (PI), définie comme le moment où la pression commence à diminuer de manière significative, varie selon les concentrations et les extrait testés. L'huile de tournesol seule présente une PI plus courte, indiquant une oxydation rapide sous les conditions du test. En revanche, l'ajout de l'extrait végétal prolonge cette période, suggérant un effet protecteur contre l'oxydation.

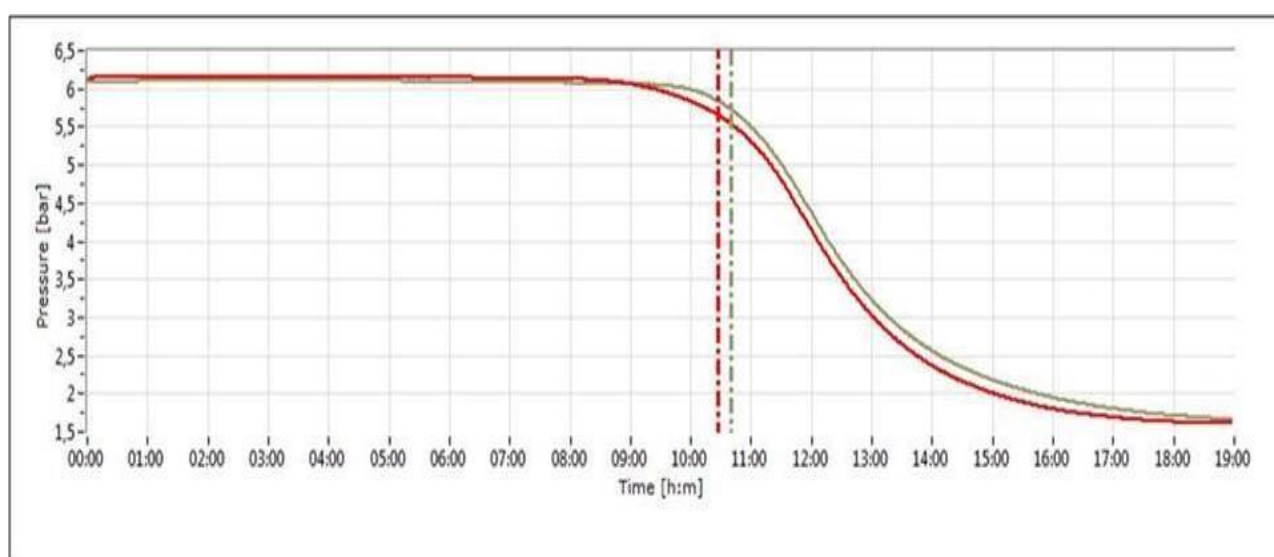


Figure 24 : Valeur de la période d'induction (IP) d'huile de tournesol.

Les résultats de l'étude de l'efficacité de la concentration de 0,01% des extraits de *H. scoparia*, obtenus par ultrasons et par macération sur la période d'induction sont représentés dans la figure 25. L'échantillon contenant 0,01% d'extrait obtenu par macération affiche une PI retardée d'environ 11h37, tandis que celui enrichi en extrait obtenu par ultrasons ne montre pas une augmentation de la PI. Cette différence peut être attribuée à une extraction plus efficace des composés bioactifs par macération, favorisant une meilleure préservation des polyphénols, reconnus pour leur activité antioxydante.

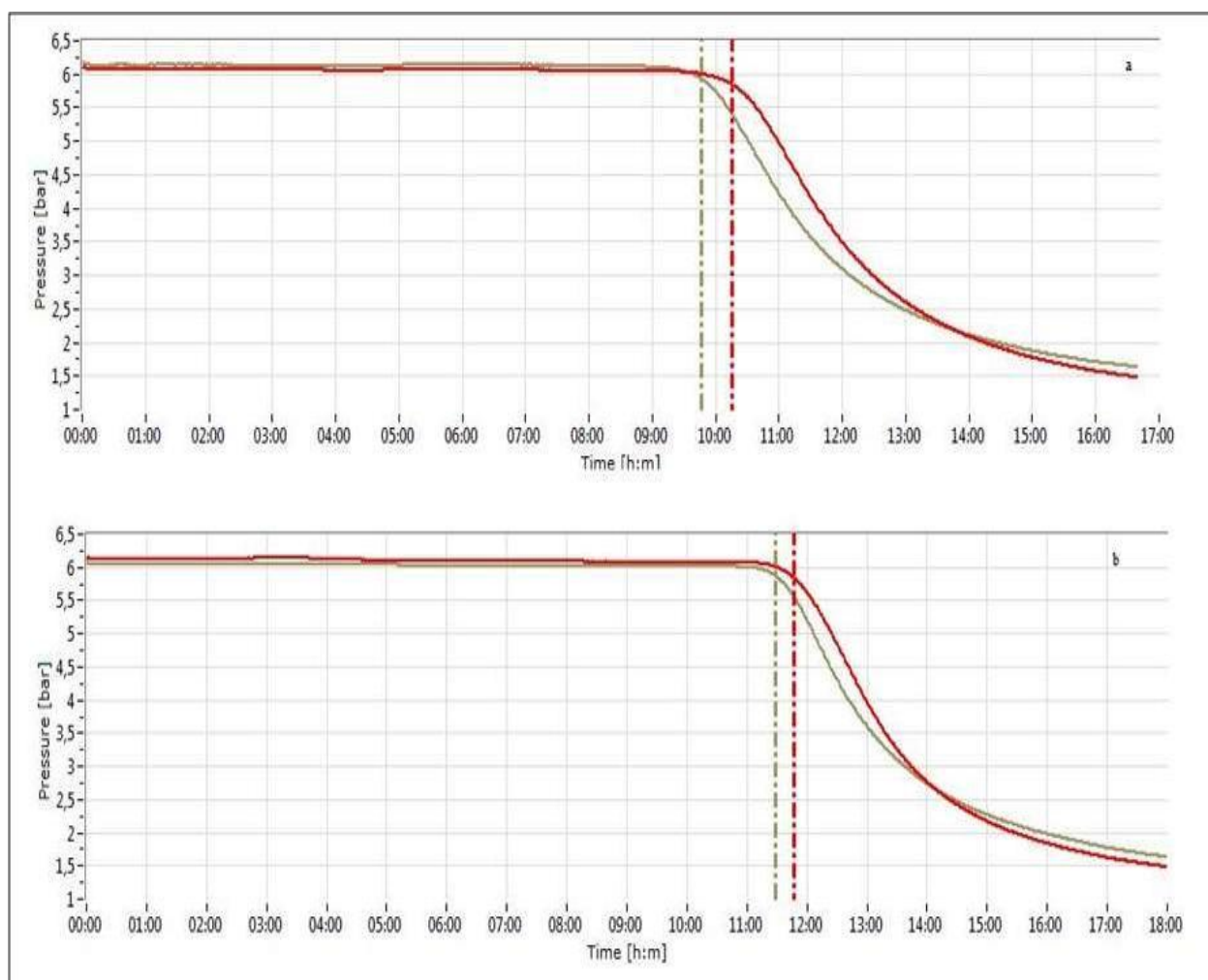


Figure 25 : Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (0,01%).

(a) : Extrait obtenu par EAU ; (b) : Extrait obtenu par macération.

Quant à la concentration de 0,1%, une valeur de période d'induction (PI) de 12h56 a été marquée pour l'échantillon enrichi avec l'extrait obtenu par ultrasons, tandis que celui contenant l'extrait issu de la macération a atteint une PI de 12h19 (Figure 26). Cette prolongation de la stabilité oxydative confirme l'effet antioxydant des composés bioactifs présents dans *H. scoparia*, dont l'efficacité semble renforcée à une concentration plus élevée.

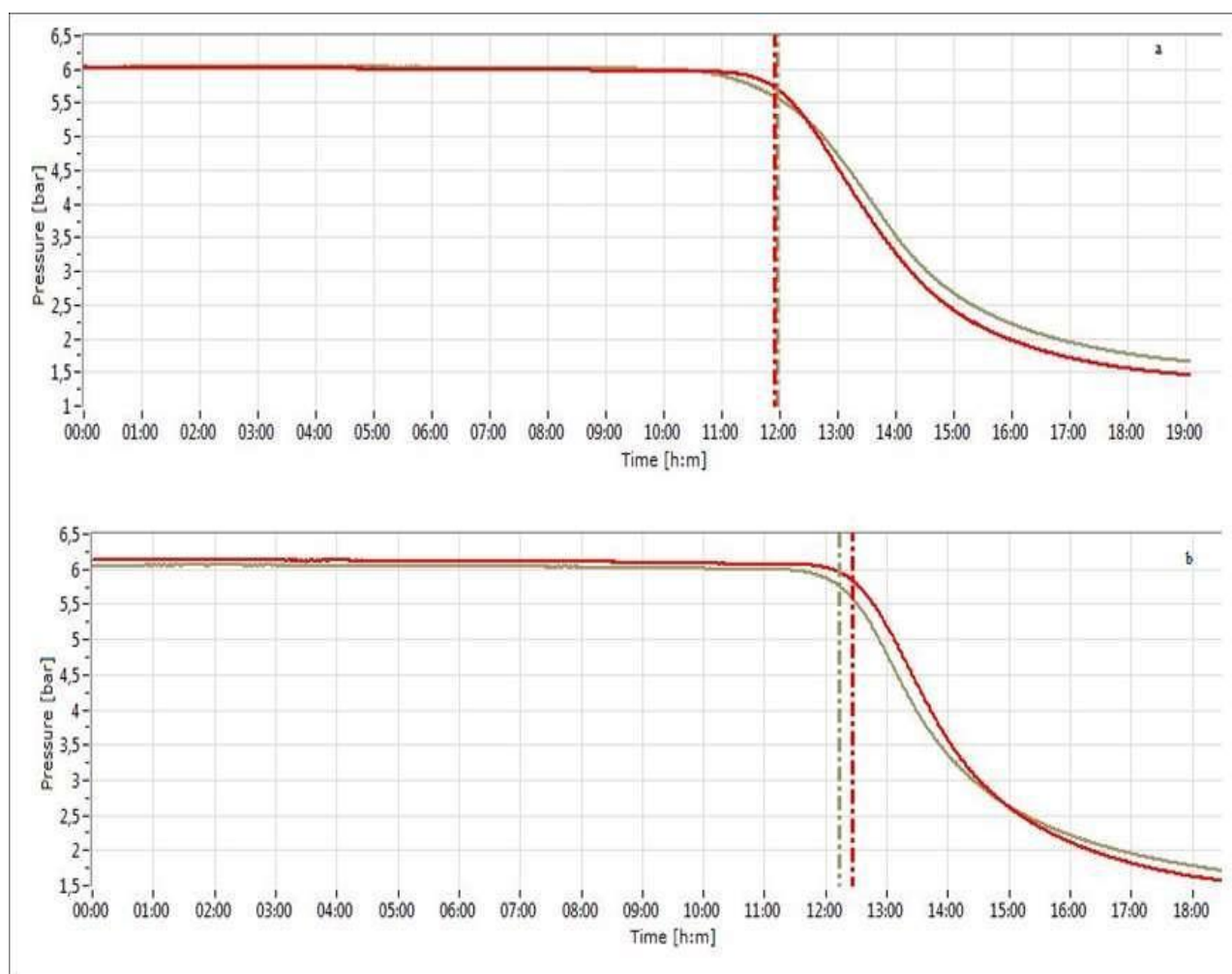


Figure 26 : Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (0,1%).

(a) : Extrait obtenu par EAU ; (b) : Extrait obtenu par macération.

A des concentrations plus élevées, notamment 1% et 2% (Figure 27 et 28), une augmentation encore plus marquée de la période d'induction (PI) a été observée, indiquant une meilleure résistance à l'oxydation de l'huile de tournesol.

Pour une concentration de 1%, une PI de 12h49 a été enregistrée avec l'extrait obtenu par ultrasons, tandis qu'elle a atteint 13h avec l'extrait issu de la macération. A 2%, la PI a encore augmenté, atteignant 13h17 pour l'extrait par ultrasons et 13h20 pour celui par macération. Cette tendance confirme l'effet dose-dépendant des composés antioxydants présents dans l'extrait, qui agissent en retardant la dégradation lipidique.

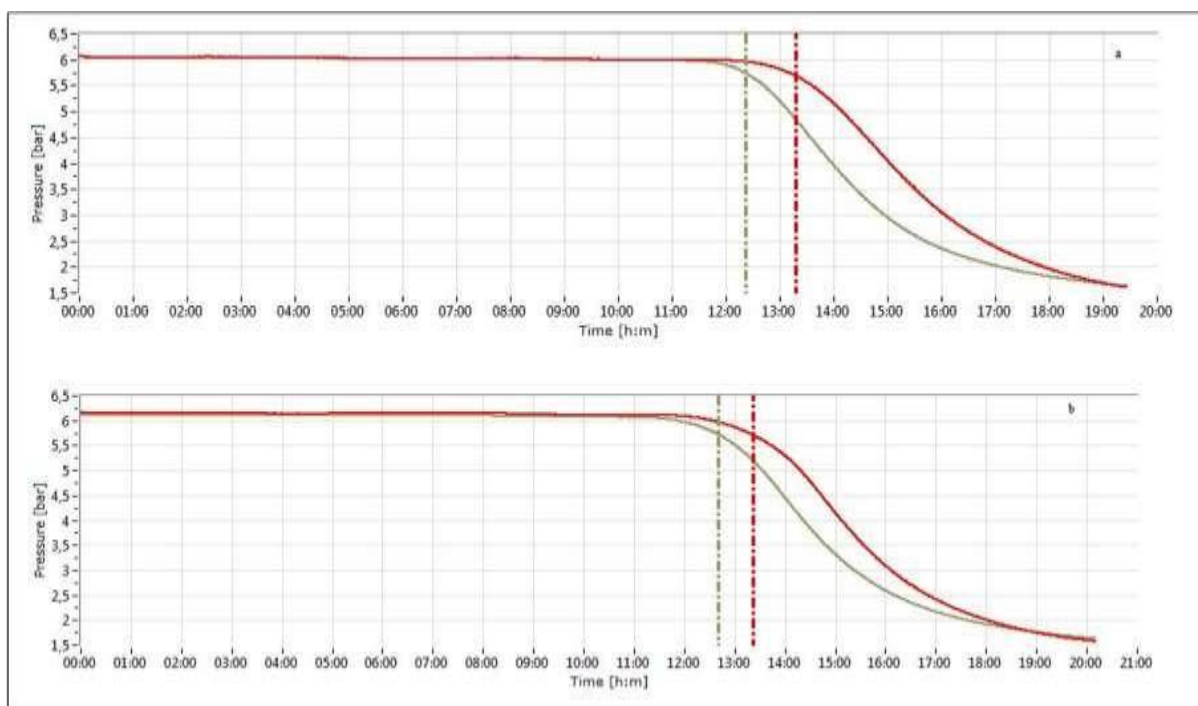


Figure 27: Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (1%).

(a) : Extrait obtenu par EAU ; (b) : Extrait obtenu par macération.

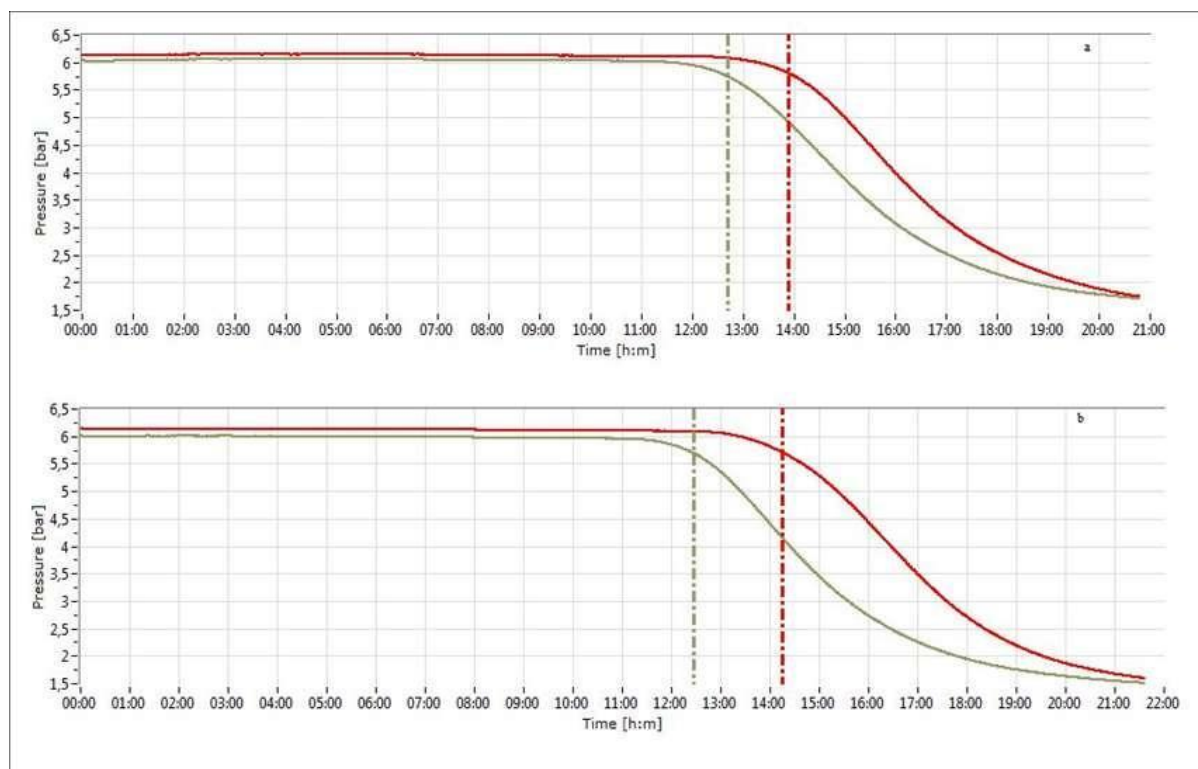


Figure 28 : Valeurs PI des extraits obtenus par EAU et macération (2%).

(a) : Extrait obtenu par EAU ; (b) : Extrait obtenu par macération.

III. Caractérisation des composés phénoliques des extraits optimisés de *H. scoparia*

III.1. UHPLC MS/MS

Afin d'étudier en profondeur la qualité et la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits optimaux de *H.scoparia* obtenus par ultrasons et par macération, la méthode UHPLC HRMS a été appliquée pour identifier les principaux composés phénoliques présents dans les deux extraits. Les données de spectrométrie de masse ont été obtenues en modes d'ionisation (négative et positive) (Irakli *et al.*, 2018). Les chromatogrammes d'ions totaux des extraits obtenus par macération et ultrasons sont présentés dans la figure 29, tandis que les principaux pics identifiés par analyse UHPLC-HRMS sont présentés dans le tableau xv. Chaque identification a été confirmée par la comparaison des spectres MS des composés observés avec ceux décrits dans la littérature. L'analyse UHPLC-MS des deux extraits a permis d'identifier 39 composés différents.

UHPLC-DAD-MS comparative des extraits obtenus par macération (ME) et extraction assistée par ultrasons (UAE) révèle un profil chromatographique globalement similaire. Toutefois, l'intensité accrue de plusieurs pics caractéristiques dans l'extrait UAE indique une meilleure efficacité d'extraction de certains composés bioactifs, notamment dans la plage de rétention de 4 à 22 minutes. Ces résultats suggèrent que l'extraction par ultrasons optimise l'extraction des métabolites d'intérêt, potentiellement en facilitant la rupture des parois cellulaires et la libération des composés phénoliques.

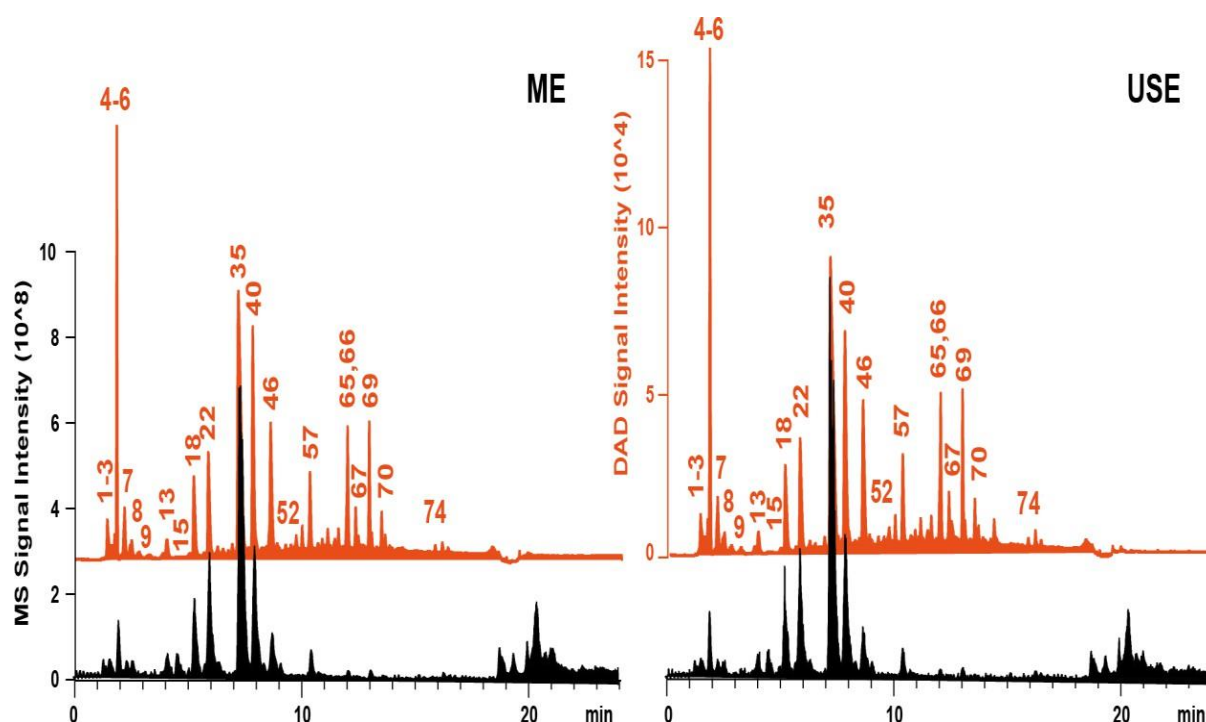
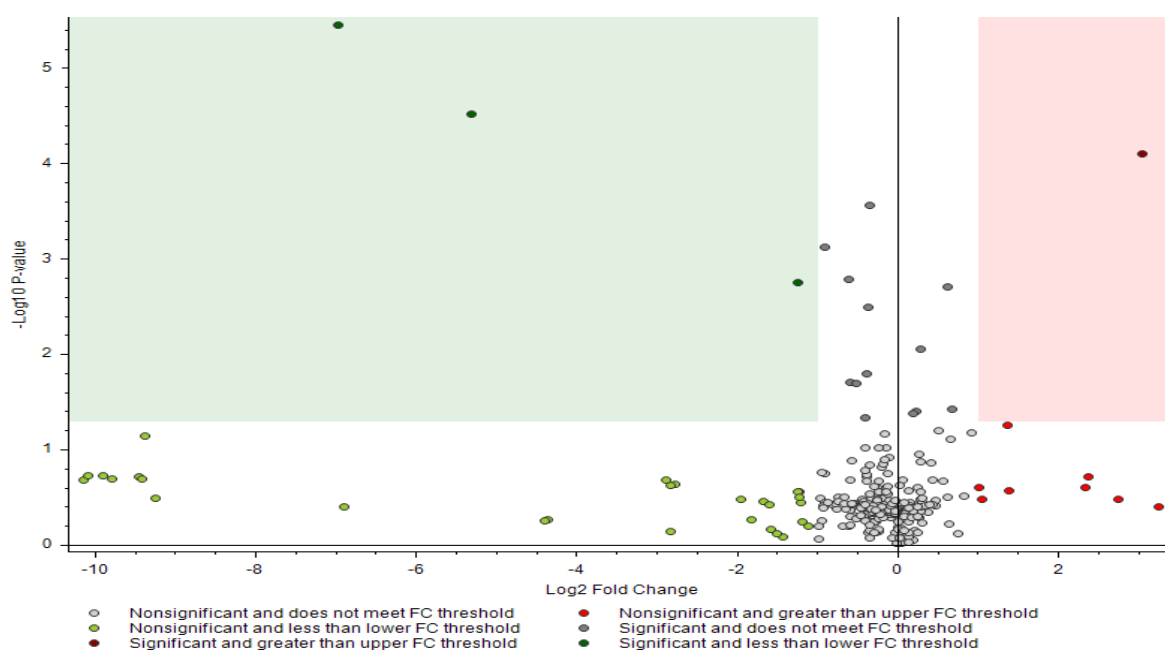


Figure 29 : Chromatogramme d'ions totaux des extraits de *H.scoparia* L, UAE et ME détecté par LC-Q-Orbitrap en mode positif, avec chromatogramme enregistré par détecteur UVVis à 270 nm .

Le graphique Volcano de l'analyse UHPLC-HRMS généré par le logiciel Compound Discoverer (Figure 30) constitue un outil efficace pour visualiser la direction, l'amplitude et la significativité des variations de concentration des composés bioactifs présents dans les extraits ME et UAE. Chaque point du graphique Volcano représente un composé bioactif. Les différences logarithmiques d'un facteur 2 entre ME et UAE sont représentées sur l'axe des abscisses et les différences de $-\log_{10}$ des valeurs de p sur l'axe des ordonnées. La ligne horizontale en pointillés représente le seuil de significativité ($p < 0,05$).

(A)



(B)

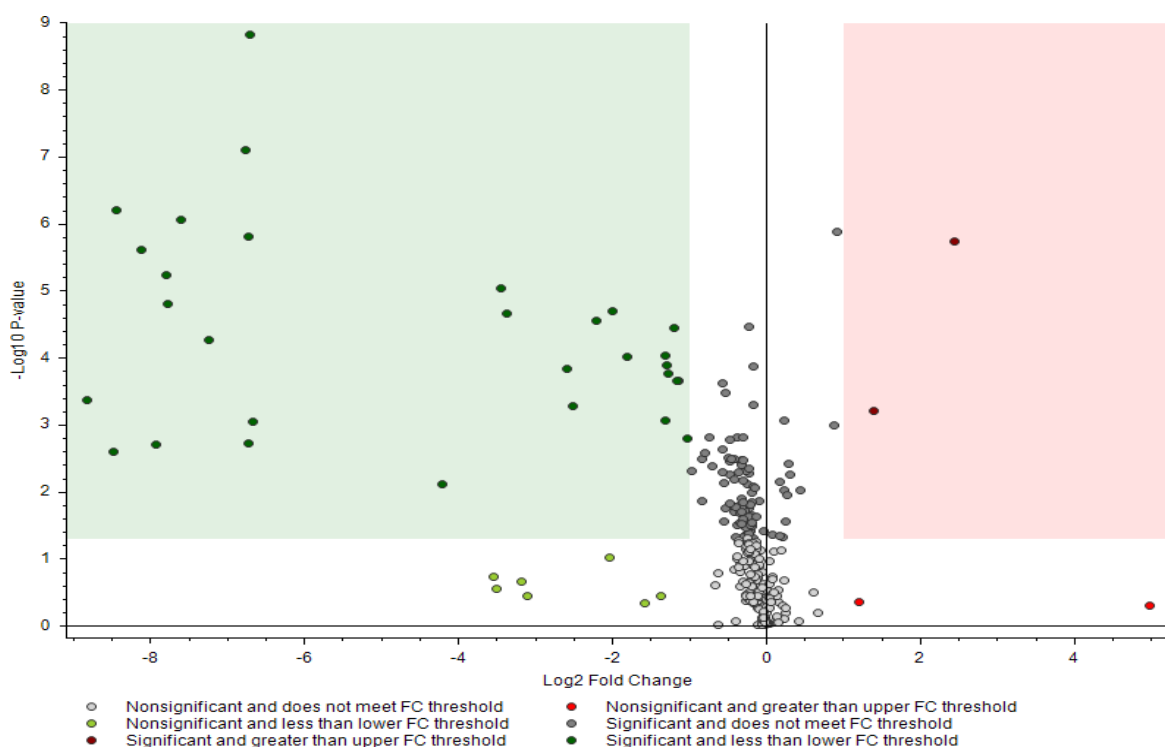


Figure 30 : Visualisation du contenu différentiel des composés bioactifs identifiés et non identifiés de ME et d'UAE avec le diagramme Volcano (A :mode négatif ;B :mode positif).

Tableau XV : Composition d'extrait phénolique de *H.scoparia* obtenue par UHPLC-HRMS

N°	Molécule	Formule chimique	Tr(min)	masse attendue	Masse expérimentale	Δmass [ppm]	Masse de l'adduit	MS/MS	Références
1	D-(+)-Maltose	C12 H2O11	1.53	341.10838	341.10865	-0.79	341.1091	59.01244 ;89.02297;71.0124;101.023 ;113.02309 ;119.0336	(S. Motyka <i>et al.</i> ,2023, M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
2	Acide gluconique	C6 H12 O7	1.57	196.05830	196,0577	3.08	195.0503	75.0073 ; 59.01245 ;72.99165 ;71.01238 ;87.00731	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
3	acide xylonique	C5H10O6	1.59	165.0389	165,0394	-3.02	165.0394	75.0073 ;59.01244 ;72.99165 ;71.01238 ;87.00729	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
4	glucose	C6 H12 O6	1.63	180.06339	180.0625	4.94	179.0552	75.0073;59.01245;72.9916 ;71.01237;85.02822	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
5	acide quinique	C7H12O6	1.97	192.06339	191.0556	-1.09	191.0553	85.02809;57.03322;59.01247;55.01759;71.01241;93.03321	(S. Motyka <i>et al.</i> ,2023)
6	L-(+)-Tartaric acid	C4 H6 O6	1.70	150.01644	150.01538	7.06	149.00811	72.99167 ;59.01247 ;87.00729 ;71.01242 ;89.0231 :73.02797,	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
7	Citric acid	C6 H8 O7	1.88	192.027005	192.02627	3.82	191.01890	85.02806;57.0332;59.01245;55.01756;71.01238;84.02023	(S. Motyka <i>et al.</i> ,2023)
8	cis-Aconiticacid	C6 H6 O6	2.03	174.01644	174.01558	0.49	173.0083	111.00745 :57.03321 ;67.01755 ;85.02814 ;131.03651.83.01246	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
9	DL-Malic acid	C4 H6 O5	2.05	134,02152	134,02035	8.76	133.01307	71.01239 ;72.99169 ;59.01241 ;72.98772 ;72.01569 ;151.39084	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)

Résultats et discussion

10	Oxaloglutarate	C7 H8 O7	2.33	204.027005	204,02638	3.06	203.0191	71.0124;69.03316;97.02808;95.01243;79.01741;67.01758;72.99174	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
11	Gallic acid 4-O-glucoside	C13H16O10	2.48	332.07435	332,07673	-7.16	331.06735	168.0054;125.02315;149.99471;124.01537;169.00992	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
12	uridine	C9 H12 N2 O6	2.56	244.06953	244,06933	0.85	243.06205	110.02345;82.02841;66.03352;118.965;146.96004;122.02346	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
13	Guanosine	C10 H13 N5 O5	3.36	283.091670	283,09187	-7.06	282.084594	150.04103;133.01434;108.01897;126.02965;107.03498;151.04549	(M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
14	L-Tyrosine	C9 H11 N O3	3.94	181.073894	181,07313	4.21	180.06585	123.04391;152.9165;167.90364;92.99239;94.99171;122.03623	(S. Motyka <i>et al.</i> ,2023, M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
15	Caftaric acid	C13H12O9	4.16	312.048135	312,04854	-1.29	311.041229	135.04396;149.00806;87.00734;179.03404;136.04739;85.02805	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
16	Tuberonic acid hexoside	C18H28O9	5.76	388,173335	388,17354	-0.52	387.166168	59.01246 ;89.02299 ;163.11182 ;71.01241 ;101.02303,113.02301	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
17	Protocatechuic acid 4-O-glucoside	C13H16O9	5.79	316.079435	316,07983	-1.24	315.072692	108.02037;152.01044;123.04386;153.05458	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
18	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	C8H8O4	6.05	168.04226	168,04136	5.35	167.034103	93.03318;109.02831;108.02043;122.03621;137.02315	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
19	2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone 5-sulfate	C9 H10 O7 S	6.43	262.014727	262,01475	-0.08	261.007446	119.04891;93.03316;135.04391;163.03902;72.99165	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
20	4-Hydroxybenzoic acid 4-O-glucoside	C13H16O8	6.65	300.08452	300,08467	-0.49	299.077392	93.0332;137.0233;94.0365 ;123.0439;74.02333	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)

Résultats et discussion

21	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	6.65	180,04226	180,04141	4.72	179.034133	135.04414 ;134.03616 ;94.99165 ;89.0382 ;90.9967 ;136.04736	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
22	2,3-Dihydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	7.00	154.02661	154,02554	6.94	153.018295	67.01752;65.03826;91.01748;109.02814;65.00185	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
23	Caffeoyl tartaric acid	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	7.67	312.048135	312,04848	-1.1	311.04125	135.04395;149.00807;87.00732;179.03407	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
24	2-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	8.47	138.031695	138,0306	7.93	137.02331	93.0332;65.0383;94.03648 ;75.02255;136.8616	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
25	Kaempferol 3,7-O-diglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	9.20	610.1533	610,15352	-0.21	609.1461791	609.14618;300.02744;610.14966;151.00279	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
26	Ferulic acid 4-O-glucoside	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	9.43	356.110735	356,11091	-0.49	355.10360	134.03609;178.02621;193.04985;149.05968;137.02322;179.02962	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
27	Chicoric acid	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	9.64	474.0798	474,07985	-0.04	473.072601	161.02336;112.98425;197.04483;68.99432;179.03409	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
28	Myricetin 3-O-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	9.94	464.095480	464,09584	-0.77	463.0884	300.02756;301.034;302.03873;151.00259;463.08832;271.02441	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
29	Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	11.92	188,10486	188,10406	4.25	187.09678	97.06438,95.0489,123.08053,57.03324,125.09581,99.92415,80.02519,61.98692 ,	(S. Motyka <i>et al.</i> ,2023, M. Mróz <i>et al.</i> ,2023)
30	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	12.13	610.189775	610,15342	3.9	609.14624	609.14618;300.0274;301.03473;610.14941;302.0387	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
31	Aureusidin 6-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	13.01	448,100564	448,10084	-0.61	447.093566	314.04333,315.04785 ;447.09344 ;285.04016 ;271.02463 ;286.04712,	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
32	Hesperetin 3'-O-glucuronide	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	13.83	478.111130	478,11122	-0.18	477.10394	314.04333;477.10385;315.04822;478.10712;285.04056	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)

Résultats et discussion

33	rosmarinic acid	C18H16O8		360,08452	360,08471	-0.52	359.077423	161.02336 ;2.99168 ;179.03413 ;135.04398 ;197.04491 ;162.02672 ;133.02831,	(A. Ali <i>et al.</i> ,2021)
34	D-(+)-Tryptophan	C11 H12N2 O2	17.88	204.089878	203,09407	7.9	203.082092	116.04921;74.02328;142.06511;117.05267;192.92816;72.00764;	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
35	Cirsimaritin	C17H14O6	19.18	314,07904	314,07918	-0.44	313.0718994	283.02481,284.02805,297.04031,255.02977,163.00262,298.0466,269.04532,117.03309	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
36	Carnosol	C20 H26 O4	19.78	330,18311	330,1832	-0.27	329.175964	285.18607,286.18945,99.92435,201.09119,115.91936,116.92699,214.09956,	(M.B. Hossain <i>et al.</i> , 2010)
37	DL-Malic acid	C4H6O5	20.78	134.0215	135,90075	-0.06	133.0130920	71.01242;72.99167;59.01234;72.01566;107.03481;65.01327;115.00243	S. Motyka <i>et al.</i> ,2023
38	Petunidin	C16H13O7	12.1	317.066130	317.067120	-3.12	317,064758	302,04193;317,06549;274,04675;153,01828	(M. Zhanna <i>et al.</i> ,2021)
39	Cyanidin	C15H11O6		287.055565	287,11553	-2.45	287,1236572	186,07614;141,01825;130,04997;57,03437;88,03989	(M. Zhanna <i>et al.</i> ,2021)

III.2. Analyse FTIR

La spectroscopie FTIR permet d'obtenir une donnée caractéristique des composés biochimiques présents dans un échantillon en mettant en évidence leurs vibrations moléculaires (Lucarini *et al.*, 2019). La meilleure façon d'identifier les composés phénoliques en utilisant la FTIR était d'examiner la région d'empreinte digitale qui se situait entre 1800 et 700 cm^{-1} .

Les spectres moyens des extraits de *Hammada scoparia* obtenus par ultrasons et par macération sont présentés dans la figure 31.

Les spectres révèlent un pic intense à 1610 cm^{-1} , caractéristique des vibrations des liaisons C=C dans les cycles aromatiques. Un pic significatif, situé entre 1070 et 1000 cm^{-1} avec une intensité marquée à 1045 cm^{-1} , est attribué aux vibrations d'étirement des liaisons –CO (Hamid *et al.*, 2024).

De plus, le pic à 1222 cm^{-1} indique des vibrations de flexion aromatiques (Shaheen *et al.*, 2022), tandis que les pics à 1259 cm^{-1} sont associés aux vibrations d'étirement C-CO-C (Ragavendran *et al.*, 2011).

La bande d'absorption située entre 1700 et 1200 cm^{-1} correspond aux vibrations des liaisons C=C dans les structures aromatiques. Enfin, la bande observée entre 800 et 700 cm^{-1} est attribuée aux déformations des liaisons C-H dans les cycles aromatiques.

Les profils des deux spectres sont très proches et les pics majoritaires sont les mêmes pour les deux extraits avec une différence dans l'intensité d'absorption de chaque pic.

Ces résultats indiquent que les extraits obtenus par les deux méthodes possèdent une composition chimique similaire, avec des variations dans les concentrations de chaque composé. La superposition des spectres permet d'identifier d'éventuelles modifications dans la composition chimique au cours du processus d'extraction, ce qui aide à évaluer l'impact de la méthode d'extraction utilisée.

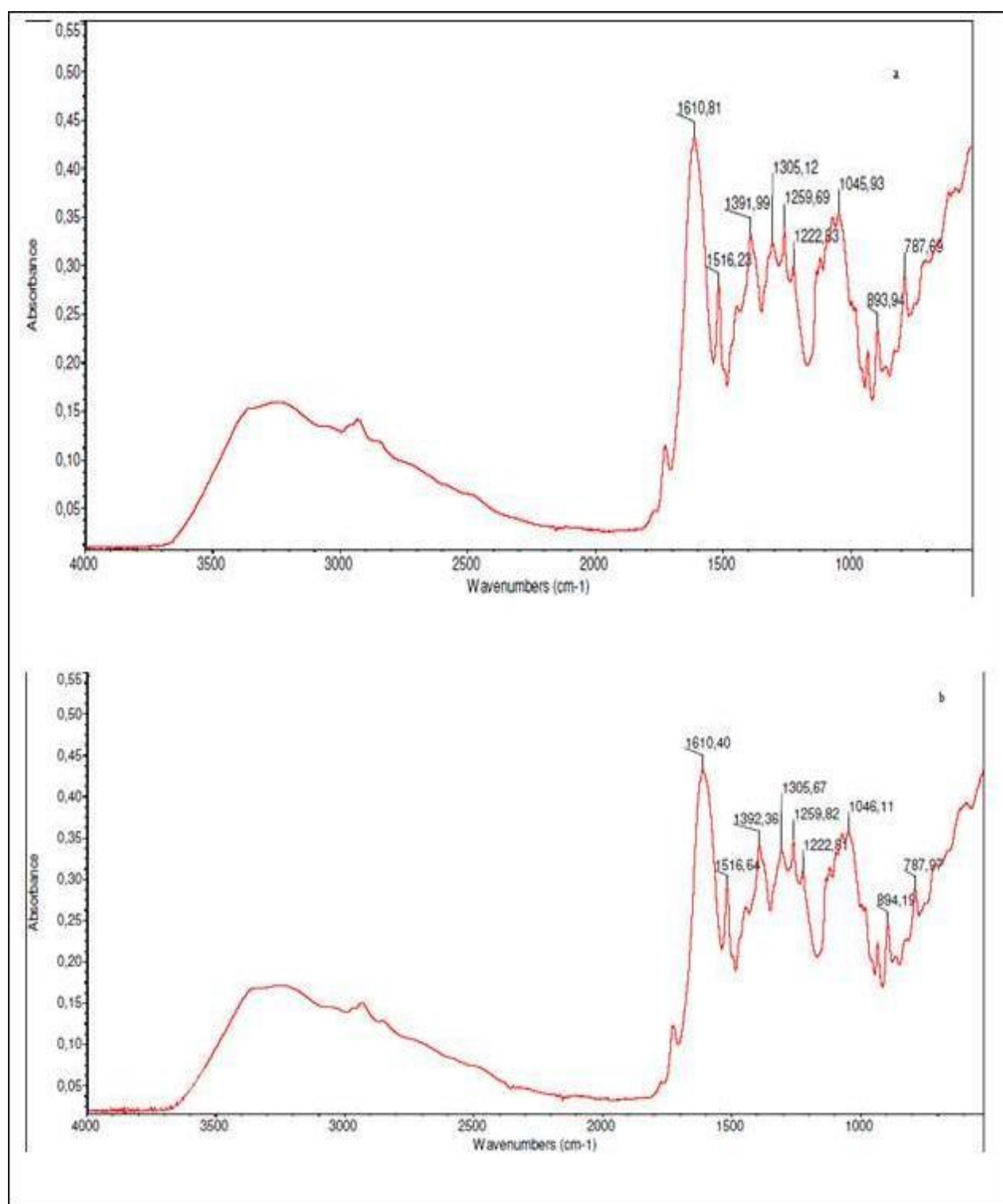


Figure 31 : Spectres des extraits de *H. scoparia* obtenus par la spectroscopie FTIR.

(a) : Spectre de l'extrait obtenu par EAU ;(b) : Spectre de l'extrait obtenu par macération.

Conclusion et perspectives

Ce travail a porté sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir de *Hammada scoparia*, en comparant deux techniques : l'extraction assistée par ultrasons (EAU) et la macération. L'objectif principal était de déterminer les conditions d'extraction les plus efficaces permettant d'obtenir des extraits riches en composés bioactifs, tout en évaluant leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

Les résultats ont clairement mis en évidence l'influence des paramètres d'extraction (type de solvant, concentration, température, durée, rapport solide/liquide, etc.) sur le rendement et la qualité des extraits. Deux extraits optimaux ont été obtenus à l'issue de l'optimisation, puis caractérisés par UHPLC et FTIR, confirmant la richesse en composés phénoliques.

Les tests biologiques ont montré que les extraits de *H. scoparia* possèdent une activité antioxydante significative, démontrée par l'inhibition des radicaux libres DPPH et ABTS ainsi que par leur pouvoir réducteur du fer et des molybdates. L'étude de l'activité antibactérienne a révélé que la ciprofloxacine exerce l'effet inhibiteur le plus fort, suivie par l'extrait obtenu par ultrasons, puis celui issu de la macération, tandis que la tétracycline a montré l'activité la plus faible.

Par ailleurs, les extraits ont montré une efficacité notable dans la protection d'une huile végétale contre l'oxydation, ce qui témoigne de leur potentiel en tant qu'agents antioxydants naturels.

Cependant, des recherches complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'action, évaluer la stabilité des extraits dans différentes formulations, ainsi que leur biodisponibilité. Leur intégration dans des matrices alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques représente une piste prometteuse pour la valorisation de cette plante saharienne.

En somme, ce travail constitue une contribution à la valorisation scientifique et économique de *Hammada scoparia*, une espèce endémique adaptée aux conditions arides, et ouvre la voie à de futures recherches visant à développer des formulations naturelles innovantes à base d'extraits bioactifs.

En perspectives plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés :

- Tester d'autres méthodes d'extraction (extraction assistée par enzymes, micro-ondes, etc.) pour comparer leur efficacité avec l'ultrason et la macération ;
- Approfondir l'évaluation de l'activité antibactérienne contre un panel plus large de bactéries pathogènes ;
- Étudier les effets synergiques des extraits de *Hammada scoparia* avec d'autres composés naturels ou antibiotiques ;
- Tester l'activité anti-inflammatoire et anticancéreuse des extraits par des études *in vitro* et *in vivo*.

References bibliographiques

- ABBAS, M., SAEED, F., ANJUM, F. M., AFZAAL, M., TUFAIL, T., BASHIR, M. S., ISHTIAQ, A., HUSSAIN, S. & SULERIA, H. A. R. 2017. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20, 1689-1699.
- AL-FARSI, M. A. & LEE, C. Y. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food chemistry*, 108, 977-985.
- ALTEMIMI, A., CHOUDHARY, R., WATSON, D. G. & LIGHTFOOT, D. A. 2015. Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics sonochemistry*, 24, 247-255.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S. & ROBARDS, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- BELAUBRE, G. 2014. Approches méthodologiques et expérimentales des phénomènes complexes. *Acta Europæana Systemica*, 4, 143-164.
- BENARADJ, A., BOUCHERIT, H., MEDERBAL, K., BENABDELI, K. & BAGHDADI, D. 2013. Effect of the enclosure on plant diversity of the Hammada scoparia steppe in the Naama steppe courses (Algeria). *J Mater Environ Sci*, 2, 564-71.
- BENINE, C., DJAHRA, A. B., TOUHAMI, L. A. & REBIAI, A. 2023. A systematic review on Hammada scoparia medicinal plant: Phytochemicals, traditional uses and biological activities. *International Journal of Secondary Metabolite*, 10, 137-146.
- BENKHERARA, S., BORDJIBA, O., HARRAT, S. & DJAHRA, A. B. 2021. Antidiabetic Potential and Chemical Constituents of Haloxylon scoparium Aerial Part, An Endemic Plant from Southeastern Algeria. *International Journal of Secondary Metabolite*, 8, 398-413.
- BENKRIEF, R., BRUM-BOUSQUET, M., TILLEQUIN, F. & KOCH, M. Alkaloids and flavonoid from aerial parts of Hammada articulata ssp. scoparia. *Annales pharmaceutiques françaises*, 1990. 219- 224.
- BENMEZIANE, F., DJAMAI, R., CADOT, Y. & SERIDI, R. 2014. Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (Vitis Vinifera). *International Food Research Journal*, 21.
- BENNICK, A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 184-196.
- BEY, M. B., LOUAILECHE, H. & ZEMOURI, S. 2013. Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity of light and dark dried fig (Ficus carica L.) varieties. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1613-1619.
- BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E., FABISZEWSKA, A. & ZIENIUK, B. 2018. Phenolic acids derivatives- biotechnological methods of synthesis and bioactivity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19, 1098-1113.
- BIJOY MOKTAN, B. M., JAYATI SAHA, J. S. & SARKAR, P. 2008. Antioxidant activities

of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema.

- BLOUIN, J., LLORCA, L., MONTREAU, F. & DUFOUR, J. 1972. Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. *OENO One*, 6, 405-413.
- BOEING, J. S., BARIZÃO, É. O., E SILVA, B. C., MONTANHER, P. F., DE CINQUE ALMEIDA, V. & VISENTAINER, J. V. 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry central journal*, 8, 1-9.
- BÖHMER-MAAS, B. W., OTERO, D. M., ZAMBIAZI, R. C. & ARANHA, B. C. 2020. Optimization of the extraction of phenolic compounds from olive pomace using response surface methodology. *Revista Ceres*, 67, 181-190.
- BOUARAB CHIBANE, L., DEGRAEVE, P., FERHOUT, H., BOUAJILA, J. & OULAHAL, N. 2019. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1457-1474.
- BOUAZIZ, A., MHALLA, D., ZOUARI, I., JLAIEL, L., TOUNSI, S., JARRAYA, R. & TRIGUI, M. 2016. Antibacterial and antioxidant activities of Hammada scoparia extracts and its major purified alkaloids. *South African Journal of Botany*, 105, 89-96.
- BOUCHERIT, H., BENABDELI, K. & BENARADJ, A. 2017. Caractérisation floristique de la steppe a Hammada scoparia dans l'atlas Saharien oranais (Naama-Algérie). *Revue Agrobiologia*, 7, 483-490.
- BOUCHERIT, H., BENABDELI, K., BENARADJ, A. & BOUGHALEM, M. 2018. Phytoécologie de "Hammada scoparia" dans la région de Naâma (Algérie occidentale). *Botanica Complutensis*, 42, 93.
- BOUROGAA, E., BERTRAND, J., DESPEAUX, M., JARRAYA, R., FABRE, N., PAYRASTRE, L., DEMUR, C., FOURNIÉ, J.-J., DAMAK, M. & EL FEKI, A. 2011. Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leukemia research*, 35, 1093-1101.
- BOUROGAA, E., JARRAYA, R. M., NCIRI, R., DAMAK, M. & ELFEKI, A. 2014. Protective effects of aqueous extract of Hammada scoparia against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. *Toxicology and Industrial Health*, 30, 113-122.
- BOUROGAA, E., NCIRI, R., MEZGHANI-JARRAYA, R., RACAUD-SULTAN, C., DAMAK, M. & EL FEKI, A. 2013. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Hammada scoparia against ethanol-induced liver injury in rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 69, 227-237.
- BOX, G. E. & WILSON, K. B. 1992. On the experimental attainment of optimum conditions. *Breakthroughs in statistics: methodology and distribution*. Springer.
- BRUNETON, J. & PHARMACOGNOSIE, P. 1999. Plantes médicinales. Paris: Lavoisier Technique et Documentation, 405.
- BUZZINI, P., ARAPITSAS, P., GORETTI, M., BRANDA, E., TURCHETTI, B., PINELLI, P., IERI, F. & ROMANI, A. 2008. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8, 1179-1187.
- CARUSO, M. C., GALGANO, F., COLANGELO, M. A., CONDELLI, N., SCARPA, T.,

- TOLVE, R. & FAVATI, F. 2017. Evaluation of the oxidative stability of bakery products by OXITEST method and sensory analysis. *European Food Research and Technology*, 243, 1183-1191.
- CHAALAL, M., TOUATI, N. & LOUAILECHE, H. 2012. Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta botanica gallica*, 159, 467-475.
- CHAO, H. C., NAJAA, H., VILLAREAL, M. O., KSOURI, R., HAN, J., NEFFATI, M. & ISODA, H. 2013. A rthrophytum scoparium inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B 16 melanoma cells. *Experimental dermatology*, 22, 131-136.
- CHEHMA, A. & DJEBAR, M. R. 2008. Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien: distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 17, 36-45.
- CRAVOTTO, G. & CINTAS, P. 2007. Extraction of flavourings from natural sources. *Modifying flavour in food*. Elsevier.
- DAHMOUNE, F., NAYAK, B., MOUSSI, K., REMINI, H. & MADANI, K. 2015. Optimization of microwave- assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves. *Food chemistry*, 166, 585-595.
- DE LEON, A., KIDD, M. & CORZO, A. 2010. Box-Behnken Design: alternative multivariate design in broiler nutrition research. *World's Poultry Science Journal*, 66, 699-706.
- DEEPIKA & MAURYA, P. K. 2022. Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules*, 27, 2498.
- DERBEL, S. & GHEDIRA, K. 2005. Phytonutriments and their impact on health. *Phytothérapie*, 3, 28- 34.
- DIAS, A. L. B., DE AGUIAR, A. C. & ROSTAGNO, M. A. 2021. Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105584.
- DRIOICHEA, A., BENHLIMA, N., KHARCHOUFA, S., EL-MAKHOUKHI, F., MEHANNED, S., ADADI, I., AAZIZ, H., ELOMBO, F. K., GRESSIER, B. & ETO, B. 2019. Antimicrobial and antiradical properties of Hammada scoparia (POMEL) iljin. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 16, 1-14.
- DUDONNE, S., VITRAC, X., COUTIERE, P., WOILLEZ, M. & MÉRILLON, J.-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 1768-1774.
- DURAZZO, A., LUCARINI, M., SOUTO, E. B., CICALA, C., CAIAZZO, E., IZZO, A. A., NOVELLINO, E. & SANTINI, A. 2019. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33, 2221-2243.
- DZAH, C. S., DUAN, Y., ZHANG, H., WEN, C., ZHANG, J., CHEN, G. & MA, H. 2020. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food bioscience*, 35, 100547.
- EBRINGEROVÁ, A. & HROMÁDKOVÁ, Z. 2010. An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central European Journal of Chemistry*, 8, 243-257.
- ECEVIT, K., BARROS, A. A., SILVA, J. M. & REIS, R. L. 2022. Preventing Microbial

- Infections with Natural Phenolic Compounds. *Future Pharmacology*, 2, 460-498.
- EL-SHAZLY, A. & WINK, M. 2003. Tetrahydroisoquinoline and β -carboline alkaloids from *Haloxylon articulatum* (Cav.) Bunge (Chenopodiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58, 477-480.
- EZZEDDINE, B., RAOUDHA, J. M., MOHAMED, D. & ABDELFATTAH, E. F. 2017. Therapeutic efficacy of Hammada scoparia extract against ethanol induced renal dysfunction in Wistar rats. *Journal of Food Biochemistry*, 41, e12307.
- FADEL, O. 2012. *Étude des propriétés interfaciales de polyphénols modèles: compréhension des mécanismes d'action au niveau membranaire*. Compiègne.
- FADIL, M., BOUSTA, D., EL OUALI LALAMI, A., LACHKAR, M. & FARAH, A. 2021. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: optimization using response surface methodology. *Journal of Chemistry*, 2021.
- FELLOUS, A. 2003. La station d'élevage de la Gazelle dorcas (Gazelle dorcas) dans le Sud-Ouest algérien. *IIème Séminaire Antilopes Sahelo Saharienne, Agence Nationale pour la Conservation de la Nature, Agadir*.
- GALVEZ, J. G., RIEDL, B. & CONNER, A. 1997. Analytical studies on tara tannins.
- GEORGE, A. L. & BENNETT, A. 2005. *Case studies and theory development in the social sciences*, mit Press.
- GHAFOOR, K., CHOI, Y. H., JEON, J. Y. & JO, I. H. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 4988-4994.
- GOUPY, J. 1999. *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*, Dunod.
- GOUPY, J. 2006. *Plans d'expériences*, Ed. Techniques Ingénieur.
- GÜLÇİN, İ., OKTAY, M., KİREÇCİ, E. & KÜFREVİOĞLU, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*, 83, 371- 382.
- GÜLÇİN, İ., TEL, A. Z., GÖREN, A. C., TASLIMI, P. & ALWASEL, S. H. 2019. Sage (*Salvia pilifera*): determination of its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Journal of food measurement and characterization*, 13, 2062-2074.
- HACHANI, S., BOUKHALKHAL, S., AHMED, Z. B., HARRAT, M., SILVA, A. M. & YOUSFI, M. 2020. Exploiting response surface methodology (rsm) as a novel approach for the optimization of phenolics and antioxidant activity of date palm fruit.
- HADIDI, M., LIÑÁN-ATERO, R., TARAHI, M., CHRISTODOULOU, M. C. & AGHABABAEI, F. 2024. The potential health benefits of gallic acid: Therapeutic and food applications. *Antioxidants*, 13, 1001.
- HAM, M. & JESWIET, J. 2007. Single point incremental forming limits using a boxbehnken design of experiment. *Key engineering materials*, 344, 629-636.
- HAMID, S., OUKIL, N. F., MOUSSA, H., DJIHAD, N., MRÓZ, M., KUSZNIEREWICZ, B., ATTIA, A., DJENADI, K., MAHDJOUB, M. M. & BOUHENNA, M. M. 2024. Chemical and biological characterization of *Ocimum basilicum* L. phenolic extract and essential oil derived through ultrasound and microwave-assisted extraction techniques.

Food Bioscience, 60, 104359.

- HAN, X., SHEN, T. & LOU, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International journal of molecular sciences*, 8, 950-988.
- HANDA, S. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1, 21-40.
- HANNA, H. 2010. *Plans d'expérience pour mélanges à deux niveaux et facteurs externes*. Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- HIGUCHI, J., FORTUNATO, G., WOŹNIAK, B., CHODARA, A., DOMASCHKE, S., MĘCZYŃSKA-WIELGOSZ, S., KRUSZEWSKI, M., DOMMANN, A. & ŁOJKOWSKI, W. 2019. Polymer membranes sonocoated and electrosprayed with nano-hydroxyapatite for periodontal tissues regeneration. *Nanomaterials*, 9, 1625.
- HOSSAIN, M. B., BRUNTON, N. P., PATRAS, A., TIWARI, B., O'DONNELL, C., MARTIN-DIANA, A. B. & BARRY-RYAN, C. 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19, 582-590.
- JI, J.-B., LU, X.-H., CAI, M.-Q. & XU, Z.-C. 2006. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 455-462.
- KALILI, K. M. & DE VILLIERS, A. 2011. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of separation science*, 34, 854-876.
- KHEMAKHEM, I., AHMAD-QASEM, M. H., CATALÁN, E. B., MICOL, V., GARCÍA-PÉREZ, J. V., AYADI, M. A. & BOUAZIZ, M. 2017. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 466- 473.
- KHODDAMI, A., WILKES, M. A. & ROBERTS, T. H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- KIM, J.-S., KWON, Y.-S., SA, Y.-J. & KIM, M.-J. 2011. Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 138-144.
- KONG, K. W., ISMAIL, A. R., TAN, S. T., NAGENDRA PRASAD, K. M. & ISMAIL, A. 2010. Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1739-1745.
- KUHNERT, N. 2013. Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe: In Garten, Industrie, Medizin und Nahrung. *Chemie in unserer Zeit*, 47, 80-91.
- KUSZNIEREWICZ, B., MRÓZ, M., KOSS-MIKOŁAJCZYK, I. & NAMIEŚNIK, J. 2021. Comparative evaluation of different methods for determining phytochemicals and antioxidant activity in products containing betalains–Verification of beetroot samples. *Food Chemistry*, 362, 130132.
- KUŹMA, P., DRUŻYŃSKA, B. & OBIEDZIŃSKI, M. 2014. Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum*

- crispum). *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*, 13, 145-154.
- LABIENIEC, M., GABRYELAK, T. & FALCIONI, G. 2003. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 539, 19-28.
- LAMBRAKI, M., MARAKIS, S. & ROUSSOS, S. 1994. Effect of temperature and aeration flow on carob tannin degradation by *Aspergillus carbonarius* in solid state fermentation system. *Micol Neotrop Aplic*, 7, 23-34.
- LANDAU, S., DVASH, L., DECANDIA, M., CABIDDU, A., SHAPIRO, F., MOLLE, G. & SILANIKOVE, N. 2004. Determination of poly (ethylene glycol)-binding to browse foliage, as an assay of tannin, by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 638- 642.
- LATTANZIO, V., LATTANZIO, V. M. & CARDINALI, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661, 23-67.
- LEFEBVRE, T., DESTANDAU, E. & LESELLIER, E. 2021. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461770.
- LI, H., PORDESIMO, L. & WEISS, J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food research international*, 37, 731-738.
- LINDER, R. 2005. *Les plans d'expériences: un outil indispensable à l'expérimentateur*, Presses des Ponts.
- LUCARINI, M., DURAZZO, A., KIEFER, J., SANTINI, A., LOMBARDI-BOCCIA, G., SOUTO, E. B., ROMANI, A., LAMPE, A., FERRARI NICOLI, S. & GABRIELLI, P. 2019. Grape seeds: chromatographic profile of fatty acids and phenolic compounds and qualitative analysis by FTIR-ATR spectroscopy. *Foods*, 9, 10.
- MACHEIX, J.-J., FLEURIET, A. & JAY-ALLEMAND, C. 2005. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, EPFL Press.
- MACHEIX, J., FLEURIET, A. & SARNI-MANCHADO, P. 2006. Composés phénoliques dans la plante- Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris*, 390-399.
- MARTIN, S. & ANDRIANTSITOHAINA, R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 2002. Elsevier, 304-315.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J. & ROS, G. 2000. Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50, 5-18.
- MARTINI, N. & ELOFF, J. 1998. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 62, 255-263.
- MELON, M. 1996. *Caracterisation de matériaux poreux par ultrasons de basses fréquences (20 khz- 500 khz)*. Le Mans.
- MENAT, É. 2006. Les polyphénols de thé, du vin et du cacao. *Phytothérapie*, 4.
- METROUH-AMIR, H., DUARTE, C. M. & MAIZA, F. 2015. Solvent effect on total phenolic

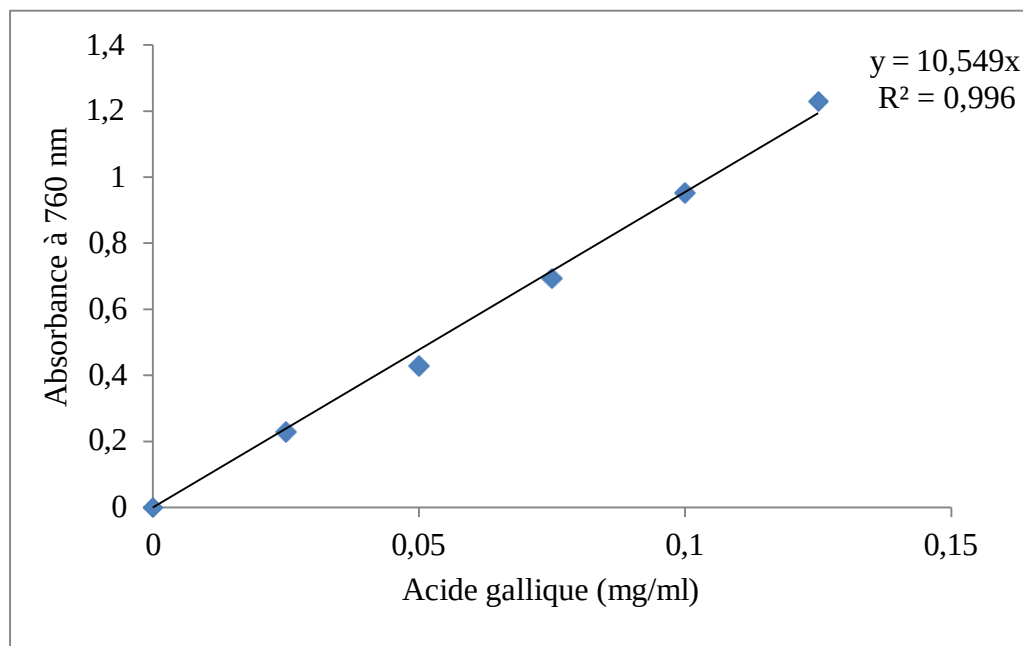
- contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial crops and products*, 67, 249-256.
- MEZGHANI-JARRAYA, R., HAMMAMI, H., AYADI, A. & DAMAK, M. 2009. Molluscicidal activity of Hammada scoparia (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against *Galba truncatula*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1035-1038.
- MOLYNEUX, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26, 211-219.
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054, 95-111.
- NARENDERAN, S., MEYYANATHAN, S. & KARRI, V. V. S. R. 2019. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. *Food chemistry*, 289, 384-395.
- NOUNAH, I., HAJIB, A., OUBIHI, A., HICHAM, H., GHARBY, S., KARTAH, B. E., CHARROUF, Z. & BOUGRIN, K. 2019a. Phytochemical screening and biological activity of leaves and stems extract of hammada scoparia. *Moroccan Journal of Chemistry*, 7, 7-1 (2019) 001-009.
- NSEMI, F. M. 2010. *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques*. Université Paul Verlaine-Metz.
- OULD EL HADJ, M., HADJ-MAHAMMED, M. & ZABEIROU, H. 2003. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est).
- 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.
- PAVLÍKOVÁ, N. 2022. Caffeic acid and diseases—Mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 588.
- PLYUTA, V., ZAITSEVA, J., LOBAKOVA, E., ZAGOSKINA, N., KUZNETSOV, A. & KHMEL, I. 2013. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 121, 1073-1081.
- PRASAD, K. N., KONG, K. W., RAMANAN, R. N., AZLAN, A. & ISMAIL, A. 2012. Determination and optimization of flavonoid and extract yield from brown mango using response surface methodology. *Separation Science and Technology*, 47, 73-80.
- PRATAMA, H. B. & SUPIJO, M. C. 2020. Experimental design and response surface method in geothermal energy: a comprehensive study in probabilistic resource assessment. *Geothermics*, 87, 101869.
- PRIETO, P., PINEDA, M. & AGUILAR, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269, 337-341.
- RAGAVENDRAN, P., SOPHIA, D., ARUL RAJ, C. & GOPALAKRISHNAN, V. 2011. Functional group analysis of various extracts of *Aerva lanata* (L.) by FTIR spectrum. *Pharmacologyonline*, 1, 358-364.
- RAJBHAR, K., DAWDA, H. & MUKUNDAN, U. 2015. Polyphenols: Methods of extraction.

Sci. Revs. Chem. Commun, 5, 1-6.

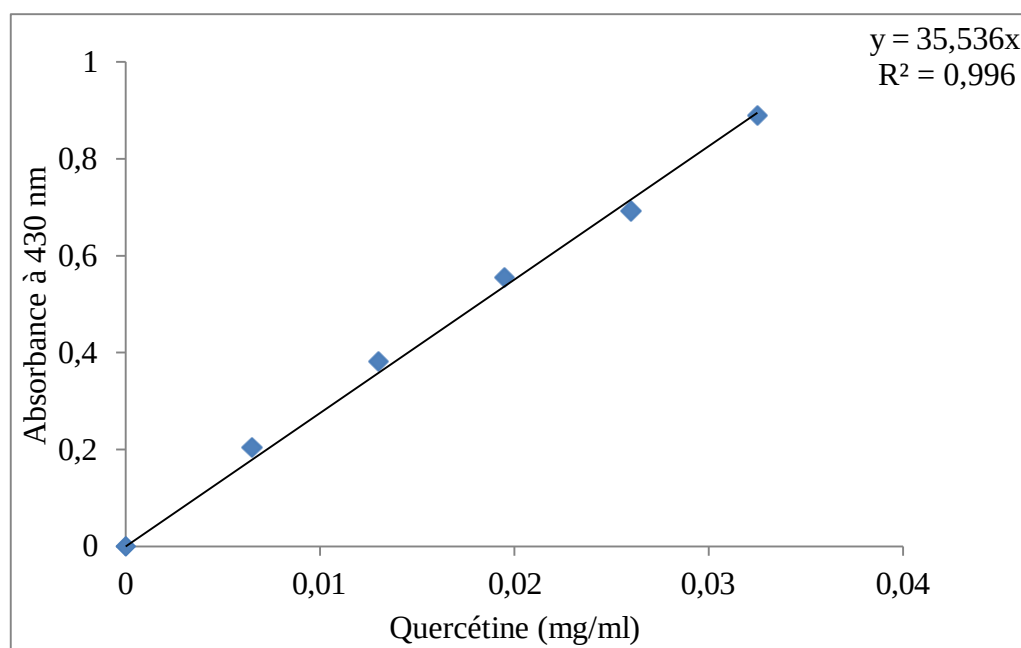
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. & RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.
- RIBEREAU-GAYON, P. 1968. Notions generales sur les composés phenoliques, methodes generales d'études des composés phenoliques. *Les composés phénoliques des végétaux*.
- RUBANZA, C., SHEM, M., OTSYINA, R., BAKENGESA, S., ICHINOHE, T. & FUJIHARA, T. 2005. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 129-142.
- SAIDI, S. A., BOUROGÂA, E., BOUAZIZ, A., MONGI, S., CHAABEN, R., JAMOSSI, K., MEZGHANI-JARRAYA, R., VAN PELT, J. & EL-FEKI, A. 2015. Protective effects of Hammada scoparia flavonoid-enriched fraction on liver injury induced by warm ischemia/reperfusion. *Pharmaceutical biology*, 53, 1810-1817.
- SANTOS-BUELGA, C., GONZALEZ-MANZANO, S., DUEÑAS, M. & GONZALEZ-PARAMAS, A. M. 2012. Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.
- SANTOS-SÁNCHEZ, N. F., SALAS-CORONADO, R., HERNÁNDEZ-CARLOS, B. & VILLANUEVA-CAÑONGO, C. 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant physiological aspects of phenolic compounds*. IntechOpen.
- SCANO, P. 2021. Characterization of the medium infrared spectra of polyphenols of red and white wines by integrating FT IR and UV-Vis spectral data. *Lwt*, 147, 111604.
- SEIDI, S. & YAMINI, Y. 2012. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. *Open Chemistry*, 10, 938-976.
- SERRA BONVEHÍ, J., SOLIVA TORRENTÓ, M. & CENTELLES LORENTE, E. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 1848-1853.
- SHOTIPRUK, A., KAUFMAN, P. B. & WANG, H. Y. 2001. Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable menthaxpiperata using ultrasonic extraction. *Biotechnology progress*, 17, 924-928.
- SILANIKOVE, N., GILBOA, N. & NITSAN, Z. 2001. Effect of polyethylene glycol on rumen volume and retention time of liquid and particulate matter along the digestive tract in goats fed tannin- rich carob leaves (*Ceratonia siliqua*). *Small Ruminant Research*, 40, 95-99.
- SILVA, E., ROGEZ, H. & LARONDELLE, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381- 387.
- SOVA, M. & SASO, L. 2020. Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. *Nutrients*, 12, 2190.
- SPIGNO, G. & DE FAVERI, D. M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of food engineering*, 93, 210-217.
- TAÏR, K., KHAROUBI, O., TAÏR, O. A., HELLAL, N., BENYETTOU, I. & AOUES, A. 2016. Aluminium- induced acute neurotoxicity in rats: Treatment with aqueous extract of

- Arthrophytum (Hammada scoparia). *Journal of acute disease*, 5, 470-482.
- TENG, H., LEE, W. Y. & CHOI, Y. H. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polyphenols, anthocyanins, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Food analytical methods*, 7, 1536-1545.
- Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., & Liu, L. (2017). Antibacterial activity of polyphenols: Structure–activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules*, 22, 1913.
- Yusoff, I. M., Taher, Z. M., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157, 111268.
- Zakaria, F., Tan, J.-K., Faudzi, S. M. M., Rahman, M. B. A., & Ashari, S. E. (2021). Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 81, 105851.
- Zeidan, R., Oran, S., Khleifat, K., & Matar, S. (2013). Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 7, 5114–5118.
- Zemouri-Alioui, S., Louaileche, H., & George, B. (2018). Effects of ultrasound-assisted extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) leaves. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology*, 42, 96–108.

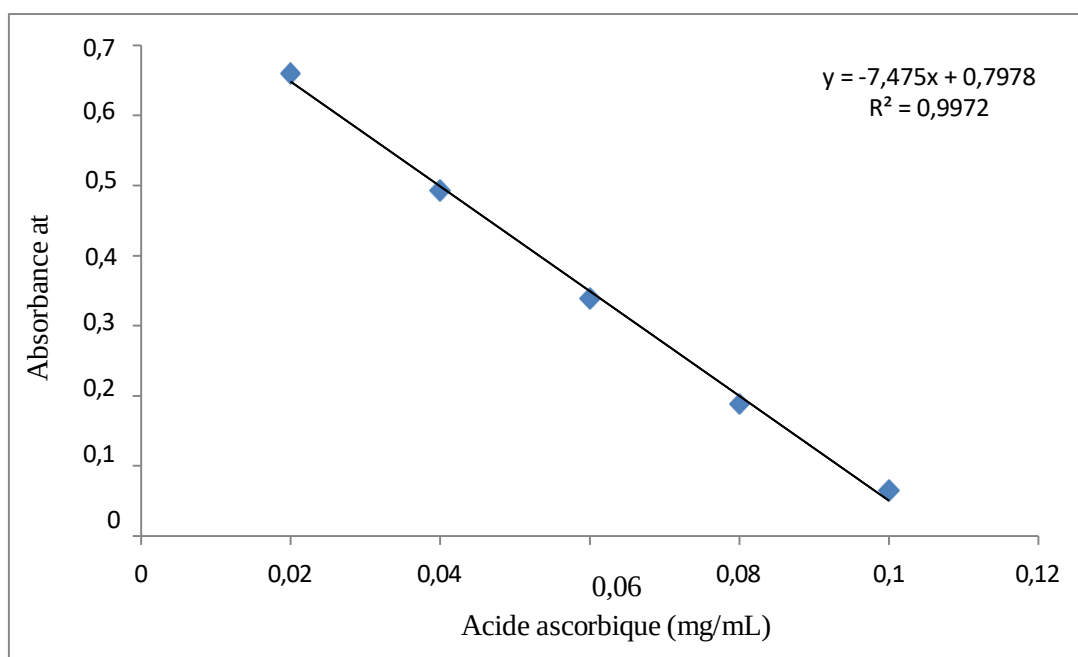
Annexes



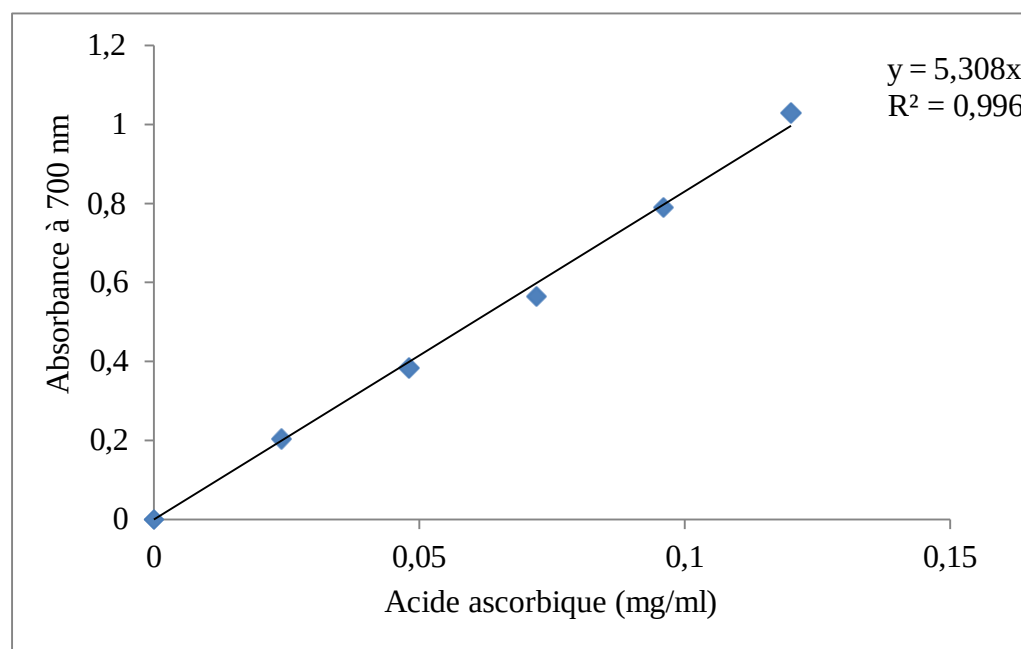
Annexe I : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques.



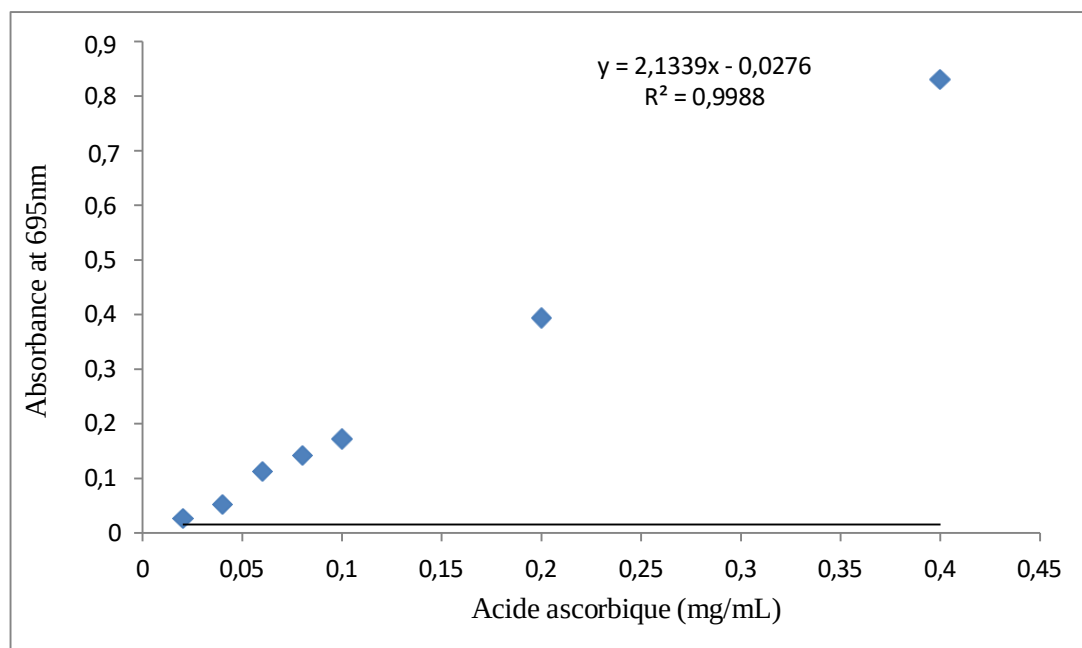
Annexe II : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.



Annexe III : Courbe de l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH.



Annexe IV: Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur.



Annexe V: Courbe d'étalonnage de l'activité réductrice du molybdate.

Résumé

La présente étude a été consacrée à la détermination de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux et sur l'activité anti-radicalaire de *Hammada scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse (MSR) et du plan de Box-Behnken (BBD). Les extraits obtenus avec les paramètres optimaux ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante en utilisant plusieurs tests, l'activité antibactérienne contre plusieurs souches, et la capacité des extraits de la plante étudiée à augmenter la stabilité à l'oxydation d'une huile végétale. Enfin, une caractérisation des composés phénoliques des extraits optimisés a été réalisée par chromatographie liquide en tandem haute résolution-spectrométrie de masse (UHPLC MS/MS) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les résultats obtenus ont révélé que les extraits de *H. scoparia* ont permis d'inhiber les radicaux libres DPPH et ABTS et de réduire le fer et le molybdates d'une manière significative. Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la Ciprofloxacine a exercé un effet antibactérien plus important que celui exercé par l'extrait obtenu par EAU, puis celui de l'extrait préparé par macération, et enfin celui exercé par la Tétracycline (TE). Concernant l'étude de la stabilité à l'oxydation d'une huile végétale, les extraits de *H. scoparia* ont montré une efficacité significative à protéger les lipides contre l'oxydation.

Cette recherche contribue à une meilleure compréhension des conditions optimales d'extraction des polyphénols et à la valorisation des ressources naturelles sahariennes.

Mot clés : *Hammada scoparia*, Optimisation, Activités biologiques, UHPLC MS/MS, FTIR.

Abstract

The present study focused on determining the effect of various extraction parameters on the total polyphenol content and the radical scavenging activity of *Hammada scoparia*, using response surface methodology (RSM) and the Box-Behnken design (BBD). Extracts obtained under optimal conditions were used to evaluate antioxidant activity through multiple assays, antibacterial activity against several bacterial strains, and the ability of the plant extracts to enhance the oxidative stability of a vegetable oil. Finally, the characterization of polyphenolic compounds in the optimized extracts was performed using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

The results revealed that *H. scoparia* extracts significantly inhibited DPPH and ABTS free radicals and exhibited strong ferric and molybdate reducing power. The antibacterial activity results showed that ciprofloxacin exhibited a stronger antibacterial effect than the extract obtained by ultrasound-assisted extraction (UAE), followed by the maceration extract, and then tetracycline (TE). Regarding the oxidative stability of vegetable oil, *H. scoparia* extracts demonstrated significant efficacy in protecting lipids from oxidation.

This research contributes to a better understanding of the optimal conditions for polyphenol extraction and highlights the valorization of Saharan natural resources.

Keywords: *Hammada scoparia*, Optimization, Biological Activities, UHPLC-MS/MS, FTIR.

المخلص

تتمحور هذه الدراسة حول تحديد تأثير مختلف معايير الاستخراج على المحتوى الكلي من البوليفينول والنشاط المضاد للجذور الحرة لنبات *Hammada scoparia*، وذلك باستخدام منهجية استجابة السطح (RSM) وتصميم (BBD) Box-Behnken تم استخدام المستخلصات المحضرة وفقاً للظروف المثلى لتقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبارات متعددة، والنشاط المضاد للبكتيريا ضد عدة سلالات بكتيرية، بالإضافة إلى قدرة مستخلصات النبات على تحسين استقرار الأكسدي لزيت نباتي. وأخيراً، تم تحليل المركبات الفينولية في المستخلصات المثلى باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مقترنة بمطياف الكتلة (UHPLC-MS/MS) وتقنية التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه (FTIR).

أظهرت النتائج أن مستخلصات *H. scoparia* تمتلك قدرة كبيرة على تثبيط الجذور الحرة DPPH و ABTS وتقليل الحديد والموليبدات بشكل ملحوظ كما بينت النتائج أن لسيروفوروكساسين أظهر تأثيراً مضاداً للبكتيريا أقوى من المستخلص المستخرج بتقنية الاستخراج بالموجات فوق الصوتية (UAE)، يليه المستخلص المحضر بطريقة النقع، ثم التتراسيكلين (TE). أما فيما يخص استقرار الزيت النباتي ضد الأكسدة، فقد أظهرت مستخلصات *H. scoparia* فعالية كبيرة في حماية الدهون من الأكسدة تساهم هذه الدراسة في تحسين فهم الظروف المثلى لاستخراج البوليفينولات وتبرز أهمية تثمين الموارد الطبيعية الصحراوية.

الكلمات المفتاحية: *Hammada scoparia*؛ تحسين الاستخراج، الأنشطة البيولوجية، UHPLC-MS/MS، FTIR.



Study of the effect of ultrasonic-assisted extraction based on the Box-Behnken design on the phenolic compound content of *Hammada scoparia* leaves and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities

Meriam Salemi¹,  Hassiba Metrouh-Amir^{2*}, Nadir Amir^{3,4}, Hamza Moussa⁵

¹Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique, 06000 Bejaia, Algeria

²Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biochimie Appliquée, 06000 Bejaia, Algeria

³Université de Bejaia, Laboratoire de maitrise des énergies renouvelables, équipe biomasse et environnement, faculté de technologie, 06000 Bejaia, Algeria

⁴Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, 06000 Bejaia, Algeria

⁵Université de Bouira, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et sciences de la terre, Département de Biologie, 10000 Bouira, Algeria

ARTICLE INFO

TYPE: Original scientific paper

<https://doi.org/10.17508/CJFST.2024.16.2.04>

*CORRESPONDENCE

Hassiba Metrouh-Amir

✉ hassiba.metrouh@univ-bejaia.dz

ARTICLE HISTORY

Received: October 3, 2024

Accepted: November 19, 2024

CITATION

Salemi M, Metrouh-Amir H, Amir N, Moussa H. Study of the effect of ultrasonic-assisted extraction based on the Box-Behnken design on the phenolic compound content of *Hammada scoparia* leaves and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. Croatian Journal of Food Science and Technology (2024) 16 (2) 218 - 235



COPYRIGHT: © 2024 by the author(s). This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ABSTRACT

Hammada scoparia is a plant of the Chenopodiaceae family. It represents a potential source of polyphenols and is used in traditional medicine in many countries. This research was carried out to evaluate the influence of ultrasound-assisted extraction parameters (ethanol concentration (30-70%), temperature (20-60 °C), time (10-30 min), and solvent-to-solid ratio (30-60 v/w) on total phenolic compound and total flavonoid contents, as well as the antioxidant capacity (DPPH assay) of *H. scoparia*, using the response surface methodology (RSM) approach and a Box-Behnken design (BBD). The obtained optimal extract of *H. scoparia* was used to evaluate ferric and molybdate reducing powers and ABTS scavenging activity as well as the antibacterial activity. Based on the BBD results, the extraction conditions, which gave the highest contents of phenolic compounds and flavonoids and the greatest DPPH activity, are: an extraction time of 30 minutes, a temperature of 20 °C, an ethanol concentration of 46.95%, and a liquid-to-solid ratio of 60 mL/g. The results of the determination of antioxidant activity revealed that *H. scoparia* extract inhibited free radicals DPPH[•] and ABTS[•], and reduced ferric and molybdate through different mechanisms. Concerning the antibacterial activity, the results obtained showed that *H. scoparia* extract was found to be active against all tested bacterial strains, with the exception of *Escherichia coli* ATCC 25922. *H. scoparia* optimal extract could be a promising source for the pharmaceutical industry and food applications.

KEYWORDS

Hammada scoparia; ultrasound assisted extraction; phenolic compounds; antioxidant activity; antibacterial activity; response surface methodology

KEY CONTRIBUTION

Evaluation of the effect of ultrasound-assisted extraction conditions on total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of *Hammada scoparia*. The influence of ethanol concentration (%), time (min), solvent-to-solid ratio (mL/g), and temperature (°C) was tested. Response surface methodology (RSM) was employed to design experimental conditions. Determination of the antioxidant and antibacterial capacities of the extract obtained under optimal extraction conditions.

Introduction

Hammada scoparia (Pomel) Iljin, or *Haloxylon scoparium* (Pomel) is a medicinal plant commonly found in desert areas. It is considered to be a source of potentially therapeutic agents, and it exhibits biological and pharmacological activities (Bouaziz et al., 2016; Saidi et al., 2015).

Phytochemical screening of the aerial parts of *H. scoparia* revealed the presence of flavonoids, tannins, saponins, anthocyanins, alkaloids, cardenolides, and leucoanthocyanins (Benkherara et al., 2021). These compounds may have potential applications in the treatment of various diseases (Bouaziz et al., 2016; Eleroui et al., 2021; Taïr et al., 2016). *H. scoparia* has been shown to possess larvicidal, anti-cancer, and anti-plasmodial properties (Bouaziz et al., 2016). Previous research has also indicated that *H. scoparia* aqueous extract exhibits molluscicidal properties and has been used as an antileukemic agent (Eleroui et al., 2021). In traditional medicine, the leaves of *H. scoparia* are used as an antiseptic in wound healing (Bouaziz et al., 2016) and preventing liver disease, inflammation, and obesity (Bourogaa et al., 2013).

In recent years, the search for bioactive compounds, particularly phenolic compounds, from natural sources such as plants, has increased considerably (Ghafoor et al., 2009). Phenolic compounds, which are a diverse group of secondary metabolites found in a wide range of plant species, have been recognized as potent antioxidants (Plyuta et al., 2013) and crucial components in the prevention of various diseases (Gülçin et al., 2019). There is a clear correlation between the antioxidant activity and the total phenolic concentration, indicating that polyphenols play a significant role in the scavenging of free radicals (Hemmami et al., 2023). Additionally, these natural compounds have the ability to interact with microbial cells through various mechanisms, making them highly effective in combating the prevalence of drug-resistant strains (Ecevit et al., 2022).

Extraction is a crucial step in obtaining phytochemicals and has been the focus of recent research. Recently, an interest in the development of green extraction processes has been growing, which aim to reduce extraction time, minimize the use of harmful solvents, and lower energy consumption (Chupin et al., 2015). The pharmaceutical and food industries are increasingly adopting alternative extraction methods, particularly ultrasonic, to obtain bioactive molecules (Wani and Uppaluri, 2022).

Ultrasound Assisted Extraction (UAE) is an efficient extraction method characterized by its ease of use, scalability, higher reproducibility, shorter processing time, and reduced energy and solvent consumption. Due to this, UAE is widely used for extracting bioactive components in the food and

pharmaceutical industries (Wani and Uppaluri, 2022). This process has been shown to significantly enhance the extraction of phenolic compounds from various plant matrices (D'Alessandro et al., 2014). The application of statistical techniques for the enhancement of analytical methodologies has been progressively gaining ground. These methods, collectively known as multivariate analysis, offer several advantages, including the reduction in the number of required experiments, the minimization of reagent consumption, and the decrease in laboratory workload (Ferreira et al., 2007).

Response surface methodology (RSM) is a widely used statistical tool for assessing the effects of multiple factors and their interactions on response variables. RSM requires fewer experimental trials to evaluate multiple parameters and their interactions, making it a time-efficient and cost-effective approach (Aybastier and Demir, 2010; Aybastier et al., 2013).

The central composite design (CCD) and the Box-Behnken design (BBD) are two of the most frequently employed response surface methodology (RSM) designs for conducting a wide range of experiments. The BBD, which is a spherical and revolving design, is often used for optimizing chemical and physical processes due to its efficient design and reliable outcomes (Aybastier et al., 2013).

The use of ultrasound for the extraction of phenolic compounds from *H. scoparia* has not been documented in previous studies. Therefore, the objective of this research is to optimize ultrasound-assisted extraction parameters for total phenolic compounds and DPPH scavenging activity of this plant, using response surface methodology (RSM) approach and a Box-Behnken design (BBD). The extract obtained under the optimal extraction parameters has been used to assess other antioxidant activities, using various essays, and antibacterial activity against several bacterial strains.

Materials and methods

Plant material

The leaves of *H. scoparia* were collected from Oued souf region, wilaya d'El Oued (Algeria) during March 2021. *H. scoparia* plant was identified and authenticated by National higher agronomic school (NHAS) in Algiers, Algeria. The selected plant material was washed and then dried at 40 °C, and subsequently ground into a fine powder. The obtained sample was stored until further experimental analysis.

Ultrasound-assisted extraction

The extraction of phenolic compounds from *H. scoparia* was performed using an ultrasonic bath (frequency 40kHz, power generator 120 W) following the method described by Moussa et al. (2022). The ranges of the independent variables were estimated using a one-factor experiment as preliminary research. The experiments were carried out by mixing 1 g of plant powder with ethanol solvent (30 - 70%). The resulting mixture was subjected to extraction at varying temperatures (20-60 °C) and different extraction times (10-30 min), with a solvent-to-solid ratio ranging from 30 to 60 mL/g. After filtration, the liquid extracts were adjusted to the final volume using solvent extraction and stored at 4 °C until further analysis for optimization and prediction (Table 1).

Experimental design

The present study employed a response surface methodology (RSM) approach and a Box-Behnken design (BBD) to investigate the effects of four independent factors (ethanol concentration (%), extraction time (min), solvent-to-solid ratio (mL/g), and temperature (°C)) on three response variables: total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and DPPH scavenging activity of *H. scoparia*.

extract. For this, there are 27 experiments total in the BBD matrix. Table 1 presents the experimental design, the independent variables, and the related response values.

The expression of the investigated responses as a function of the independent variables tested in the present work, was carried out by applying the generalized polynomial model of the second order according to the following formula:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (1)$$

Y: represents the response variable; x_i and x_j : represent the independent variables; β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} : represent the regression coefficients of linear, interaction and quadratic terms respectively, and e is the error.

Table 1. Box-Behnken design (BBD) for observed and predicted values of TPC, TFC and DPPH activity of *H. scoparia*

Variable levels					Observed values			Predicted values		
Run	x1	x2	x3	x4	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	DPPH (mg AAE/g)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	DPPH (mg AAE/g)
1	50	20	45	40	72.37±1.51	2.65±0.09	39.62±0.76	71.23	2.56	40.01
2	30	10	45	40	67.58±0.45	2.44±0.07	33.14±0.36	68.79	2.47	32.95
3	30	20	60	40	80.18±0.43	2.79±0.09	37.94±0.52	77.63	2.84	38.19
4	50	20	45	40	70.71±0.23	2.50±0.03	39.96±0.47	71.23	2.56	40.00
5	50	30	60	40	75.96±0.35	3.13±0.12	40.86±0.28	79.02	3.23	41.09
6	50	10	60	40	68.93±0.16	3.48±0.07	38.69±1.12	69.84	3.22	38.18
7	70	20	45	60	86.89±0.19	2.88±0.14	27.92±0.20	86.09	2.90	27.98
8	70	20	45	20	69.65±1.34	2.84±0.13	28.39±0.36	70.56	2.81	28.76
9	50	20	60	60	78.17±0.56	3.38±0.11	41.52±0.80	77.96	3.44	42.01
10	50	10	45	60	77.76±0.25	3.27±0.00	36.01±0.46	78.34	3.49	37.05
11	50	20	45	40	70.60±0.39	2.53±0.06	40.42±0.90	71.23	2.56	40.00
12	50	30	30	40	63.02±0.12	2.60±0.09	28.58±0.66	63.08	2.72	28.36
13	50	10	30	40	61.48±0.91	2.80±0.11	29.63±0.06	59.38	2.57	28.67
14	70	20	30	40	67.29±0.66	2.56±0.05	22.14±0.14	67.52	2.63	21.22
15	50	30	45	20	78.42±0.32	3.77±0.08	39.99±0.27	75.52	3.68	38.28
16	70	20	60	40	83.15±0.95	2.74±0.13	30.23±0.70	80.21	2.63	29.32
17	50	20	60	20	76.56±0.21	2.91±0.03	41.56±0.08	78.28	3.07	42.01
18	70	30	45	40	78.18±0.32	2.95±0.08	26.83±0.27	78.32	2.93	28.40
19	30	20	45	20	71.96±1.42	2.79±0.16	34.54±0.57	73.73	2.64	33.75
20	30	20	45	60	76.67±0.19	2.40±0.18	35.78±0.96	76.73	2.31	34.68
21	30	30	45	40	75.40±0.54	2.49±0.05	29.19±1.11	74.29	2.41	30.75
22	70	10	45	40	68.48±0.92	2.64±0.04	23.78±0.22	70.94	2.71	23.61
23	50	10	45	20	62.85±1.23	2.58±0.13	35.24±0.33	59.79	2.75	36.01
24	30	20	30	40	63.30±0.15	1.44±0.01	23.79±0.31	63.92	1.67	24.04
25	50	20	30	60	74.72±1.02	2.53±0.01	30.02±0.02	74.35	2.37	30.96
26	50	20	30	20	53.94±0.69	3.03±0.05	29.90±0.08	55.50	2.98	30.81
27	50	30	45	60	74.76±0.23	2.74±0.10	38.81±1.08	75.50	2.70	37.38

x1: Ethanol concentration (%); x2: Time (min); x3: Liquid-to-solid ratio (mL/g); x4: Temperature (°C); TPC: Total phenolic contents (mg GAE/g DW); TFC: Total flavonoids content (mg QE/g DW); DPPH: DPPH[•] radical scavenging assay (mg AAE/g DW).

Total phenolic content (TPC)

The phenolic compound content was determined following the method described by George and Bennett (2005). An aliquot of *H. scoparia* extracts (125 µL) was mixed with 625 µL of Folin-Ciocalteu solution. After two minutes' reaction period, 500 µL of sodium carbonate (7.5%) was added. The mixture was incubated for 15 minutes at 50 °C, and the absorbance was then measured at 760 nm. The phenolic compounds content of *H. scoparia* was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry weight of plant (mg GAE/g DW). The calibration curve equation was $y=10.125x + 0.0048$, with an R^2 value of 0.9992. The gallic acid concentrations used for the calibration ranged from 0.02 to 1 mg/mL.

Total flavonoids content (TFC)

The total flavonoids content of *H. scoparia* extracts was assessed according to the method described by Serra Bonvehí et al. (2001). A volume of 1 mL of aluminum chloride (2%) was added to the same volume of *H. scoparia* extracts. After the incubation of 10 min, the absorbance was read at 430 nm. The flavonoid assay results were expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry weight of *H. scoparia* (mg QE/g DW). The calibration curve equation was $Y = 35,335x + 0,0032$, with an R^2 value of 0,9997.

DPPH' radical scavenging activity

The DPPH' radical scavenging activity of *H. scoparia* extract was assessed according to the method of Dudonne et al. (2009). To 50 µL of sample extracts were added 1.5 mL of DPPH' solution (60 M). The absorbance was measured at 515 nm after twenty minutes of incubation at 37 °C. The DPPH scavenging activity of *H. scoparia* extracts was expressed as milligrams of ascorbic acid equivalent per gram of dry weight (mg AAE/g DW). The equation of the ascorbic acid calibration curve was $y=-7.475x + 0.7978$, $R^2=0.9972$.

*Evaluation of the antioxidant potential of H. scoparia optimal extract**ABTS' radical scavenging activity*

The ABTS' scavenging activity of *H. scoparia* optimal extract was assessed following the method of Re et al. (1999) with slight modification. The ABTS' solution was prepared by mixing 2.45 mM of ABTS with 7 mM of potassium persulfate, followed by incubation for 16 hours in the dark. The resulting solution was then mixed with ethanol to achieve an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm. A volume of 50 µL of *H. scoparia* extract was added to 1.5 mL of the ABTS' solution. The absorbance was measured at 734 nm after 6 min of incubation. The percentage of ABTS' radical inhibition was calculated using the following formula:

$$\text{ABTS' radical scavenging activity} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{extract}})}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

A_{control} : is the absorbance of the control; A_{extract} : is the absorbance of the sample.

The IC_{50} value indicates the concentration of extract needed to reduce the absorbance by 50% at 734 nm.

Ferric reducing power

The ferric reducing power of the optimal *H. scoparia* extract was tested using the method of Oyaizu (1986). A volume of 1 mL of the sample was added to 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide solution (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 minutes, followed by the addition of 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%). The resulting solution was then

centrifuged at 3000 g for 10 minutes. A volume of 2.5 mL from the supernatant was diluted with 1 mL of distilled water, and 0.5 mL of ferric chloride solution (0.1%) was added. The absorbance was measured at 700 nm. The ferric reducing power was expressed as milligrams of ascorbic acid equivalent per gram of lyophilized extract (mg AAE/g dry extract) according to equation (3).

$$\text{Ferric reducing power (mg AAE/g dry extract)} = \frac{c(\text{mg AAE/mL})}{c(\text{g /mL})} \quad (3)$$

Where $c(\text{mg AAE/mL})$ and $c(\text{g/mL})$ are the antioxidant activity calculated from the standard curve and the concentration of lyophilized extract respectively. The equation of the calibration curve was $y = 5.0283x + 0.0159$, with an R^2 value of 0.9951.

Molybdate reducing activity

The molybdate reducing activity of *H. scoparia* extract was determined by the method of Prieto et al. (1999). An aliquot of 0.3 mL of sample was added to 3 mL of a reagent mixture containing sodium phosphate (28 mM), sulfuric acid (0.6 M), and ammonium molybdate (4 mM). The reaction mixture was incubated at 95 °C for 90 minutes. The absorbance was then measured at 695 nm. The reducing activity of molybdate is expressed as equivalent milligrams of ascorbic acid per gram of lyophilized extract (mg AAE/g dry extract) (Eq. 3). The ascorbic acid calibration curve was $y = 2.1339x + 0.0277$, $R^2 = 0.9988$.

Antimicrobial activity

Microbial strains

In this study, the antibacterial activity of *H. scoparia* extract was evaluated against five bacterial strains, obtained from the Laboratory of Microbial Ecology (University Abderrahmane Mira Bejaia, Algeria). The bacterial strains selected for this study are *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* BAR 32, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA). These strains were chosen due to their clinical significance and prevalence in healthcare settings.

Well diffusion method

The well diffusion method, as described by Zeidan et al. (2013), was employed to assess the antibacterial activity of the *H. scoparia* extract obtained with the optimal extraction parameters. For this, Petri plates containing Mueller Hinton agar medium, previously inoculated with a bacterial suspension, were utilized to create wells with a diameter of 6 mm. A volume of 50 µL of the plant extract, with a concentration of 50 mg/mL was added to each well. The negative control was prepared using the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO), while the positive controls were tetracycline (TE) and ciprofloxacin (CIP). The inoculated Petri plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The antimicrobial activity of the *H. scoparia* extract was evaluated by measuring the zone of inhibition against the tested bacteria. The results were expressed in millimeters (mm).

Minimum inhibitory concentration (MIC)

The method used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of *H. scoparia* extract consists of dilution followed by diffusion on an agar medium (Mueller Hinton) (Metrouh-Amir et al., 2015).

The minimum inhibitory concentration of *H. scoparia* extract was determined using a series of six concentrations: 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.13 mg/mL, 1.56 mg/mL and 0.78 mg/mL. Once

the plates had been seeded, the wells (6 mm) were filled with 50 μL of each dilution of the selected extract. The plates were then incubated at 37 °C for 18 to 24 hours, after which two hours of diffusion at 4 °C had taken place. The results were represented by the diameters of the zones of inhibition and expressed in millimeters (mm).

Statistical analyses

The experimental design was carried out using JMP 13 software (statistical analysis system, Inc. SAS). Each experiment was conducted in triplicate. To ascertain the significance of the model and regression coefficients, an analysis of variance (ANOVA) was performed. The significance of the regression coefficients was determined using the Student's test. The antioxidant activity graphs were created using the GraphPad Prism 8.0.2 program.

Results and discussion

Extract yields

Model parameter estimation

This study was devoted to studying the effects of ultrasound-assisted extraction parameters on total phenolic content, total flavonoid content, and DPPH activity of *H. scoparia*, using the response surface methodology. This methodology offers significant advantages over traditional single-parameter optimization, providing an effective alternative for the optimization of phenolic compound extraction with a reduced number of experiments, leading to cost savings and reduced analysis time (Böhmer-Maas et al., 2020). The extraction factors selected for this study were based on the findings of previous research, which indicated that temperature, time, solvent concentration, and solvent/solid ratio were the most effective parameters for extracting phenolic compounds (Che Sulaiman et al., 2017; Elboughdiri, 2018). The Box-Behnken design (BBD) was applied to determine the effect of solvent concentration (x_1), temperature (x_2), time (x_3), and liquid-to-solid ratio (x_4) on total phenolic compounds content (TPC), total flavonoids content (TFC), and DPPH activity (Table 1). The regression models for TPC, TFC and DPPH activity are presented in equations 4, 5 and 6.

$$\text{TPC (mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DW}}) = 71.23 + 1.54 x_1 + 3.22 x_2 + 6.60 x_3 + 4.63 x_4 + 3.13 x_1 x_4 - 4.64 x_2 x_4 - 4.80 x_3 x_4 + 3.17 x_1^2 + 2.37 x_4^2 \quad (4)$$

$$\text{FC (mg}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{DW}}) = 2.55 + 0.18 x_1 + 0.29 x_3 - 0.29 x_1 x_3 - 0.43 x_2 x_4 + 0.24 x_3 x_4 - 0.20 x_1^2 + 0.28 x_2^2 + 0.31 x_4^2 \quad (5)$$

$$\text{DPPH activity (mg}_{\text{AAE}}/\text{g}_{\text{DW}}) = 39.66 - 2.92 x_1 + 5.56 x_3 + 1.74 x_1 x_2 - 1.51 x_1 x_3 - 8.47 x_1^2 - 2.59 x_2^2 - 3.32 x_3^2 \quad (6)$$

The analysis of the results revealed that the phenolic compound and flavonoid contents, as well as the DPPH activity, exhibited variations according to the extraction conditions tested. The phenolic compound content obtained varies from 53.94 to 86.89 mg GAE/g DW. The flavonoid content is between 1.44 and 3.77 mg EQ/g DW. In terms of DPPH activity, the values obtained range from 22.14 to 41.56 mg EAA/g DW (Table 1). The statistical analysis of the results demonstrated that the parameters tested had varying effects on the variables under study (TPC, TFC, and DPPH activity) (Table 2). In this study, all factors have a positive linear effect on total phenolic compound extraction. Regarding

flavonoids, the factors that showed a significant linear effect are the ethanol concentration and the solvent-to-solid ratio. For the antioxidant activity represented by the DPPH[•] radical scavenging assay, the ethanol concentration was found to have a positive linear effect, while the liquid-to-solid ratio exhibited a negative linear effect. The results revealed that the interaction between the concentration of ethanol and the extraction temperature had a positive impact on the contents of phenolic compounds. However, this interaction did not have a notable effect on the total flavonoid content or DPPH activity. It has been demonstrated that interactions between time and extraction temperature, as well as between solvent-to-solid ratio and extraction temperature, have a negative impact on the total phenolic compound content. The interactions between time and temperature, and between solvent concentration and liquid-to-solid ratio had a negative effect on flavonoids content. Conversely, the interactions between solvent-to-solid ratio and temperature had a positive effect. The interactions between liquid-to-solid ratio and solvent concentration, and between time of extraction and solvent concentration, respectively, had a negative and positive effect on DPPH activity. Regarding the quadratic effects, the phenolic compound content was positively influenced by the ethanol concentration and the temperature. The quadratic effect of ethanol concentration was found to be negative on total flavonoid content and DPPH activity. The quadratic effects of time extraction and liquid-to-solid ratio had a negative impact on DPPH activity. However, the quadratic effects of time and temperature had a positive effect on total flavonoid content. In this work, the high values of R-squared for the tested model (0.95 and 0.81; 0.91 and 0.81; 0.97 and 0.95 for R^2 and Adj. R^2 for TPC, TFC, and DPPH respectively) indicate a remarkable correlation between the values found in the present study and those predicted. In a good statistical model, the adjusted R² value should be comparable to the R² value, which is the case in our results. When the coefficient of determination R² is equal to or higher than 80%, the model is judged good (Fadil et al., 2021). The adequacy of the model is determined essentially by the adjusted R-square (R^2_{Adj}) (Zakaria et al., 2021).

Table 2. Regression results and analysis of variance for the experimental results

	Source	TPC		TFC		DPPH	
		Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F	Estimation	Prob. > F
Estimated parameters	X ₁	1.5465333	0.0463*	0.1888042	0.0041*	-2.92344	<.0001*
	X ₂	3.2213025	0.0006*	0.03926	0.4766	0.6489417	0.1005
	X ₃	6.5992142	<.0001*	0.2901958	0.0002*	5.5612433	<.0001*
	X ₄	4.63285	<.0001*	-0.06049	0.2797	0.0347583	0.9256
	X ₁ X ₂	0.4713	0.7027	0.068675	0.4724	1.749175	0.0170*
	X ₁ X ₃	-0.255625	0.8357	-0.291173	0.0084*	-1.515295	0.0336*
	X ₂ X ₃	1.3722325	0.2773	-0.036875	0.6973	0.806225	0.2260
	X ₁ X ₄	3.133225	0.0233*	0.1047	0.2801	-0.42895	0.5100
	X ₂ X ₄	-4.642625	0.0023*	-0.43016	0.0006*	-0.483375	0.4589
	X ₃ X ₄	-4.7934	0.0018*	0.24375	0.0218*	-0.0403	0.9502
	X ₁ ²	3.1740029	0.0103*	-0.209327	0.0227*	-8.475332	<.0001*
	X ₂ ²	-1.314776	0.2319	0.2823446	0.0042*	-2.590384	0.0005*
	X ₃ ²	-2.081026	0.0695	0.0921233	0.2728	-3.326382	<.0001*
	X ₄ ²	2.3762029	0.0420*	0.3125696	0.0021*	-0.225759	0.6871
Regression results	R ²	0.950063		0.914878		0.979965	
	R ² _{Adj}	0.891803		0.815569		0.956592	
	RMSE	2.41136		0.185109		1.263332	
	C.V(%)	3.34		6.66		3.77	
	ANNOVA	<.0001*		0.0002*		<.0001*	
	Lack of fit	0.1343		0.1431		0.0813	

x1: Ethanol concentration (%); x2: Time (min); x3: Solvent-to-solid ratio (mL/g); x4: Temperature (°C); TPC: Total phenolic contents (mg GAE/ g DW); TFC: Total flavonoids content (mg QE/g DW); DPPH: DPPH[•] radical scavenging assay (mg AAE/g DW).

The obtained coefficients of variation (C.V%) of TPC, TFC, and DPPH activity were 3.34, 6.66, and 3.77% respectively. If a coefficient of variation (C.V%) exceeds 10%, the average value presents significant variations and the response model developed is not sufficiently adequate (Dahmoune et al., 2015). Therefore, the reproducibility of the models in the present study was satisfied by the obtained results. The model's fitness was examined using a lack of fit test, which indicated the ability of the model to correctly predict its variability. The lack of fit of the response surface prediction model is not significant with a p-value less than 0.05, and the model is considered fit with a p-value greater than 0.05 (Kong et al., 2010). In the present study, the lack of fit values of the phenolic compounds content, flavonoids content, and DPPH scavenging activity of *H. scoparia* are 0.1343, 0.1431, and 0.0813, respectively. The validity of the models is carried out by analyzing the lack of fit. Accordingly, the model is considered to be an accurate representation of the actual data if the p-value is determined to be insignificant and greater than 0.05 (Zakaria et al., 2021). The quadratic polynomial models produced in this study were found to be accurate and reliable in predicting the corresponding responses.

Analysis of response surfaces

In this work, in order to study the interactive effects of the independent variables tested and their mutual interaction on phenolic compound content, flavonoids content, and DPPH activity, three-dimensional response surface profiles of multiple non-linear regression models were depicted.

The effect of the interaction effects of ethanol concentration, time, liquid-to-solid ratio, and temperature extraction on the total phenolic content of *H. scoparia* was illustrated in Figure 1.

The interaction between ethanol concentration and temperature exerted an exponential effect on total phenolic content (Figure 1(a)).

Increasing extraction time improves the yield of phenolic compounds at low temperatures, the optimal value (80 mg GAE/g DW) was found at 20 °C after 30 min of extraction (Figure 1(b)). Extraction of phenolic substances is more effective with longer extraction periods (Santos-Buelga et al., 2012). This can be attributed to the fact that extending the ultrasonic extraction time allows for greater penetration of the solvent, which in turn facilitates the release and solubility of various substances from the raw materials, which favours the extraction of higher quantities of phenolic compounds (Hachani et al. 2020). The yield of phenolic compounds increases with increasing temperature after a short extraction time. An estimated 82 mg GAE/g DW was attained at 60 °C after 10 minutes. The high temperature leads to an increase in the extraction rate by promoting the rate of mass transfer by promising the solubility of the solute (Prasad et al., 2012). The obtained results show that the exposure to elevated temperatures for over ten minutes resulted in a notable decline in total phenolic content, which could be explained by the fact that these compounds are degradable at high temperatures.

Figure 1 (c) reveals that the interaction between the temperature and the liquid-to-solid ratio exerted an inversely proportional effect on total phenolic content, with approximate values of 80 mg GAE/g DW and 75 mg GAE/g DW, using a ratio of 60 mL/g at 20 °C and 30 mL/g at 60 °C, respectively. The total phenolic content increases in line with the solvent-to-solid ratio at low temperature. The content of bioactive compounds increases with the volume of extraction solvent, due to the fact that phenolic compounds are more soluble in higher volumes of solvent than in lower volumes (Silva et al., 2007). The high liquid-to-solid ratio provides high mass transfer phenomena (Al-Farsi and Lee, 2008; Chaalal et al., 2012), which confirmed the obtained results.

The effects of interactions between ethanol concentration and liquid-to-solid ratio, between time and temperature and between solvent-to-solid ratio and temperature on total flavonoids of *H. scoparia* were represented in Figure 2.

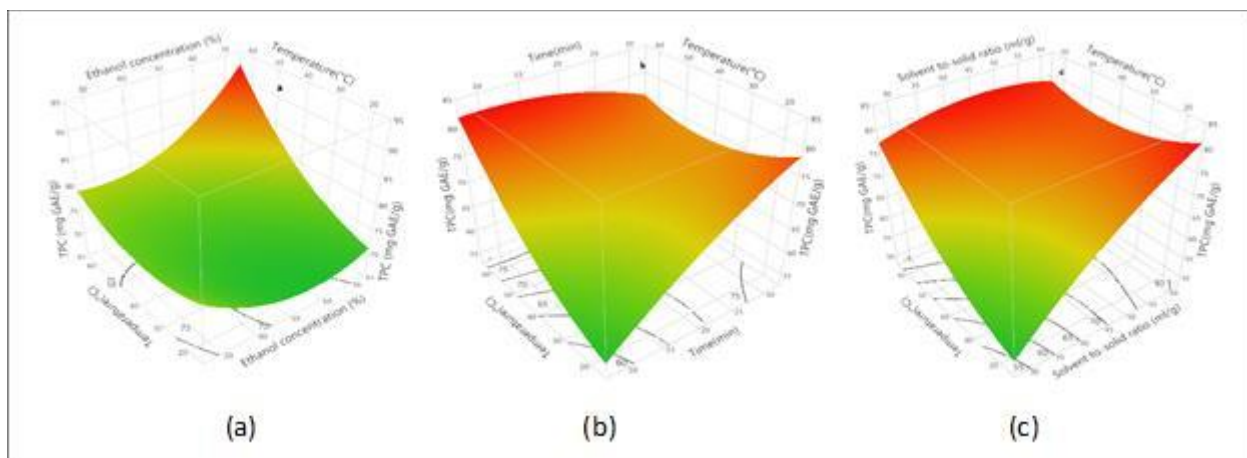


Figure 1. Response surface plots illustrating UAE factors influence the TPC of *H. scoparia*
(a) Interaction temperature - ethanol concentration; (b) Interaction temperature - time; (c) Interaction temperature - solvent-to-solid ratio

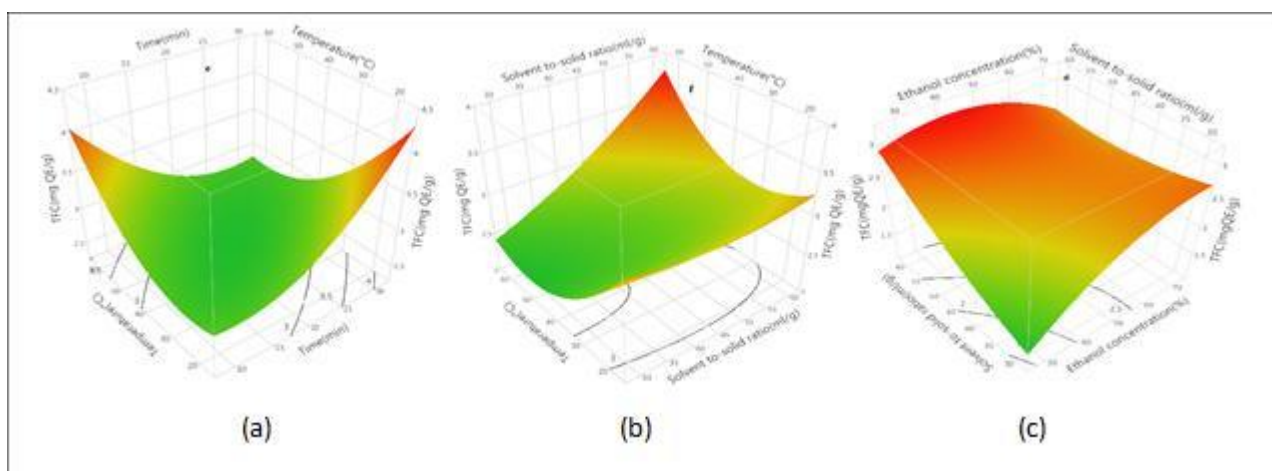


Figure 2. Response surface plots illustrating UAE factors influence the TFC of *H. scoparia*
(a) Interaction temperature - time; (b) Interaction solvent-to-solid ratio - temperature; (c) Interaction solvent-to-solid ratio - ethanol concentration

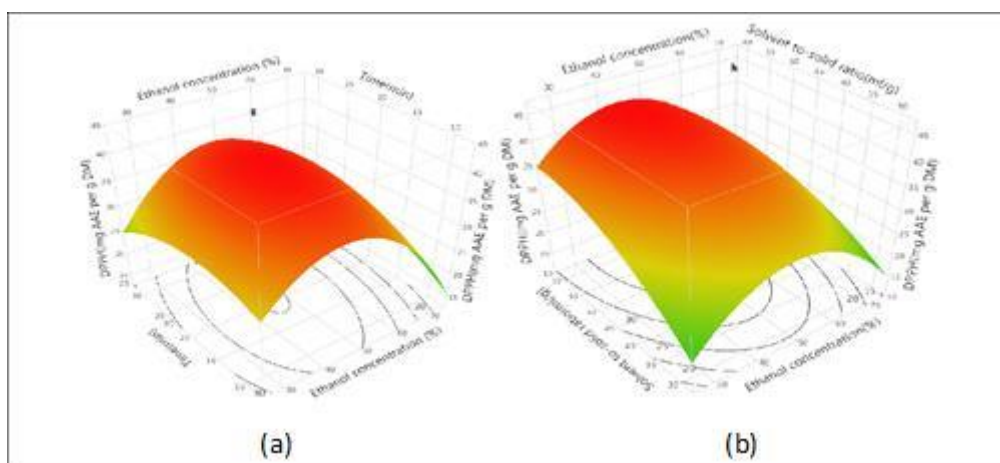


Figure 3. Response surface plots illustrating UAE factors influence the antioxidant activity of *H. scoparia*
(a) Interaction time - ethanol concentration; (b) Interaction solid-to-liquid ratio - ethanol concentration

Figure 3 illustrates the impact of ethanol concentration and solvent-to-solid ratio, solvent concentration and liquid-to-solid ratio on the DPPH activity of *H. scoparia*. The inhibition of DPPH increases with the liquid-to-solid ratio at ethanol concentrations below 50%. The results demonstrate that the DPPH activity is significantly influenced by the liquid-to-solid ratio and ethanol concentration, with highly significant linear and quadratic interaction effects ($p < 0.0001^*$), as illustrated in Table 2.

The predicted values for the optimal TPC, TFC, and DPPH activity were verified experimentally. The optimal parameters were found to be a time of 30 min, a temperature of 20 °C, an ethanol concentration of 46.95%, and a liquid-to-solid ratio of 60 mL/g (Figure 4). The results demonstrate that under these optimal conditions, the values for TPC, TFC, and DPPH activity were 81.39, 3.48, and 42.44 mg EAA/g DW respectively (Table 3, Figure 4).

Table 3. Optimal conditions and appropriate response using UAE

Factors	Optimal conditions
Ethanol concentration (%)	46.96
Time (min)	30
Solvent-to-solid ratio (mL/g)	60
Temperature (°C)	20
Results	Obtained Values
TPC (mg GAE/g DW)	81.39±0.81
TFC (mg QE/g DW)	3.48±0.15
DPPH scavenging (mg AAE/g DW)	42.44±0.39

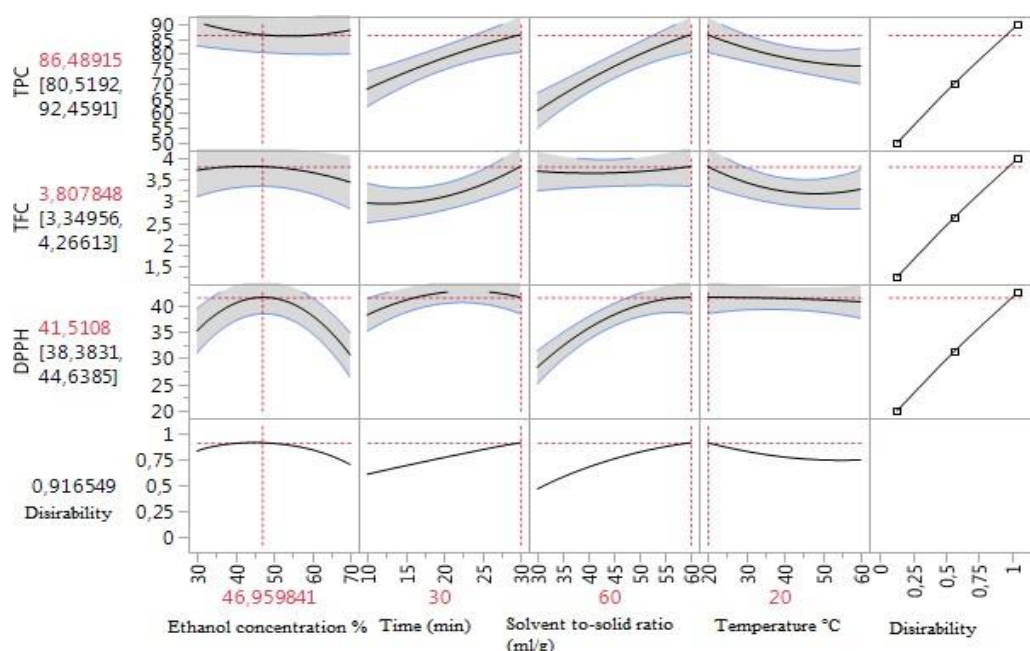


Figure 4. Prediction profile of *H. scoparia* extract using UAE

Antioxidant activity of *H. scoparia*

The extract obtained using the optimal extraction parameters was used to evaluate the ferric and molybdate reducing activities, and the ABTS activity.

The results of the ABTS activity of *H. scoparia* extract, showed that the percentage of the ABTS' radical inhibition increases with the extract concentration. The highest percentage of inhibition (93.81%) was

observed at a concentration of 1 mg/mL. The IC_{50} value for the *H. scoparia* extract was found to be 0.41 mg/mL (Figure 5).

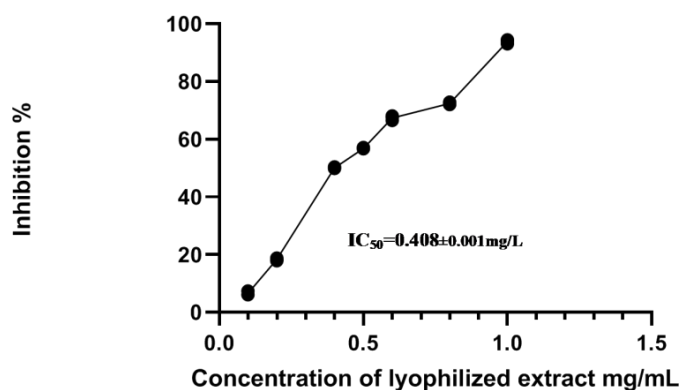


Figure 5. ABTS scavenging activity of *H. scoparia* extract

The results in Figure 6 show that the ferric and molybdate reducing activities of the studied extract increase in line with the concentration tested. The *H. scoparia* extract demonstrated a greater molybdate reduction activity than ferric at all tested concentrations. The highest levels of molybdate and ferric reducing activities were recorded at 1 mg/mL, with values of 31.46 and 16.10 mg AAE/g dry extract, respectively.

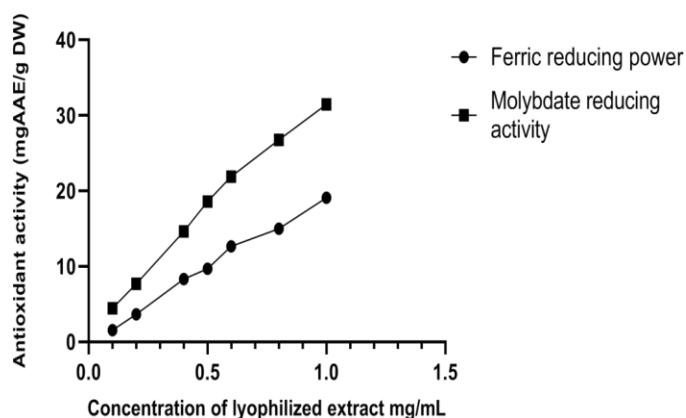


Figure 6. Ferric and molybdate reducing activities of *H. scoparia* extract.

This study revealed that *H. scoparia* extract inhibited free radicals DPPH[•] and ABTS[•], and reduced ferric and molybdate in different mechanisms.

Antioxidant compounds act through several chemical mechanisms: hydrogen atom transfer, single electron transfer, and the ability to chelate transition metals (Santos-Sánchez et al., 2019; Teng et al., 2014). This justifies the results of the present study.

The research conducted by Bouaziz et al. (2016) confirmed that the ethanolic extract of *H. scoparia* demonstrated both DPPH radical inhibitory activity and molybdate reducing activity. The study

conducted by Benkherara and Bordjiba (2018) demonstrated that the same plant exhibited DPPH and ABTS scavenging activities, as well as ferric reducing power, which justifies the obtained results.

Antibacterial essay

The antibacterial activity of the optimal extract was evaluated using the agar dilution method against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* BAR 32, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA).

According to the findings, *H. scoparia* extract exhibited antibacterial activity against all of the tested bacterial strains, with the exception of *Escherichia coli* ATCC 25922 (Table 4). The results indicated that the optimal extract had the highest inhibitory effects against MRSA strain and *Salmonella sp.*, with inhibition zone diameters of 16 mm. *Klebsiella pneumonia* BAR 32 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 were also inhibited by the extract, with inhibition zones of 13.66 mm and 12.33 mm, respectively. The statistical study of the antibacterial activity results revealed that no significant difference was found between the zones of inhibition of MRSA strain and salmonella sp. strain, and between the zones of inhibition of *Klebsiella pneumonia* BAR 32 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633.

The results of this study showed that the highest antibacterial activities were exerted by the Ciproflaxin (CIP) standard, followed by those of the *H. scoparia* extract, while the lowest activities were exerted by the Tetracycline standard (TE).

Table 4. Antimicrobial activity of *H. scoparia* extract (mm)

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumonia</i> BAR 32	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6633	MRSA ATCC 43300
<i>H. scoparia</i> extract	–	13.66±0.57 ^b	16±1.00 ^a	12.33±1.52 ^b	16±1.00 ^a
Tetracycline (TE)	10	9	10	–	–
Ciproflaxin (CIP)	30	36	30	28	34
– Not detected					

The larger zones of inhibition observed in these cases could be attributed to the high levels of phenolic compounds and flavonoids found in *H. scoparia* extract. Polyphenols have been recognized for their potential antibacterial properties (Bouarab Chibane et al., 2019). Among polyphenols, flavonoids have been widely studied and shown to exert antibacterial effects through multiple mechanisms. Firstly, flavonoids can directly kill bacteria by disrupting the bacterial membrane, inhibiting cellular respiration, or interfering with DNA replication. Secondly, they can also enhance the activity of antibiotics by increasing their potency or reversing antibiotic resistance in bacteria (Xie et al., 2017). These results suggest that *H. scoparia* extract has a potential as a natural antibacterial agent and that its efficacy may be related to its phenolic compound content. The role of phenolic compounds in various plant extracts has been the focus of extensive research, owing to their beneficial health properties (Kalili and de Villiers, 2011). Our study revealed the presence of polyphenols and flavonoids in the plant extract under investigation, indicating its potential antibacterial activity against pathogenic bacteria. These findings are consistent with earlier research that suggests the plant's ability to combat gram positive and gram negative organisms (Metrouh-Amir et al., 2015).

The study by Nounah et al. (2019) provides evidence that the ethanolic extract of *H. scoparia* exhibits antimicrobial activity against *Klebsiella pneumonia* BAR 32 and *Salmonella sp.* Similarly, the study conducted by Dríoichea et al. (2019) reported antibacterial activity of *H. scoparia* extract against

Klebsiella pneumonia BAR 32, *Salmonella* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*. These findings support the justification for the obtained results.

Minimum inhibitory concentration (MIC)

A low MIC signifies strong antibacterial activity (Coulidiati et al., 2009). The minimum inhibitory concentration of *H. scoparia* extract was assessed against *Klebsiella pneumonia* BAR 32, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) (Table 5). The extract showed a MIC of 12.5 mg/mL against *Klebsiella pneumonia* BAR 32, *Salmonella* sp. and MRSA. Regarding *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633, the MIC was 25 mg/mL.

Table 5. Results of minimum inhibitory concentrations (MICs) in mg/mL of *H. scoparia* extract

Bacteria strains	<i>H. scoparia</i> extract
<i>Klebsiella pneumonia</i> BAR 32	12.5
<i>Salmonella</i> sp.	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6633	25
MRSA ATCC 43300	12.5

Conclusions

The Box-Behnken design (BBD) was used to optimize the experimental variables in order to enhance the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity of *H. scoparia*. Data analysis revealed that the phenolic compound, flavonoid contents and DPPH activity of *H. scoparia* were significantly ($p < 0.05$) affected by the extraction parameters tested (time, temperature, solvent to-solid ratio and solvent concentration). The obtained experimental results were rather similar to the anticipated results. This supports the validity of the selected experimental design. The present study revealed that *H. scoparia* extract, obtained under optimal extraction conditions, exhibited DPPH and ABTS inhibitory activities, and ferric and molybdate reducing powers. The antibacterial activity results showed that *H. scoparia* extract inhibited all bacterial strains tested except *Escherichia coli*.

Author Contributions: H.M.A. conceived the presented idea and verified the analytical methods. S.M. performed the experiment, analyzed, discussed, and interpreted the results, and wrote the manuscript. N.A. and H.M. contributed to the statistical analysis of the results. S.M. and H.M.-A reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Thanks are due to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for financial support of this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y. (2008): Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108, 977-985. <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.009>
- Aybastier, Ö., Demir, C. (2010): Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.013>

- Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S., Demir, C. (2013): Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 44, 558-565. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.022>
- Benkherara, S., Bordjiba, O., Harrat, S., Djahra, A.B. (2021): Antidiabetic Potential and Chemical Constituents of *Haloxylon scoparium* Aerial Part, An Endemic Plant from Southeastern Algeria. *International Journal of Secondary Metabolite* 8, 398-413. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ijsm>
- Benkherara S., Bordjiba. O. (2018): Phytochemical study and in vitro antioxidant activities of hammada scoparia extracts from southeastern Algeria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11, 187. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27067>
- Böhmer-Maas, B.W., Otero, D.M., Zambiazzi, R.C., Aranha, B.C. (2020): Optimization of the extraction of phenolic compounds from olive pomace using response surface methodology. *Revista Ceres* 67, 181-190. <https://doi.org/10.1590/0034-737X202067030003>
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., Oulahal, N. (2019): Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 1457-1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Bouaziz, A., Mhalla, D., Zouari, I., Jlaïel, L., Tounsi, S., Jarraya, R., Trigui, M. (2016): Antibacterial and antioxidant activities of *Hammada scoparia* extracts and its major purified alkaloids. *South African Journal of Botany* 105, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.012>
- Bourogaa, E., Nciri, R., Mezghani-Jarraya, R., Racaud-Sultan, C., Damak, M., El Feki, A. (2013): Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Hammada scoparia* against ethanol-induced liver injury in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 69, 227-237. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0206-7>
- Chaalal, M., Touati, N., Louaileche, H. (2012): Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Botanica Gallica* 159, 467-475. <https://doi.org/10.1080/12538078.2012.758495>
- Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., Ismail, M. (2017): Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal* 11, 1-11. DOI 10.1186/s13065-017-0285-1
- Chupin, L., Maunu, S., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., Bouhtoury, F.C.E. (2015): Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products* 65, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.052>
- D'Alessandro, L.G., Dimitrov, K., Vauchel, P., Nikov, I. (2014): Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (Black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design* 92, 1818-1826. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015): Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* 166, 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>
- Drioichea, A., Benhlila, N., Kharchoufa, S., El-Makhoukhi, F., Mehanned, S., Adadi, I., Aaziz, H., Elombo, F.K., Gressier, B., Eto, B. (2019): Antimicrobial and antiradical properties of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 16, 1-14. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v16i2.1>
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M. (2009): Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH,

- ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1768-1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Ecevit, K., Barros, A.A., Silva, J.M., Reis, R.L. (2022): Preventing Microbial Infections with Natural Phenolic Compounds. *Future Pharmacology* 2, 460-498. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2040030>
- Elboughdiri, N. (2018): Effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves. *Engineering, Technology & Applied Science Research* 8(2), 2805-2808. <https://doi.org/10.48084/etasr.1983>
- Eleroui, M., Feki, A., Hamzaoui, A., Kammoun, I., Bouhamed, M., Boudawara, O., Ayed, I.B., Amara, I.B. (2021): Preparation and characterization of a novel *Hammada Scoparia* polysaccharide composite films and evaluation of their effect on cutaneous wound healing in rat. *International Journal of Pharmaceutics* 608, 121056. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121056>
- Fadil, M., Bousta, D., El Ouali Lalami, A., Lachkar, M., Farah, A. (2021): Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: optimization using response surface methodology. *Journal of Chemistry* 2021, 8830902, <https://doi.org/10.1155/2021/8830902>
- Ferreira, S.C., Bruns, R., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J., Brandão, G., da Silva, E.P., Portugal, L., Dos Reis, P., Souza, A. (2007): Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- George, A.L., Bennett, A. (2005): Case Studies and Theory Development in the Social Sciences. USA: The MIT Press, pp. 5-10.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009): Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4988-4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Gülçin, İ., Tel, A.Z., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, S.H. (2019): Sage (*Salvia pilifera*): Determination of its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization* 13, 2062-2074. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00127-2>
- Hachani, S., Boukhalkhal, S., Ahmed, Z.B., Harrat, M., Silva, A.M., Yousfi, M. (2020): Exploiting response surface methodology (RSM) as a novel approach for the optimization of phenolics and antioxidant activity of date palm fruit. *Chemistry and Chemical Technology* 14, 572-582. <https://doi.org/10.23939/chcht14.04.572>
- Hemmami, H., Seghir, B.B., Zeghoud, S., Ben Amor, I., Kouadri, I., Rebiai, A., Zaater, A., Messaoudi, M., Benchikha, N., Sawicka, B. (2023): Desert Endemic Plants in Algeria: A Review on Traditional Uses, Phytochemistry, Polyphenolic Compounds and Pharmacological Activities. *Molecules* 28, 1834. <https://doi.org/10.3390/molecules28041834>
- Kalili, K.M., de Villiers, A. (2011): Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science* 34, 854-876. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000811>
- Kong, K.W., Ismail, A.R., Tan, S.T., Nagendra Prasad, K.M., Ismail, A. (2010): Response surface optimisation for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product. *International Journal of Food Science & Technology* 45, 1739-1745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02335.x>
- Metrouh-Amir, H., Duarte, C.M., Maiza, F. (2015): Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products* 67, 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.049>

- Moussa, H., Dahmoune, F., Hentabli, M., Remini, H., Mouni, L. (2022): Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic-saponin content from *Carthamus caeruleus* L. rhizome and predictive model based on support vector regression optimized by dragonfly algorithm. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 222, 104493. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2022.104493>
- Nounah, I., Hajib, A., Oubihi, A., Hicham, H., Gharby, S., Kartah, B.E., Charrouf, Z., Bougrin, K. (2019): Phytochemical screening and biological activity of leaves and stems extract of *Hammada scoparia*. *Moroccan Journal of Chemistry* 7(1), 001-009. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v7i1.14218>
- 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. <http://dx.doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagorskina, N., Kuznetsov, A., Khmel, I. (2013): Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 121, 1073-1081. <https://doi.org/10.1111/apm.12083>
- Prasad, K.N., Kong, K.W., Ramanan, R.N., Azlan, A., Ismail, A. (2012): Determination and optimization of flavonoid and extract yield from brown mango using response surface methodology. *Separation Science and Technology* 47, 73-80. <https://doi.org/10.1080/01496395.2011.606257>
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999): Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Saidi, S.A., Bourogâa, E., Bouaziz, A., Mongi, S., Chaaben, R., Jamoussi, K., Mezghani-Jarraya, R., van Pelt, J., El-Feki, A. (2015): Protective effects of *Hammada scoparia* flavonoid-enriched fraction on liver injury induced by warm ischemia/reperfusion. *Pharmaceutical Biology* 53, 1810-1817. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1010737>
- Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., Gonzalez-Paramas, A.M. (2012): Extraction and isolation of phenolic compounds. In: Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology, vol. 864, Sarker, S., Nahar, L. (eds), Humana Press, pp.427-464. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_17
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B. (2019): Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants* 10, 1-29. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M., Centelles Lorente, E. (2001): Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1848-1853. <https://doi.org/10.1021/jf0012300>
- Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007): Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55, 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>
- Taïr, K., Kharoubi, O., Taïr, O.A., Hellal, N., Benyettou, I., Aoues, A. (2016): Aluminium-induced acute neurotoxicity in rats: Treatment with aqueous extract of *Arthrophytum (Hammada scoparia)*. *Journal of Acute Disease* 5, 470-482. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.028>

- Teng, H., Lee, W.Y., Choi, Y.H. (2014): Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polyphenols, anthocyanins, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Food Analytical Methods* 7, 1536-1545. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9786-2>
- Wani, K.M., Uppaluri, R.V. (2022): Efficacy of ultrasound-assisted extraction of bioactive constituents from *Psidium guajava* leaves. *Applied Food Research* 2, 100096. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100096>
- Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., Liu, L. (2017): Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules* 22, 1913. <https://doi.org/10.3390/molecules22111913>
- Zakaria, F., Tan, J.-K., Faudzi, S.M.M., Rahman, M.B.A., Ashari, S.E. (2021): Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 81, 105851. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105851>
- Zeidan, R., Oran, S., Khleifat, K., Matar, S. (2013): Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of Jordanian *Rubus sanguineus* Friv. (Rosaceae). *African Journal of Microbiology Research* 7, 5114-5118.
-

Résumé

La présente étude a été consacrée à la détermination de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux et sur l'activité anti-radicalaire de *Hammada scoparia*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse (MSR) et du plan de Box-Behnken (BBD). Les extraits obtenus avec les paramètres optimaux ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante en utilisant plusieurs tests, l'activité antibactérienne contre plusieurs souches, et la capacité des extraits de la plante étudiée à augmenter la stabilité à l'oxydation d'une huile végétale. Enfin, une caractérisation des composés phénoliques des extraits optimisés a été réalisée par chromatographie liquide en tandem haute résolution-spectrométrie de masse (UHPLC MS/MS) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les résultats obtenus ont révélé que les extraits de *H. scoparia* ont permis d'inhiber les radicaux libres DPPH et ABTS et de réduire le fer et le molybdate d'une manière significative. Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la Ciprofloxacine a exercé un effet antibactérien plus important que celui exercé par l'extrait obtenu par EAU, puis celui de l'extrait préparé par macération, à celui exercé par la Tétracycline (TE). Concernant l'étude de la stabilité à l'oxydation d'une huile végétale, les extraits de *H. scoparia* ont montré une efficacité significative à protéger les lipides contre l'oxydation.

Cette recherche contribue à une meilleure compréhension des conditions optimales d'extraction des polyphénols et à la valorisation des ressources naturelles sahariennes.

Mot clés : *Hammada scoparia*, Optimisation, Activités biologiques, UHPLC MS/MS, FTIR.

Abstract

The present study focused on determining the effect of various extraction parameters on the total polyphenol content and the radical scavenging activity of *Hammada scoparia*, using response surface methodology (RSM) and the Box-Behnken design (BBD). Extracts obtained under optimal conditions were used to evaluate antioxidant activity through multiple assays, antibacterial activity against several bacterial strains, and the ability of the plant extracts to enhance the oxidative stability of a vegetable oil. Finally, the characterization of polyphenolic compounds in the optimized extracts was performed using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

The results revealed that *H. scoparia* extracts significantly inhibited DPPH and ABTS free radicals and exhibited strong ferric and molybdate reducing power. The antibacterial activity results showed that ciprofloxacin exhibited a stronger antibacterial effect than the extract obtained by ultrasound-assisted extraction (UAE), followed by the maceration extract, and then tetracycline (TE). Regarding the oxidative stability of vegetable oil, *H. scoparia* extracts demonstrated significant efficacy in protecting lipids from oxidation.

This research contributes to a better understanding of the optimal conditions for polyphenol extraction and highlights the valorization of Saharan natural resources.

Keywords: *Hammada scoparia*, Optimization, Biological Activities, UHPLC-MS/MS, FTIR.

المخلص

تتمحور هذه الدراسة حول تحديد تأثير مختلف معايير الاستخراج على المحتوى الكلي من البوليفينول والنشاط المضاد للجذور الحرة لنبات

Hammada scoparia، وذلك باستخدام منهجية استجابة السطح (RSM) وتصميم Box-Behnken (BBD) تم استخدام المستخلصات المحضرة وفقاً للظروف المثلى لتقييم النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام اختبارات متعددة، والنشاط المضاد للبكتيريا ضد عدة سلالات بكتيرية، بالإضافة إلى قدرة مستخلصات النبات على تحسين الاستقرار التأكسدي لزيت نباتي. وأخيراً، تم تحليل المركبات الفينولية في المستخلصات المثلى باستخدام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مقترنة بمطياف الكتلة (UHPLC-MS/MS) وتقنية التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه (FTIR).

أظهرت النتائج أن مستخلصات *H. scoparia* تمتلك قدرة كبيرة على تثبيط الجذور الحرة DPPH و ABTS وتقليل الحديد والموليبدات بشكل ملحوظ. كما بينت النتائج أن السيبروفلوكساسين أظهر تأثيراً مضاداً للبكتيريا أقوى من المستخلص المستخرج بتقنية الاستخراج بالموجات فوق الصوتية (UAE)، يليه المستخلص المحضر بطريقة النقع، ثم التتراسيكلين (TE). أما فيما يخص استقرار الزيت النباتي ضد الأوكسدة، فقد أظهرت مستخلصات *H. scoparia* فعالية كبيرة في حماية الدهون من الأوكسدة.

تساهم هذه الدراسة في تحسين فهم الظروف المثلى لاستخراج البوليفينولات وتبرز أهمية تثمين الموارد الطبيعية الصحراوية.

الكلمات المفتاحية: *Hammada scoparia*، تحسين الاستخراج، الأنشطة البيولوجية، UHPLC-MS/MS، FTIR.