

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE *MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE*

UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA
TERRE
DEPARTEMENT DE SCIENCE AGRONOMIQUE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière** : Sciences Alimentaire

Spécialité : Agroalimentaire et Contrôle de Qualité

Présenté par :

MESRANE Karima

Thème

*Optimisation de l'extraction assistée par l'ultrason des
composés phénoliques du jujubier Ziziphus lotus*

Soutenu le : 01 / 07 / 2018

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mer. ABARKANE Boubekour</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mer DAHMOUNE Farid</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mlle. BARKANI Farida</i>	<i>Doctorante</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Melle. BENSMAIL Souhila</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mr le Doyen Mr MOUNI.L. Professeur à l'université de Bouira d'avoir autorisé mon accès au système LMD.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr DAHMOUNE.F. Docteur à la faculté des sciences Université de Bouira pour avoir encadré et pour diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseils.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme BARKANI F, pour sa précieuse aide et ses conseils.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mer ABARKANE B et Melle BENSMAIL S pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de faire partie de jury

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à tous mes collègues plus spécifiquement les ingénieurs de laboratoire de m'avoir aidé et soutenu tous au long de mon parcours

Mes remerciements vont également à mes enseignants du des Sciences Agronomies pour leur compréhension et patience.

J'exprime mes vifs remerciements aux étudiants HAMZA, RABIA LYNDA, AFFAF, RAZIKA et RYMA.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*À mes très chers parents, qui m'ont soutenu tout au long de
Ces années, avec leurs affections et leurs amours, et que
Dieu leurs offres une bonne santé et longue vie*

À mon mari et ma fille adoré Raya

À mes très chères sœurs Willa et Nassima

À mes belles sœurs Houra et Djamila

À ma nièce adorable Yosra

À mes neveu Elyas et Aissa

À mes chers frères Younes, Tarik, Fouad

À Mon beau frère Mohand Akli

À toute la famille Mesrane et Banouh

À tous mes très chères ami(e)s et pour tous ceux qui m'aiment

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

Introduction

Synthèse Bibliographique

1. Présentation générale sur les polyphénols.....	4
1.1 Définition.....	4
1.2. Classification des polyphénols.....	4
1.2.1. Polyphénols simples.....	5
1.2.2. Polyphénols complexes (tanins).....	6
2. Généralités sur la plante étudiée (<i>Ziziphus lotus</i>)	7
2.1. Etude ethnobotanique	7
2.2. Répartition géographique.....	8
2.3. Compositions biochimiques.....	9
2.4. Activités biologiques et thérapeutiques de <i>Z. lotus</i>	10
3. Les techniques d'extractions des polyphénols.....	11
3.1. Méthodes conventionnelles	11
3.2. Nouvelles méthodes	12
4. Méthodologie des plans d'expériences.....	14
4.1. Définition des plans d'expériences.....	14
4.2. Formulation du problème.....	15
4.3. Objectif d'utilisation	15
4.4. Types des plans d'expériences.....	16
4.5. Domaine d'utilisation.....	16
4.6. Stratégie de plan d'expérience.....	16

Matériel et méthodes

1. Lieu de stage.....	18
2. Matériel	18
2.1. Matériel végétal.....	18
2.2. Préparation et caractérisation du matériel végétal.....	18
2.3. Détermination de taux d'humidité	18
3. Méthode.....	19
3.1. L'extraction conventionnelle par solvant.....	19
3.2. L'extraction assistée par micro-onde	19
3.2.1. Mécanisme d'action d'un micro-onde.....	19
3.2.2. La méthode d'extraction.....	20
3.3. L'extraction assistée par ultrason	20
3.3.1. Mécanisme d'action d'ultrasons.....	20
3.3.2. La méthode d'extraction.....	21
4. Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie des plans d'expériences.....	21
4.1. Description de l'étude	21
4.2. Objectif de l'étude	22
4.3. Réponses	22
4.4. Facteurs.....	22
4.5. Plan de Plackett et Burman.....	22
4.6. Plan fractionnaire	24
5. Dosage photochimique.....	26

5.1. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux.....	26
5.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes	27
5.3. Détermination de l'indice de phénols	27
5.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	27
5.5. Analyse statistique.....	28

Résultats et discussion

1. Le taux d'humidité	29
2. Résultats du plan expérimental Plackett et Burman.....	29
2.1. Analyse des résultats.....	30
2.2. Etude des effets des facteurs sur le rendement d'extraction les réponses.....	31
2.3. Etude de la corrélation	35
3. La modélisation du plan fractionnaire 2^{5-1}	36
3.1. Les composantes des contrastes.....	36
3.2. Estimation des paramètres de calcul.....	38
4. Résultats du plan complémentaire.....	39
4.1. Interprétation des résultats des calculs.....	40
4.2. Conclusion de l'étude	42
5. Validation expérimentale	43
6. Comparaison entre les trois techniques d'extraction (ultrason, micro-onde et macération avec agitation).....	43
Conclusion.....	45
Références bibliographiques	
Annexes	

Listes abrégations

AA: Activité Antioxydante.

CSE: Extraction conventionnelle par solvant.

DPPH: 2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazil.

EQ: Equivalente Quercitine.

EAG: Équivalent d'Acide Gallique.

EAM: Extraction Assistée par Micro-ondes.

EAU: Extraction Assistée par Ultrason.

FFD: Fractional Factorial Design.

IP: indice de Phénol.

MS: Matière Sèche.

MSR : Méthode de Surface de Réponse.

PBD: Plackett-Burman Design.

TPC: Total polyphénols concentration.

TFC: Total flavonoïdes concentration.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Composition biochimiques de différents organes végétaux du <i>Z.lotus</i>	8
02	Domaine d'étude du plan de criblage	23
03	La matrice d'expérimentation réalisée en se basant sur le plan de Placket-Burman.	24
04	Domaine d'étude des facteurs pour le plan fractionnaire	25
05	Les moyennes des concentrations des TPC, TFC et IP \pm leurs écarts-types	30
06	effets des facteurs sur le rendement d'extraction.	31
07	L'effet des facteurs sur chaque réponse (TPC, TFC et IP).	34
08	Les résultats des multiplications générées.	37
09	Les interactions d'ordre 2	37
10	L'effet des paramètres sur l'objectif de l'étude : cas des TPC.	38
11	Valeurs expérimentales et prédite pour le point test	43
12	Résultats de TPC, TFC et DPPH selon les méthodes MAE, UAE, CSE (macération avec agitation)	43

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	La formulation du problème	13
02	Mise en œuvre d'un plan d'expérience	14
03	Fruit de <i>Z. lotus</i> .	18
04	Représentation schématique de comportement des molécules possédant un dipôle en absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence	20
05	Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore	21
06	Principe de la réduction du réactif de Folin Ciocalteu	27
07	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	28
08	La corrélation entre TPC, TFC et IP.	35
09	Graphes comparant les TPC, TFC et IP mesurés aux TPC, TFC et IP prédites.	36
10	Résultat expérimental vs théorique.	39
11	Surface de réponse des TPC, TFC et DPPH.	40
12	Optimisation des conditions de la sonication par la fonction de désirabilité	41

Introduction

Les plantes renferment une large variété de molécules chimiques (peptides, terpènes, polyphénols, alcaloïdes...) de propriétés physico-chimiques très différentes et qui présentent une large variété d'activités biologiques. Il est par ailleurs, aujourd'hui reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives **(1)**.

Actuellement les industriels développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les polyphénols, qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé **(2)**. Notons aussi leurs diverses propriétés biologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antimicrobienne, anti-carcinogénique, anti-thrombotique, cardio-protective et vasodilatatoire citées dans la littérature **(3)**.

Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. Leur diversité rend le choix des processus d'obtention très important **(1)**. Pour cela, différents procédés conventionnels et innovants d'extraction sont utilisés.

Depuis très longtemps, les plantes jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité **(4)**. L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique en particulier saharienne et subsaharienne spontanées qui à des utilisations thérapeutiques très intéressantes. Parmi les plantes les plus répandues on cite le jujube de différentes espèces qui est largement exploité dans la médecine traditionnelle pour sa richesse en composants bioactives comme la vitamine C, polyphénols flavonoïdes, triterpénoïdes et polysaccharides.

L'objectif visé par notre étude, consiste en premier lieu à optimiser les conditions d'extraction assistées par ultrason des composés phénoliques, à partir du fruit de *Z. lotus*. En deuxième lieu, l'étude de l'activité antioxydante par le test DPPH.

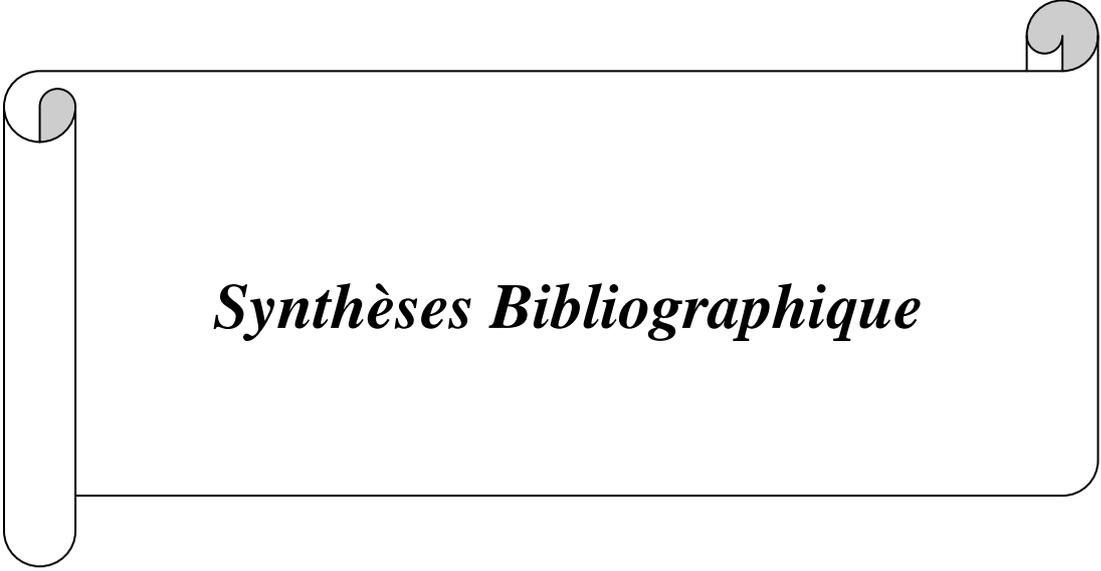
Afin d'atteindre cet objectif, on va se basé sur l'application des techniques statistiques telles que les plans d'expérience.

Dans ce contexte nous avons réalisé un travail comprenant trois chapitres,

-Le premier est une étude bibliographique qui comporte une description de la plante étudiée, des généralités sur les polyphénols et certaines méthodes d'extractions de ces composés ainsi des généralités sur la méthodologie des plan d'expédience.

-Le deuxième chapitre illustre la partie expérimentale qui se divise en deux axes : L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques du fruit de la plante étudiée, puis le dosage des extraits et l'étude du pouvoir antioxydant.

-Le troisième chapitre est consacré à la présentation, l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus.



Synthèses Bibliographique

1. Présentation générale sur les polyphénols

Depuis une quinzaine d'années, les chercheurs et les industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés anti-oxydantes de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydant sont les principales raisons de cet engouement (5).

1.1 Définition

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (6). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (7). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (8).

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques, la voie shikimate (également responsable de la synthèse des acides aminés Phe et Tyr) et la voie polyacétate, qui consiste en la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière (9).

1.2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (10).

1.2.1. Polyphénols simples

1.2.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (11).

❖ Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides **(12)**. Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais.

Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique **(11)**. L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits.

1.2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyranne, formant une structure C6-C3-C6 **(13)**. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV **(14)**. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides **(15)**.

1.2.1.3. Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique **(16)**. Le principal alcool phénolique de l'olive (responsable de l'amertume du fruit) est l'oleuropéine (60 à 90 mg/g matière sèche) **(17)**.

1.2.2. Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (18). Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés poly phénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines (19), d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (20).

1.2.2.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (21). Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (22).

1.2.2.2. Tannins condensés

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (23).

En raison de leur complexité avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

2. Généralités sur la plante étudiée (*Ziziphus lotus* L.).

2.1. Etude ethnobotanique

Le mot *Ziziphus* vient du grec, mais le mot n'apparaît qu'au deuxième siècle. Il existe plusieurs espèces de ce genre dont le *Ziziphus lotus* L qui est une plante médicinale. Sa racine est utilisée en décoction pour traiter les maladies de tube digestif et du foie, Le fruit est surtout employé dans les traitements de l'appareil respiratoire. Elle possède d'autres propriétés, tel que : sa valeur tonique, émolliente et sédative. Elle est utilisée aussi comme une haie défensive (24).

2.1.1. Caractéristiques

Le jujubier (*Z. lotus*) est un arbuste fruitier, épineux appartenant à la famille des Rhamnaceae ; communément appelé en Afrique du Nord « Sedra ». Il forme des touffes de quelques mètres de diamètre pouvant atteindre 2 m de haut (25). Ces feuilles sont courtement pétiolées, glabres, caduques alternées et ovales à marges entières. Les fleurs sont très visibles de couleurs jaunes avec des sépales ouvertes en étoiles, des petits pétales et sont des drupes à noyaux soudés, l'endocarpe mucilagineux appelé "Nbeg" (26).

2.1.2. Appellations :

- ❖ Nom scientifique : *Ziziphus lotus* (L.)
- ❖ Nom vernaculaire : Sedra. ou tazouggart, n'beg (le fruit) (26).

Nom Français : Jujubier sauvage ou jujubier des Lotophages, jujubier, dindonnier.

2.1.3. Classification

Règne : Végétal.

Embranchement : Spermatophytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Sous classe : Dicotylédone.

Ordre : Celastrales.

Famille : Rhamnacées.

Genre : *Ziziphus*.

Espèce : *Ziziphus lotus* L.(27).

2.2. Répartition géographique :

Le genre *Z. lotus* renferme environ 135 à 170 espèces des régions tropicales et subtropicales des deux hémisphère .L'aire de répartition du *Z. lotus* L. s'étale sur tout le Nord d'Afrique et Asie Mineure (28). En Algérie ,le *Z. lotus* est répandu dans toute l'Algérie sauf le Tell Algéro-constantinois (27).

2.3. Compositions biochimiques

Abdoul-Aziz (24) a montré que le fruit et la pulpe de *Z. lotus* contenaient des teneurs en vitamine A et en C supérieures à celles des autres parties de la plante et les feuilles étaient la source la plus riche en vitamine E et en acide linoléique, précurseur des acides gras (tableau 01)

Les études photochimiques menée sur le *Z. lotus* montrent la présence de métabolites primaires (sucres 20% à 32%, lipides 0,1% à 0,3%, protides 0,8% à 2,1%) et secondaires (flavonoïdes, tanins).(29)

Tableau 1. Composition biochimique de différents organes végétaux du *Z. lotus* (24).

<i>Parties de Z. lotus</i>	Composition	Teneur n mg/100 g
Fruit	Polyphenols totaux	297–4078.2
	Flavonoïdes	122
	Tannins	33
Feuille	polyphenols totaux	664
	Flavonoïdes	130-199
	Tannins	39
	Saponines	340
	Jujuboside B	3
	3 jujubogenine glycosides	9.33
	Jujubasaponine IV	2
	Monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose, arabinose, and xylose)	8720
	Flavonol glycoside	3
	Rutine	366
3'5'-Diglucosylphloretine	3	
Graine	carbohydrates	4087
	Polyphenols	14.68
	matière grasse	29730
	Sucres	4100
	fibres	16570
	Pectines	1350
	Protéine	144220
Branches	flavonoïdes	120
	Saponines	219
	Jujuboside A	6.73
	Jujuboside C	3.96
	Lotoside I	2.774
	Lotoside II	1.58
	Lotusine A	11.56
	Lotusine B	23.95
	Lotusine C	23.95
	Lotusine D	4.2-10
	Lotusine E	2.9-10
	Lotusine F	1.4-11.56
	Lotusine G	1.5
	Polypheno	2009
	Proanthocyanidines	156
Pulpe	Polyphénols	325
	Flavonoïdes	173
	Tannins	922
	graisses	790
	sucres	10550
	fibres	4840
	Pectines	2070
	protéines	1180
	Matière minérale	3200

2.4. Activités biologiques et thérapeutiques de *Z. lotus* L

Les différentes espèces du *Ziziphus* sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies (30), actuellement les recherches scientifiques s'intéressent à différentes activités pharmacologiques de *Z. lotus* pour développer et améliorer la médecine moderne, tel que l'activité antifongiques, antibactériennes, antiulcéreux, anti-inflammatoires, sédatifs, antispasmodiques, stérilisants, hypotenseurs, cardiotoniques, antioxydants, immunostimulants et aussi pour ses propriétés de cicatrisation (31).

3. Les techniques d'extractions des polyphénols

L'extraction est une soustraction des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe.

Plusieurs techniques sont utilisées pour extraire les composés phénoliques. Ces techniques sont soit conventionnelles, telles que l'extraction par macération, par infusion et au soxhlet, ou nouvelles comme l'extraction assistée par micro-ondes, par ultrasons, ou par fluide supercritique.

3.1. Méthodes conventionnelles

3.1.1. Macération

L'extraction par macération est utilisée depuis longtemps pour extraire les tanins condensés et les polyphénols à partir des écorces d'arbres comme *l'Acacia mollissima*, ou à partir des fruits. Les solvants utilisés sont l'eau, l'acétone 70% ou le méthanol 80%. Elle présente l'intérêt d'être facile à mettre en œuvre, et non coûteuse, mais d'autre part, elle nécessite beaucoup de temps (24h-72h) et elle est très peu sélective (32).

3.1.2. Infusion

L'extraction par infusion consiste à utiliser l'eau chaude pour extraire les polyphénols dans les plantes pour leurs propriétés anti-oxydantes ou anti-inflammatoires (33). Cette méthode est simple, n'utilise pas de solvant, limite le développement bactérien mais elle permet d'extraire une quantité importante de sucres et nécessite un temps d'extraction long (3h) (32).

3.1.3. Soxhlet

L'extraction par soxhlet est utilisée dans les études de comparaison des méthodes d'extraction comme témoin. Elle est utilisée pour l'extraction des polyphénols à partir des fruits et des végétaux (34). Son principe est basé sur l'échange entre la matière à extraire et le solvant pur. La matière est placée dans une cartouche de cellulose, puis dans le corps d'extracteur, le solvant est placé dans le ballon. Lorsque le solvant est à ébullition, il s'évapore passant par le tube adducteur, se condense dans le réfrigérant et retombe dans cartouche, faisant solubiliser la matière à extraire.

Une fois le corps d'extracteur est plein, le solvant retourne dans le ballon accompagné des substances à extraire. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. Cette technique présente l'intérêt d'être simple, peu coûteuse, permettant l'épuisement de la matière en extractibles mais d'un autre côté, elle nécessite un temps d'extraction long et une quantité de solvant importante (33).

Les techniques d'extraction traditionnelles, ont certes démontré leurs efficacités mais aussi leurs limites en termes de productivité, de rentabilité et de qualité des extraits. La nécessité de dépasser ces limites a favorisé l'émergence de nouvelles technologies, telles que l'extraction assistée par micro-ondes, par fluide supercritique et aussi par ultrasons. Mais le choix de la méthode d'extraction reste toujours en fonction des composés recherchés, et du coût de mise en œuvre qu'on vise investir.

3.2. Nouvelles méthodes

3.2.1. Extraction par fluide supercritique

Cette technique est utilisée pour l'extraction des produits en vue d'application en industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, où les qualités exceptionnelles du dioxyde de carbone conduisent à de nombreux développements (35). Cette technique utilise le CO₂ dans des conditions de température et pression supercritique, respectivement 304 °K et 7,28 MPa.

Le dioxyde de carbone présente l'avantage de créer un environnement sans oxygène et donc éviter d'avoir des réactions d'oxydation, c'est un fluide non polaire ce qui limite la solubilité des composés polaires (36). Généralement, il est utilisé avec des co-solvants polaires avec une faible concentration (3-5%) pour améliorer la solubilité des produits

polaires. Les co-solvants utilisés sont : l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone. Un mélange méthanol- eau permet une bonne extraction des composés phénoliques par rapport aux autres solvants (37).

3.2.2. Extraction Assistée par Micro-onde (EAM)

L'EAM est une nouvelle technique d'extraction utilisée pour extraire des polyphénols et des tanins à partir des écorces de *Pin Maritime* (38), du romarin et d'autres espèces (39), et pour extraire les acides phénoliques et les flavonoïdes à partir des plantes (40). Son principe consiste en la propagation des radiations électromagnétiques dans le matériau, pour atteindre les molécules polaires présentes dans la matière d'extraction.

Ces molécules génèrent de la chaleur qui chauffe le matériau à cœur. Les radiations se propagent sous forme de vagues avec des fréquences allant de 0,3 à 300 GHz (41). La pression élevée provoque la rupture des cellules, ce qui facilite la pénétration du solvant (42). L'EAM présente l'intérêt d'être une source d'énergie contrôlable de façon instantanée et réglable avec précision. Elle permet d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge, ce qui permet de préserver les composés les plus thermolabiles des réactions de dégradation traditionnelles. De plus, en raison de la rapidité du procédé, il y a une augmentation de la sélectivité de l'extraction par rapport à la méthode traditionnelle (43).

III.2.3. Extraction assistée par ultrasons (EAU)

Cette technique présente l'intérêt de faire des extractions à température ambiante, 20-25°C et pour des durées très courtes de 3-30 min, ce qui permet de préserver les composés thermolabiles (acide gras, polyphénols), des colorants, des antioxydants, des arômes ou aussi des caroténoïdes (40).

Son principe consiste à la destruction des parois cellulaires par des fréquences d'ultrasons, ce qui permet une meilleure pénétration du solvant au cœur de la matière, et par conséquent un meilleur rendement d'extraction. Les fréquences utilisées sont généralement supérieures à 20 kHz. En milieu liquide, les ultrasons provoquent des cycles d'expansion et de compression des cellules formant ainsi des bulles. Le développement excessif des bulles microscopiques à proximité des parois cellulaires, entraîne une élévation de température et de pression, ce qui provoque l'explosion des bulles et la destruction des parois cellulaires (41).

4. Méthodologie des plans d'expériences

A l'époque actuelle bon nombre de procédés de fabrication ou d'expérience en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement. Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses (modèle impossible à ajuster, résultats incohérents, *etc...*) soit à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la méthode des plans d'expérience est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche.

4.1. Définition des plans d'expériences

Le plan d'expérience est une méthode statistique correspond à une série d'essais définies à partir d'une stratégie optimale permettant la prédiction d'une réponse avec le minimum des erreurs et le minimum d'essais sur la base d'un modèle postulé. Selon la Norme ISO 3534 (44): planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique.

La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenable organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relative simple des résultats. Les plans d'expériences consistent à sélectionner et ordonner les essais afin d'identifier, à moindres coûts, les effets des paramètres sur la réponse du produit. Il s'agit de méthodes statistiques faisant appel à des notions mathématiques simples. La mise en œuvre de ces méthodes comporte trois étapes :

- ❖ Postuler un modèle de comportement du système (avec des coefficients pouvant être inconnus) ;
- ❖ Définir un plan d'expériences, c'est-à-dire une série d'essais permettant d'identifier les coefficients du modèle ;
- ❖ Faire les essais, identifier les coefficients et conclure.

Si l'analyse du problème conduit à une stratégie de construction d'un plan d'expérience alors, l'expérimentateur a accès à deux familles de plan :les plan pour l'étude des facteurs (plans de criblage..) et les plans pour la modélisation des surfaces de réponses (plan d'optimisation) qui dépendront d'un modèle empirique postulé a priori.

4.2. Formulation du problème

L'étude d'un phénomène peut, le plus souvent, être schématisé de la manière suivante: on s'intéresse à une grandeur Y , que nous appellerons par la suite réponse qui dépend d'un grand nombre de variables $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ que nous appelons par des facteurs (45).

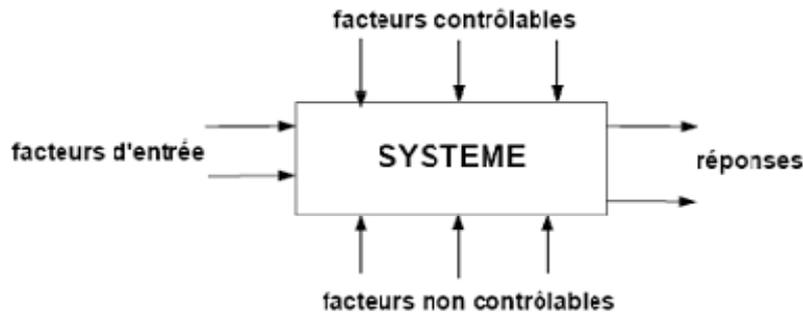


Figure 01: La formulation du problème

4.3. Objectif d'utilisation

Les progrès des sciences et de la technologie sont étroitement liés aux réponses que l'homme a pu apporter aux interrogations que lui pose régulièrement la nature. Ces réponses résultent le plus souvent d'une analyse des observations expérimentales obtenues par une approche méthodologique rigoureuse. Nous pouvons donc dire que, sans expérimentation physique ou numérique, il n'y a pas de solution.

L'expérimentation est parmi les moyens privilégiés pour acquérir ou améliorer les connaissances (46). L'objectif des plans d'expériences est donc d'obtenir des informations les plus fiables possibles avec minimum d'essais en réduisant l'erreur des essais. Elle vise :

- ❖ une diminution notable du nombre, du temps et du coût des essais.
- ❖ L'augmentation du nombre des facteurs étudiés ou de leurs niveaux.
- ❖ Le réglage facile des paramètres d'un procédé.
- ❖ Une prise en compte d'éventuelles interactions entre facteurs.
- ❖ Une recherche de la réponse optimale.
- ❖ Une modélisation simple des résultats.
- ❖ Une bonne précision dans la détermination des résultats.

4.4. Types des plans d'expériences

Il existe actuellement un nombre important de plans différents. Chacun, par ses propriétés, permet de résoudre certains problèmes particuliers. Nous pouvons cependant citer quelques types des plans d'expériences en deux grandes catégories (47):

- ❖ Les plans de criblage (screening)
- ❖ Les plans d'optimisation (MSR)
- ❖ Les plans de mélange

4.5. Domaine d'utilisation

Ils interviennent dans de nombreux domaines industriels. On peut notamment citer :

- ❖ Industrie agroalimentaire
- ❖ Industries chimiques, pétrochimiques et pharmaceutiques
- ❖ Industries mécaniques et automobiles
- ❖ Industries métallurgiques

IV.6. Stratégie de plan d'expérience

Le schéma ci-dessous résume la stratégie de plan d'expérience

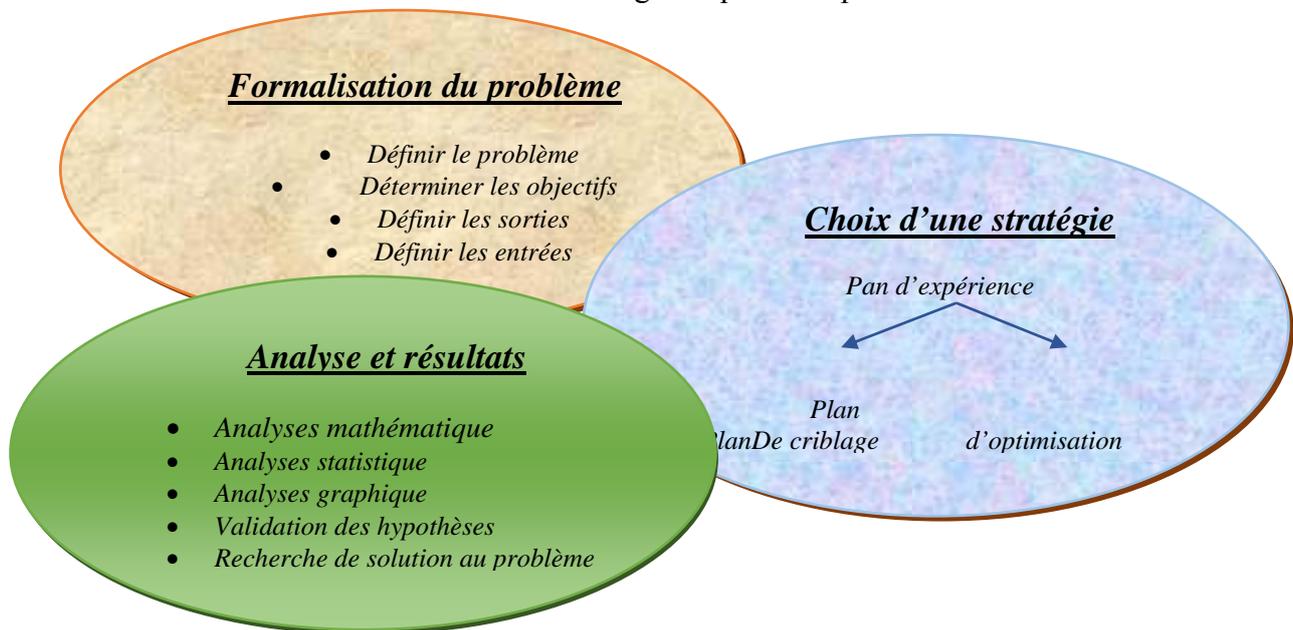


Figure 02: Mise en œuvre d'un plan d'expérience.



Matériel et Méthodes

1. Lieu de stage

La partie expérimentale de ce travail a été effectuée au niveau du laboratoire biochimie de l'université de Bouira

2. Matériel

2.1. Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans cette étude est les fruits de *Z. lotus*, sont récoltés de Djelfa durant le mois d'aout 2017 en pleine maturité.

2.1.1. Préparation et caractérisation du matériel végétal

Le séchage du jujube a été réalisé dans une étuve ventilée à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, les pelures de jujube séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, et tamisées à l'aide d'un tamiseur en vue d'obtention d'une poudre fine dont le diamètre est 50µm et 500µm. La poudre obtenue a été conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière et d'humidité dans un flacon en verre.

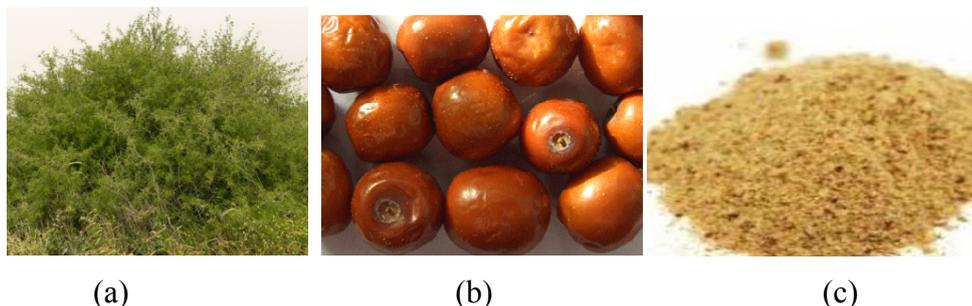


Figure 03 : (a) plante, (b) Fruit, (c) poudre de *Z. lotus*.

2.1.2. Détermination de taux d'humidité

➤ Principe

La teneur en eau a été déterminée par la méthode décrite par Schössler (48). Une prise d'essai de 10 g de la poudre du fruit est mise dans une étuve à 103°C ± 2°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Le taux d'humidité (H %) est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (M_1 - M_2) \frac{100}{p}$$

Où

H% : Taux d'humidité en % ; M1 : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en g ;
M2 : Masse de l'ensemble après séchage en g ; P : Masse de la prise d'essai en g.

3. Méthodes

3.1. L'extraction conventionnelle par solvant

La macération a été effectuée dans un erlenmeyer de 100 ml sur un agitateur avec agitation fixée à 350 tr / mn, à température ambiante. L'expérience a été réalisée dans des conditions choisies pour l'extraction des polyphénols sur la base des données de la littérature avec ratio de solvant solide de 1: 30 et temps d'extraction de plus de 20 h

3.2. L'extraction assistée par micro-onde

3.2.1. Mécanisme d'action d'un micro-onde

Il existe deux principaux mécanismes par lesquels les matériaux dissipent l'énergie micro-ondes : (Figure 04)

- **La rotation dipolaire**

Elle se résume par l'alignement des molécules qui ont un moment dipolaire avec le champ électrique. Sous l'effet de champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans un sens, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens lors du renversement de la polarité de champ. Après, l'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. Cette dernière est transformée en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre les molécules (les forces de liaisons par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals).

- **La conduction ionique**

Elle représente l'aptitude du milieu à permettre au courant de circuler. La migration des ions conducteurs dissous avec le champ électrique oscillant et la production de chaleur est due à des pertes de frottement qui dépendent de la taille, de la charge et de la conductivité des ions ainsi que de leurs interactions avec le solvant (4).

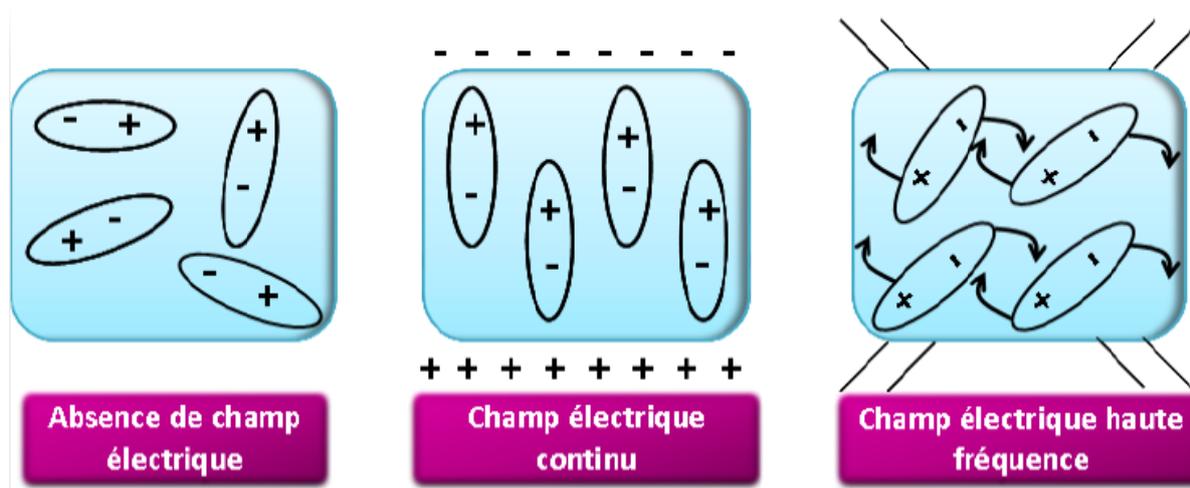


Figure 04: Représentation schématique de comportement des molécules possédant un dipôle en absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence (49).

3.2.2. La méthode d'extraction

L'appareil à micro-ondes utilisé dans cette étude est un appareil domestique. Le four a été modifié afin de condenser dans l'échantillon les vapeurs générées lors de l'extraction. Pour l'extraction, 1 g de poudre prétraitée séchée a été immergé dans 30 ml d'eau minérale. L'échantillon a ensuite été placé dans un four à micro-ondes à une puissance de 100 W pendant 5 minutes. Après refroidissement, l'extrait a été traité puis récupéré et analysé.

3.3. L'extraction assistée par ultrason

3.3.1. Mécanisme d'action d'ultrasons

La matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz à travers une succession des phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapide (50). (Figure 05)

Les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion ;
- Le contenu des cellules peut être lessivé après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés d'intérêt(51).

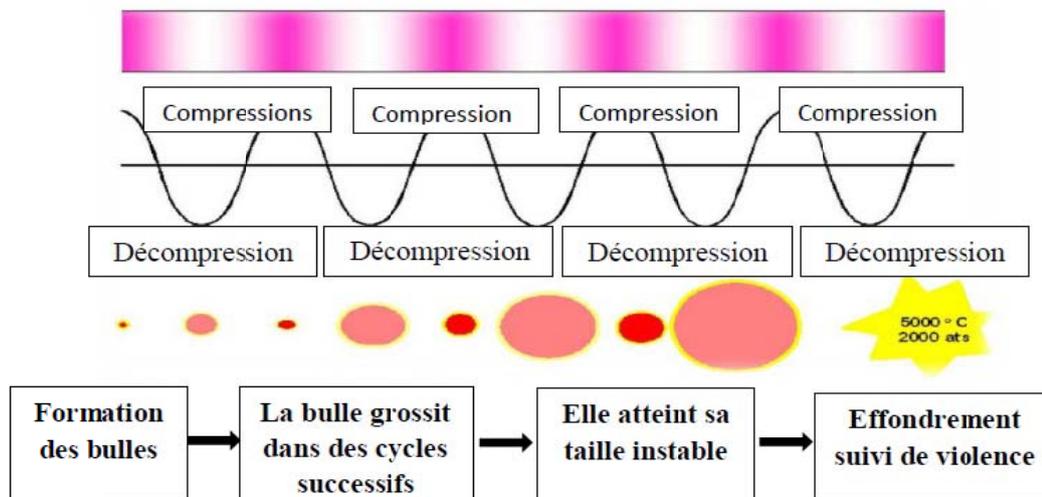


Figure 05 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore (52).

3.3.2. La méthode d'extraction

Les composés phénoliques de fruit de jujube sont extraits, en utilisant un sonificateur qui fonctionne à une fréquence de (50/60Hz) et une puissance maximale de 195W. Brièvement, 1g d'échantillon est mélangé avec le solvant (eau minérale) dans un bécher de 100ml placé dans un bain de glace. Les extraits obtenus sont filtrés et conservés à 4°C pour les analyses ultérieures. Des matrices de 12 et 16 essais ont été réalisées pour PBD et FFD respectivement, puis, une extraction a été réalisée aux conditions optimales.

4. Optimisation des conditions d'extraction par la méthodologie des plans d'expériences

L'extraction dépend de nombreux facteurs opératoires qui ont une influence directe sur la qualité du produit obtenu et sur le développement ou la mise au point du procédé. Quel que soit son domaine d'étude, l'expérimentateur est toujours confronté au problème difficile de l'organisation optimale de ses essais. Il cherche toujours à trouver un compromis entre les coûts, les délais et l'obtention des bonnes informations relatives ; d'où l'intérêt de l'introduction des outils statistiques qui permettent une meilleure exploitation des résultats de la recherche expérimentale (45).

Dans la présente étude des expériences de criblage ont été effectuées pour déterminer les paramètres influant et délimiter le domaine d'étude.

4.1. Description de l'étude

La formalisation du problème permet de rassembler l'expérience accumulée de manière diffuse afin de la compléter et de la préciser grâce à l'expérimentation. Plus cette étape sera

établie avec soin plus les plans d'expérience seront fructueux. Dans ce but nous allons définir le problème, déterminer les objectifs de l'étude et faire ressortir les paramètres d'entrée

4.2. Objectif de l'étude

Les objectifs qu'on a spécifiés pour cette étude sont les suivants :

- ✓ Trier parmi l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer les réponses pour avoir plus de précision sur le réglage de ces variables influentes.
- ✓ Prévoir et estimer avec beaucoup de précision l'effet de l'ensemble des facteurs influents, de façons à pouvoir modéliser de manière assez fiable, la valeur réponses.

4.3. Réponses

Dans cette étude, on a choisi de travailler sur trois réponses concernant l'extraction par ultrason : les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et l'indice de phénol.

4.4. Facteurs

Le choix des facteurs influençant nos réponses, se basera d'abord sur une phase de recensement (vérification du type d'ultrason dans lequel l'extraction va se faire) faisant appel aux intervenants dans le processus d'extraction. Les facteurs pris en considération sont :

- Le temps d'extraction (mn) ;
- Le diamètre des particules (μm) ;
- Le solvant (eau minérale) ;
- Le pH ;
- Le ratio solide/solvant (g/ml);
- La vitesse d'extraction (pulsation continue/discontinue intervalle 5sc);
- La température ($^{\circ}\text{C}$).

4.5. Plan de Plackett et Burman

A propos d'un processus ou d'un phénomène, les premiers problèmes auxquels les plans d'expériences peuvent apporter de l'information sont ceux de criblage des paramètres. Une étude de criblage peut être définie comme une étape permettant de repérer rapidement, dans un grand nombre (k) de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur un processus

dans un domaine expérimental fixé. Cette étude permettra de déterminer le "poids" de chaque niveau de chaque facteur, pour ensuite les classer par ordre d'importance.

Les matrices d'expériences de criblage les plus connues sont les matrices d'Hadamard pour lesquelles le nombre de simulations est proche du nombre de facteurs étudiés.

Ces plans sont des matrices à colonnes orthogonales composées uniquement des valeurs +1 ou -1.

Les plans de Plackett et Burman sont des plans de criblage basés sur des matrices d'Hadamard. Ils complètent les plans factoriels complets 2^k et les plans fractionnaires 2^{k-p} .

Comme pour les plans factoriels, les facteurs des plans Plackett-Burman ne prennent que deux niveaux -1 et +1 et il n'y a généralement pas de points centraux car on ne cherche pas à modéliser les résultats.

Un grand contraste coefficient positif ou négatif indique qu'un facteur a un grand impact sur la réponse; tandis qu'un coefficient proche de zéro signifie qu'un facteur a peu ou n'a pas d'effet (53).

➤ **Domaine d'étude** Le domaine d'étude est précisé dans le tableau N°02

Tableau N°0 2 : Domaine d'étude du plan de criblage.

Facteurs	Unité	Niveau -1	Niveau +1
Temps	Mn	5	30
Diamètre	µm	50	500
Ph		4	10
Ratio solide/liquide	g/ml	1/20	1/50
Vitesse		Discontinue	Continue
Température	°C	20	60
Solvant	%	20	50

➤ **Choix du plan d'expériences**

Il y a sept facteurs influent sur les grandeurs d'intérêt donc le plan de criblage choisi est celui de Plackett-Burman a 12 essais. La matrice d'expérimentation est représentée dans le Tableau N°03.

Tableau N°03 : la matrice d'expérimentation réalisée en se basant sur le plan de Plackett-Burman.

N° Exp	Temps (min)	Diamètre particule (µm)	Solvant (%)	pH	Ratio liquide-solide (g/ml)	Vitesse	Température (°C)
1	30	500	10	4	1/20	Continu	20
2	30	50	10	4	1/50	Discontinu	20
3	30	50	90	10	1/50	Discontinu	20
4	30	500	90	4	1/20	Discontinu	60
5	5	50	90	4	1/20	Continu	20
6	5	500	90	10	1/20	Discontinu	20
7	5	500	10	4	1/50	Discontinu	60
8	30	50	10	10	1/20	Continu	60
9	5	500	10	10	1/50	Continu	20
10	30	500	90	10	1/50	Continu	60
11	5	50	90	4	1/50	Continu	60
12	5	50	10	10	1/20	Discontinu	60

4.6. Plan fractionnaire

Les plans factoriels fractionnaires sont des plans factoriels qui permettent d'étudier tous les facteurs, mais dont le nombre d'essais est réduit par rapport aux plans factoriels complets. Un plan factoriel fractionnaire a 2 ou 4 fois moins d'essais que le factoriel complet correspondant. Il est généralement utilisé dans le cas où le nombre de facteurs à étudier est supérieur à 3, et dont la construction du plan factoriel complet entraîne un nombre d'expérience important.

A la fin d'un plan factoriel fractionnaire, on a un système de n équations à p inconnues avec p plus grand que n . Un tel système est difficile à être résolu car le nombre d'équation est inférieur au nombre d'inconnu. Donc, on procède à la réduction du nombre de facteurs, en utilisant un artifice : les inconnues sont regroupées et le système est résolu pour ces groupes d'inconnues. Ces groupes d'inconnues sont appelés des **contrastes** ou des **aliases** (53).

Un plan 2^{5-1} se construit à partir d'un plan de base 2^4 qui possède quatre facteurs principaux et un facteur alaisé sur l'interaction. Dans notre cas on a cinq facteurs, on utilisera les quatre premières colonnes pour étudier quatre facteurs et l'on choisira la cinquième colonne pour alaisé le cinquième facteur.

4.6.1. Préparation du plan d'expériences

➤ Description de l'étude

Après le criblage effectué par le plan d'expérience Plackett et Burman, une nouvelle série d'extraction a été lancée en prenant en considération juste les facteurs qui ont un effet significatif.

➤ Objectif de l'étude

Cette partie de l'étude a pour objectif de minimiser le nombre d'expériences à réaliser et surtout opter aux conditions optimales pour une meilleure extraction.

➤ Réponses

Dans cette partie de l'étude le choix des réponses a été portée sur le rendement en composés phénoliques totaux, les flavonoïdes, et l'activité antioxydante au DPPH*.

➤ Facteurs et domaine d'étude

Cinq facteurs influençant les expériences ont été triés à savoir : Le ratio, le pH, la vitesse, le temps et le diamètre des particules. Ils sont représentés dans le tableau N°04 avec leurs domaines d'étude.

Tableau N°04 : Domaine d'étude des facteurs pour le plan fractionnaire

Facteurs	Unité	Niveau -1	Niveau +1
Le temps	mn	5	30
Le diamètre	µm	50	500
Le pH		4	10
Le ratio	g/ml	1/20	1/50
La vitesse		Discontinue	Continue

4.6.2. Modélisation mathématique

➤ Choix du plan d'expériences

Dans le cadre de cette étude un plan de base de 2^4 a été adopté pour étudier quatre facteurs et le cinquième facteur est confondu avec l'interaction de l'ordre 4 donc on aura 2^{5-1} . Ce plan possède quatre colonnes pour les quatre facteurs, six colonnes pour les interactions d'ordre deux, quatre colonnes pour les interactions d'ordre trois et une colonne pour l'interaction d'ordre 4.

On pourrait être tenté de choisir l'interaction d'ordre 4 pour aliaser le premier facteur supplémentaire, soit :

$$5 = 1234$$

5. Dosage photochimique

5.1. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux

➤ Principe

La concentration de la teneur en composés phénoliques totaux a été estimée par le dosage de Folin-Ciocalteu. Le réactif 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.

➤ Mode opératoire

La détermination de la teneur en polyphénols totaux est réalisée selon le protocole décrit par George (54). 625 μ L du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 1/10) ajouté à 125 μ l d'extraits. Après incubation 2 min à l'obscurité, on ajoute 0,5 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (75g/L). Puis 15 minutes d'incubation à 50°C au bain Marie et refroidissement, l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un témoin ou l'extrait est remplacé par le même volume du solvant utilisé. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par g de poudre de *Zizyphus lotus*.

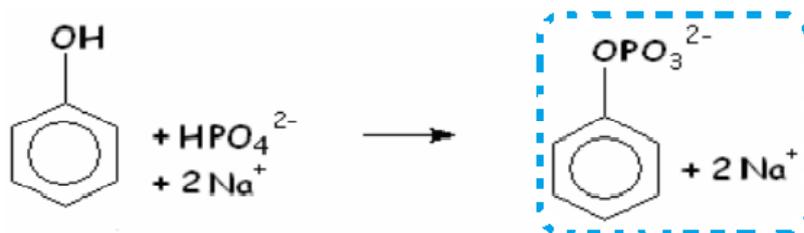


Figure 06. Principe de la réduction du réactif de Folin Ciocalteu (55).

5.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée par une méthode colorimétrique décrite par **Bonvehí (56)**. 1ml de chlorure d'aluminium (AlCl_3 2%) est additionné à 1ml d'extrait. Après 15 mn d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercitine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercitine par 100g de matière sèche (mg EQ/100 MS) (57).

5.3. Détermination de l'indice de phénols

L'indice de poly phénol est une méthode basée sur la mesure directe de l'absorbance à 280nm des différents extraits dilués les résultats sont exprimés en unité d'absorbance (58).

5.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits a été réalisée par test au radical DPPH•

➤ Principe

Le composé chimique 2, 2diphényl-1- picrylhydrazyl (α, α - diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure- activité antioxydante des composés phénoliques, du fait que ce composé possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Les molécules du radical ne forme pas des dimères, il reste donc sous sa forme monomère relativement stable à température ambiante.

C'est cette délocalisation qui provoque la coloration violette foncé bien caractéristique de la solution de DPPH. La diminution de cette coloration permet de mesurer l'efficacité d'un antioxydant, due à une recombinaison des radicaux DPPH qui possède une absorbance



Résultats et Discussion

Dans ce chapitre nous allons aborder les aboutissements des essais entamés dans la section « matériel et méthodes ».

1. Taux d'humidité

La durée de conservation des produits dépend principalement du taux d'humidité, premier responsable du phénomènes d'altération biologique **(60)**.

Les résultats de l'étude réalisée, montrent un taux d'humidité dans le fruit de *Z. lotus* utilisé qui est en moyenne de 10.67%. Par contre L'analyse du taux d'humidité au niveau de la pulpe de *Z. lotus* a montré une faible proportion estimée à 8.90% **(61)**. Les baies de *Z. lotus* représentent la teneur la plus haute en eau avec 12,27% **(62)** ce qui nous permet de classer ce fruit aussi avec les fruits secs.

Comparativement aux valeurs trouvées chez d'autres variétés du même genre d'occurrence, le *Zizyphus mauritiana*, *Zizyphus spina christi* et *Zizyphus jujuba*, **(63)** dont la teneur en eau est comprise entre 46 à 85%. La valeur que nous avons obtenue pour *Z. lotus* est nettement faible. Ce ci s'explique probablement par sa conservation pendant de longues durées, et même la différence des conditions climatiques et la répartition géographique.

Selon **Ruiz et al (64)**, plusieurs conditions peuvent influencer la teneur en eau et la faire variée d'un fruit à un autre tels que : la répartition géographique des fruits, les différentes conditions environnementales, ainsi que leurs expositions aux différentes conditions pédoclimatiques.

2. Résultats du plan expérimental Plackett et Burman

La concentration en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par 100 milligramme d'extrait (mg EAG/100mg d'extrait). Tandis que la quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de la quercitine et exprimée en milligrammes d'équivalents de quercitine par 100 milligramme d'extrait. Les valeurs sont répertoriées dans le tableau N°05.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tableau N°05 : Les moyennes des concentrations de TPC, TFC et IP ±leurs écarts-types.

Facteurs Essais	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	TPC (Y1) (mg EAG /100g DM)	TFC (Y2) (mgEQ/ 100g DM)	IP (Y3) (A)
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1194.50± 40.08	1204.56 ±26.28	0.74± 0.009
2	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	488.57± 27.77	269.86± 46.91	0.30± 0.008
3	1	-1	-1	1	1	-1	-1	430.68± 18.50	345.39± 52.73	0.34± 0.042
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	897.30± 62.68	439.81± 44.05	0.71± 0.02
5	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1114.73 ±260.55	286.65± 22.92	0.93± 0.03
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	736.35± 130.25	717.80± 13.10	0.87± 0.052
7	-1	1	-1	-1	1	-1	1	647.40± 2.11	256.75± 29.78	0.34± 0.047
8	1	-1	1	1	-1	1	1	995.43± 126.61	1273.27 ±40.92	0.87± 0.011
9	-1	1	-1	1	1	1	-1	530.93± 60.60	312.87± 38.68	0.45± 0.02
10	1	1	1	1	1	1	1	498.45± 138.18	557.30± 15.12	0.46± 0.02
11	- 1	-1	1	-1	1	1	1	401.03± 30.04	258.85± 32.28	0.35± 0.01
12	- 1	-1	-1	1	-1	-1	1	1076.61 ±44.74	527.93± 91.04	0.82± 0.02

X1 : le temps (mn), X2 diamètre des particules (μm), X3 solvant (%), X4 PH, X5 Ratio solide/liquide (g/ml), X6 vitesse d'extraction (pulsation continue/discontinue), X7 température ($^{\circ}\text{C}$).

2.1. Analyse des résultats

Les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes ont révélés la présence de ces composés dans le fruit de *Z.lotus* avec des quantités différentes (**Tableau N°05**).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations moyennes indiquent une variation pour les composés phénolique totaux allant de 401,03±30,04 à 1194, 50±40,08 mg/100gMS. Celles des flavonoïdes varient entre 256,75±29,78 et 1273, 27±40,92mg/100g. Par contre, les valeurs de l'indice de polyphénols se varient entre 0,306±0.008 et 0,932±0,032mg/100g.

Selon **Abdoul-Azize (24)**, le fruit de *Z.lotus* peut contenir 297 à 4078.2 mg/100g des composés phénoliques et 122mg/100g de flavonoïdes **(65)**. Ces variations peuvent s'expliquer par l'influence de plusieurs facteurs sur l'extraction des composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols **(66)**.

2.2. Etude des effets des facteurs sur le rendement d'extraction et les réponses

Les effets principaux des sept variables étudiés sur les polyphénols sont montrés dans le tableau N°06 et l'influence des facteurs sur le rendement d'extraction est illustrée dans le tableau selon la valeur du *p-value*.

Tableau N °06 : L'effet des facteurs sur le rendement d'extraction

Facteurs	P-Value
Ratio solide/liquide	0.000001
Temps (mn)	0.00001
Ph	0.00010
Vitesse	0.00016
Solvant	0.00050
Diamètre (µm)	0.07913
Température (C°)	0.42004

Les résultats observés indiquent le classement des facteurs du plus influant au moins influant. On constate que le diamètre des particules et la température n'influent pas significativement sur le rendement en substances d'intérêt ($p > 0.05$).

Le rapport solvant-solide a l'effet le plus significatif sur l'extraction (0.000001). Lorsque le ratio entre le solvant et le solide est élevé, la quantité totale de composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports

RÉSULTATS ET DISCUSSION

solvant-solide importants, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans les extraits sont faibles et plus d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec (49). Une optimisation de ce paramètre est donc souvent nécessaire.

Deuxième paramètre influant avec une probabilité de 0.00001 est. Le temps de contact est aussi l'un des paramètres très importants à maîtriser. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint.

Quant au pH (p-value=0.0001), la polarité de beaucoup de composés varie avec le pH du solvant. Par conséquent, leur solubilité dépend aussi de l'acidité/basicité du solvant. Par exemple, **Sheabar and Neeman (67)** ont constaté une extraction maximale de polyphénols à partir de grignons d'olive à pH 4. L'extraction à différents pH peut aussi permettre d'obtenir des extraits riches en différents groupes de substances. Par exemple, une extraction à pH 6 a permis d'obtenir de meilleurs rendements en composés phénoliques, tandis que le pH 10 a été optimal pour extraire les acides gras et les protéines à partir de fibres d'avoine (68).

L'effet de la concentration du solvant est également significatif (0.00013). La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature chimique dans la plante, qui peut varier du simple au très fortement polymérisé. Il y a aussi toujours la possibilité d'interaction entre les composés phénoliques et d'autres composants tels que les glucides et les protéines qui peuvent conduire à la formation de complexes insolubles.

La nature du solvant est très importante pour pouvoir extraire les molécules d'intérêt et, si possible, de façon sélective. Le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et posséder une grande capacité de dissolution. Une faible viscosité facilitera la pénétration du solvant dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide. Une température d'ébullition peu élevée permettra de séparer les molécules extraites et le solvant en utilisant moins d'énergie. Il est toujours préférable d'utiliser des solvants ininflammables et non explosifs. En vue d'application des extraits dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques, il est important d'utiliser des solvants non toxiques (69).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales. Sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires.. Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, ainsi que leurs mélanges avec l'eau sont largement utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Les mélanges extraient souvent mieux les substances ciblées que les solvants purs (70). Par exemple, l'extraction des composés phénoliques à partir des légumineuses est optimale en utilisant un mélange éthanol / eau (70/30 ; VN) comme solvant (71).

Pour l'obtention d'extraits d'antioxydants phénoliques, l'eau et l'éthanol sont les solvants les plus couramment utilisés pour des raisons d'absence de toxicité et d'abondance, même si parfois il y a des solvants plus efficaces. Lorsque l'objectif de l'extraction est d'analyser la teneur de certains composés phénoliques dans les sources végétales les restrictions sont moindres et dans ces cas d'autres solvants (méthanol, acétate d'éthyle, éther éthylique etc) sont aussi utilisés (41).

La source est souvent préalablement découpée ou broyée pour faciliter l'extraction. La réduction de la taille des particules augmente la surface d'échange et ainsi la vitesse d'extraction (72). La diffusion interne est aussi plus rapide dans le cas de particules fines. Cependant les particules de taille très fine posent des problèmes technologiques comme par exemple, un tassement du lit de solides provoquant une diminution de la perméabilité du lit au solvant et l'établissement de courants préférentiels et d'endroits du lit où le solvant ne circule pas. Les particules très fines sont également plus difficiles à séparer de l'extrait liquide après la fin de l'extraction.

L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction aussi car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Cependant cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction. Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire. Des températures élevées au cours de l'extraction ou du séchage affectent la stabilité de certains composés phénoliques en raison de réactions impliquant des dégradations chimique et enzymatique, ou une décomposition thermique. **Larrauri, Rupérez (73)** Ont

RÉSULTATS ET DISCUSSION

constaté que la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols.

Plusieurs études ont montré une thermodestruction de certaines anthocyanines à températures élevées (de 45 à 100 °C). Les hautes températures peuvent avoir aussi un effet bénéfique sur l'activité antioxydante. Certains polyphénols augmentent leur capacité antioxydante par le processus de pyrolyse doux notamment dans le cas de l'acide caféique (74).

2.3. Effet des facteurs sur les réponses

Tableau N° 07:L'effet des facteurs sur chaque réponse (TPC, TFC et IP)

Facteurs Réponse	P-value du TPC	P-value du TFC	p-value d'IP
Ratio solide/liquide	<,0001	<,0001	<,0001
Solvant (ml)	0,0016	<,0001	0,0977
Ph	0,0385	<,0001	0,0004
Vitesse	0,0457	<,0001	0,0005
Température (°C)	0,9320	0,4802	0,3190
Diamètre (µm)	0,9929	0,0007	0,5729
Temps (mn)	0,9929	<,0001	0,0014

2.4. Etude de la corrélation entre les réponses et préparation de fractionnement « Optimisation »

Dans cette partie, nous sommes intéressés à l'étude de la corrélation éventuelle entre les réponses étudiées à savoir les composés phénoliques totaux, flavonoïdes et l'indice des phénols. Regardant la figure ci dessous qui montre la corrélation entre les trois réponses étudiées, on constate que les réponses étudiées sont satisfaisantes avec des facteurs de corrélation de 1.0000 ,0.5687 et 0.5753 pour les phénoliques totaux, flavonoïdes et l'indice des phénols respectivement (figures. 08 et 09).

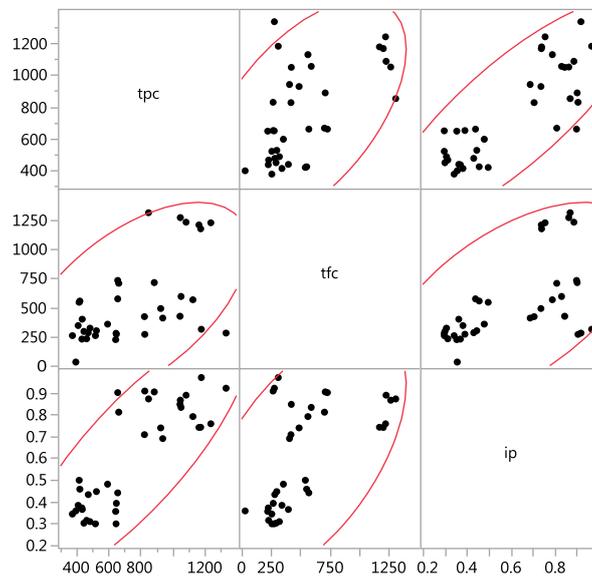


Figure 08 : La corrélation entre TPC, TFC et IP

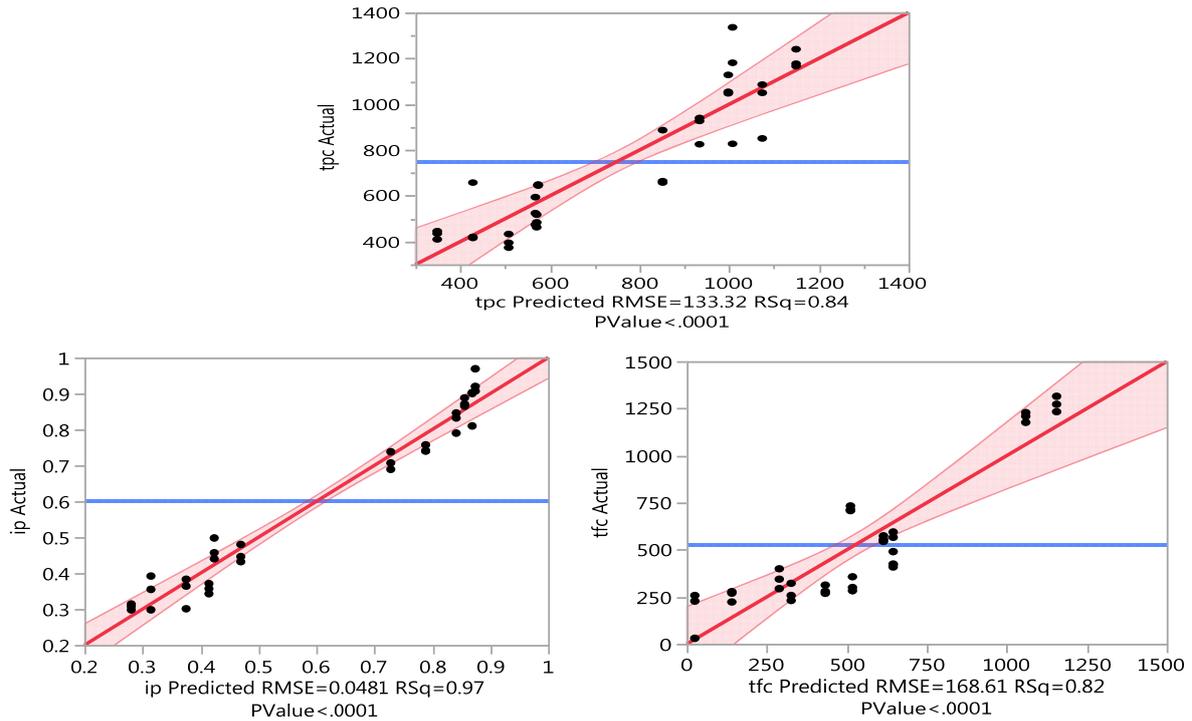


Figure 09 : Les graphes comparant les TPC, TFC et IP mesurés aux TPC, TFC et IP prédits.

3. Modélisation et optimisation : plan fractionnaire 2^{5-1}

3.1. Etude de contrastes

Le tableau N°08 donne les résultats du calcul du Box et indique les colonnes de signes qui sont égales. Par la relation d'équivalence, on déduit la structure des contrastes :

$$\text{Intercept} = \text{Ratio} * \text{pH} * \text{Vitesse} * \text{Temps} * \text{Diamètre} \quad (\text{Intercept} = 1 * 2 * 3 * 4 * 5)$$

Cela signifie que l'intercept est associé à l'interaction entre les facteurs ratio/pH/vitesse/temps/diamètre des particules.

C'est le générateur d'aliases que nous avons écrit :

$$\mathbf{I = 12345}$$

Le logiciel indique également les résultats des multiplications par 1, 2, 3 et 4. On a :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tableau N°08 : les résultats des multiplications générées.

Facteurs	Contrasts	Réponses
Diamètre = Ratio*pH*Vitesse*Temps	5=1*2*3*4	$l_5 = l_5 + l_1 + l_2 + l_3 + l_4$
Temps = Ratio*pH*Vitesse*Diamètre	4=1*2*3*5	$l_4 = l_4 + l_1 + l_3 + l_2 + l_5$
Vitesse = Ratio*pH*Temps*Diamètre	3=1*2*4*5	$l_3 = l_3 + l_1 + l_2 + l_4 + l_5$
pH = Ratio*Vitesse*Temps*Diamètre	2=1*3*4*5	$l_2 = l_2 + l_1 + l_3 + l_4 + l_5$
Ratio = pH*Vitesse*Temps*Diamètre	1=2*3*4*5	$l_1 = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5$
Intercept = Ratio*pH*Vitesse*Temps*Diamètre	I = 12345	$l_0 = l_0 + l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5$

Les facteurs principaux sont aliasés avec des interactions d'ordre 3. Comme ces dernières ont toutes les chances d'être faibles, on obtient des contrastes qui ont des valeurs très proches de celles des effets principaux.

Le logiciel indique également la manière dont les interactions d'ordre 2 sont aliasés :

Tableau N°09: Les interactions d'ordre 2

Facteurs	Contrasts	Réponses
Temps*Diamètre = Ratio*pH*Vitesse	4*5= 1*2*3	$l_4 + l_5 = l_4 + l_5 + l_1 + l_2 + l_3$
Vitesse*Diamètre = Ratio*pH*Temps	3*5=1*2*4	$l_3 + l_5 = l_3 + l_5 + l_1 + l_2 + l_4$
Vitesse*Temps = Ratio*pH*Diamètre	3*4=1*2*5	$l_3 + l_4 = l_3 + l_4 + l_1 + l_2 + l_5$
pH*Diamètre = Ratio*Vitesse*Temps	2*5=1*3*4	$l_2 + l_5 = l_2 + l_5 + l_1 + l_3 + l_4$
pH*Temps = Ratio*Vitesse*Diamètre	2*4=1*3*5	$l_2 + l_4 = l_2 + l_4 + l_1 + l_3 + l_5$
pH*Vitesse = Ratio*Temps*Diamètre	2*3=1*4*5	$l_2 + l_3 = l_2 + l_3 + l_1 + l_4 + l_5$
Ratio*Diamètre = pH*Vitesse*Temps	1*5=2*3*4	$l_1 + l_5 = l_1 + l_5 + l_2 + l_3 + l_4$
Ratio*Temps = pH*Vitesse*Diamètre	1*4=2*3*5	$l_1 + l_4 = l_1 + l_4 + l_2 + l_3 + l_5$
Ratio*Vitesse = pH*Temps*Diamètre	1*3=2*4*5	$l_1 + l_3 = l_1 + l_3 + l_2 + l_4 + l_5$
Ratio*pH = Vitesse*Temps*Diamètre	1*2=3*4*5	$l_1 + l_2 = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + l_5$

Les interactions d'ordre 2 sont aliasés deux à deux. Comme on ne peut pas négliger a priori les interactions d'ordre 2, ces contrastes vont poser des problèmes lors d'interprétation. Ces problèmes sont en partie résolus par l'adoption des hypothèses d'interprétation et par la possibilité d'effectuer des essais supplémentaires pour calculer séparément les coefficients des contrastes qui soulèvent des difficultés.

3.2. Estimation des paramètres de calculs

Le tableau N°10 donne une impression visuelle de l'importance de chaque contraste. On remarque que les variables qui affectent la grandeur d'intérêt (Rendement en TPC, TFC et DPPH) sont les suivants : ratio liquide/solide, le diamètre ces particules et la vitesse de l'extraction par ultrason (vitesse est présentée par les pulsations « continue et discontinue ». En revanche les autres variables à savoir, la concentration du solvant et le temps d'extraction n'influent pas significativement au niveau de confiance 95%.

Tableau N°10 : L'effet des paramètres sur le l'objectif de l'étude : cas des TPC.

Term		Estimation	Relative Std Error	Pseudo t-Ratio	
Ratio*Ph	Biased	560.00586	0.25	1.41	
Ratio*Vitesse	Biased	416.04015	0.25	1.04	
Ratio*Temps	Biased	339.99379	0.25	0.85	
pH*Diametre	Biased	337.71275	0.25	0.85	
Diametre	Biased	301.47645	0.25	0.76	
pH*Temps	Biased	286.03422	0.25	0.72	
Ratio	Biased	-284.1944	0.25	-0.71	
Temps*Diametre	Biased	265.53135	0.25	0.67	
pH*Vitesse	Biased	256.60574	0.25	0.64	
Ratio*Diametre	Biased	248.89787	0.25	0.62	
Vitesse*Temps	Biased	183.8949	0.25	0.46	
Vitesse	Biased	82.624756	0.25	0.21	
Ph	Biased	61.782157	0.25	0.16	
Vitesse*Diametre	Biased	51.38733	0.25	0.13	
Temps	Biased	-18.98512	0.25	-0.05	
Ratio*pH*Vitesse	Zeroed	0	0	.	
Ratio*pH*Temps	Zeroed	0	0	.	

En conclusion de l'analyse du plan fractionnaire 2^{5-1} , les informations sur les conditions d'optimisation sont semi-déterminées par conséquent, d'autres investigations (plan complémentaire) sont nécessaires afin d'aboutir aux réponses souhaitées dans ce travail.

4. Résultats du plan complémentaire

La figure N°10 montre la comparaison entre les réponses mesurées et les réponses calculées. D'après cette figure, on constate que les réponses calculées sont légèrement différentes des réponses mesurées, les points s'écartent un peu de cette droite. La limite de confiance à 95 % est indiquée par les courbes rouges pointillées, et plus ces courbes sont éloignées de la première droite bissectrice, plus grandes sont les différences entre les réponses calculées et les réponses mesurées.

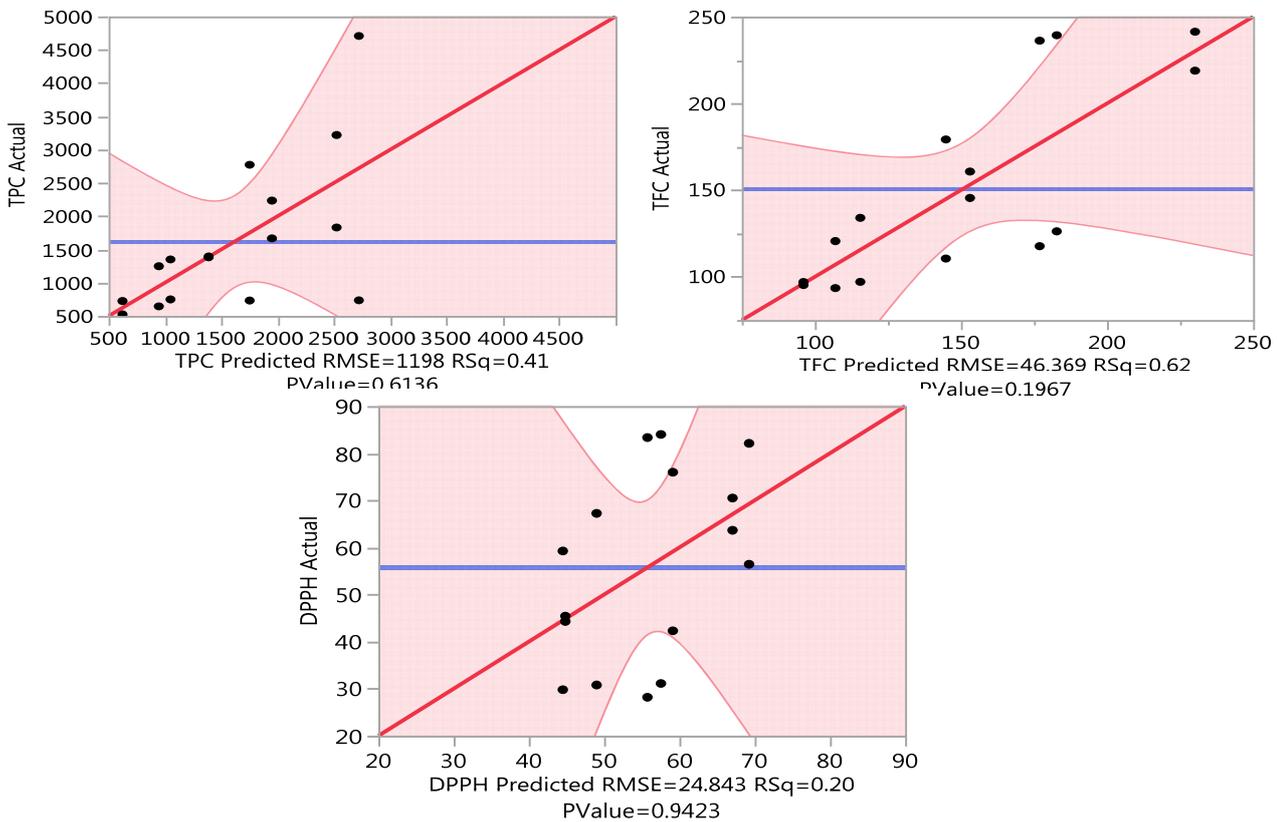


Figure 10 : Résultats expérimentaux vs théoriques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Interprétation des résultats des calculs

Les prédictions sous forme de surfaces de réponses dans le Figure N°11. On observe clairement l'influence importante du diamètre, le ratio ainsi que la vitesse sur les quantités de polyphénols et flavonoïdes récupérées, et sur la capacité antioxydante des extraits. Les surfaces de réponses montre bien la zone des réponses maximal, il suffit de choisir un réglage qui tient compte des contraintes expérimentales portant sur chacun des trois paramètres.

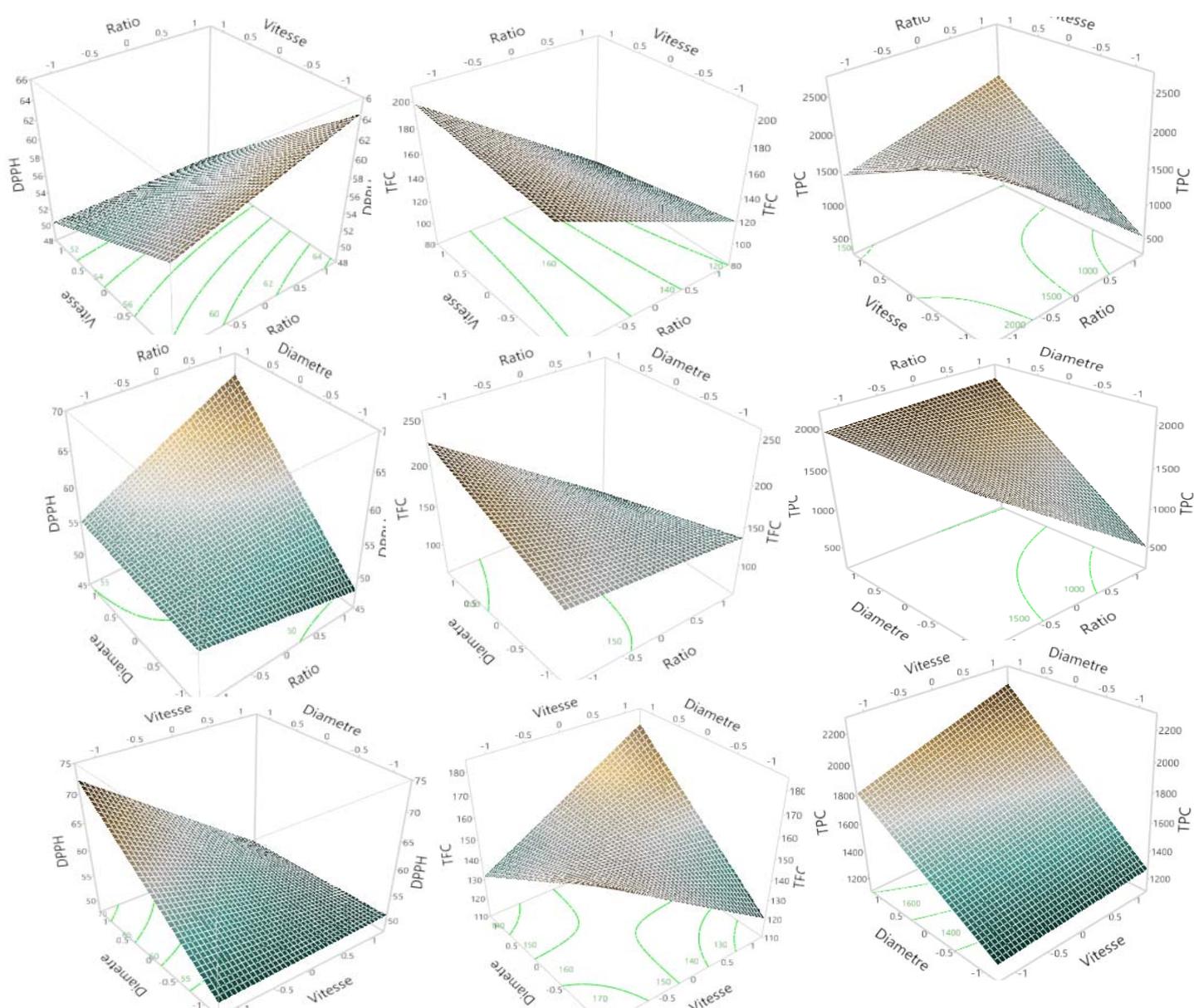


Figure N° 11 : surface de réponse des TPC, TFC et DPPH

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'examen des renseignements fournis par la figure N°12 nous permet de conclure que le model a trois facteurs est largement suffisant pour faire l'analyse des réponses mesurées. Notre objectif est de maximiser le rendement d'extraction des TPC, TFC et DPPH. Nous savons maintenant qu'il faut agir sur le ratio liquide/solide, la vitesse de l'extraction ainsi que le diamètre des particules, avec la prédiction profiler on voit clairement qu'il faut régler le ratio liquide/solide et la vitesse au niveau bas et le diamètre des particules au niveau haut. Si on veut avoir une vue d'ensemble de rendement d'extraction des trois facteurs on peut faire appel au contour profiler.

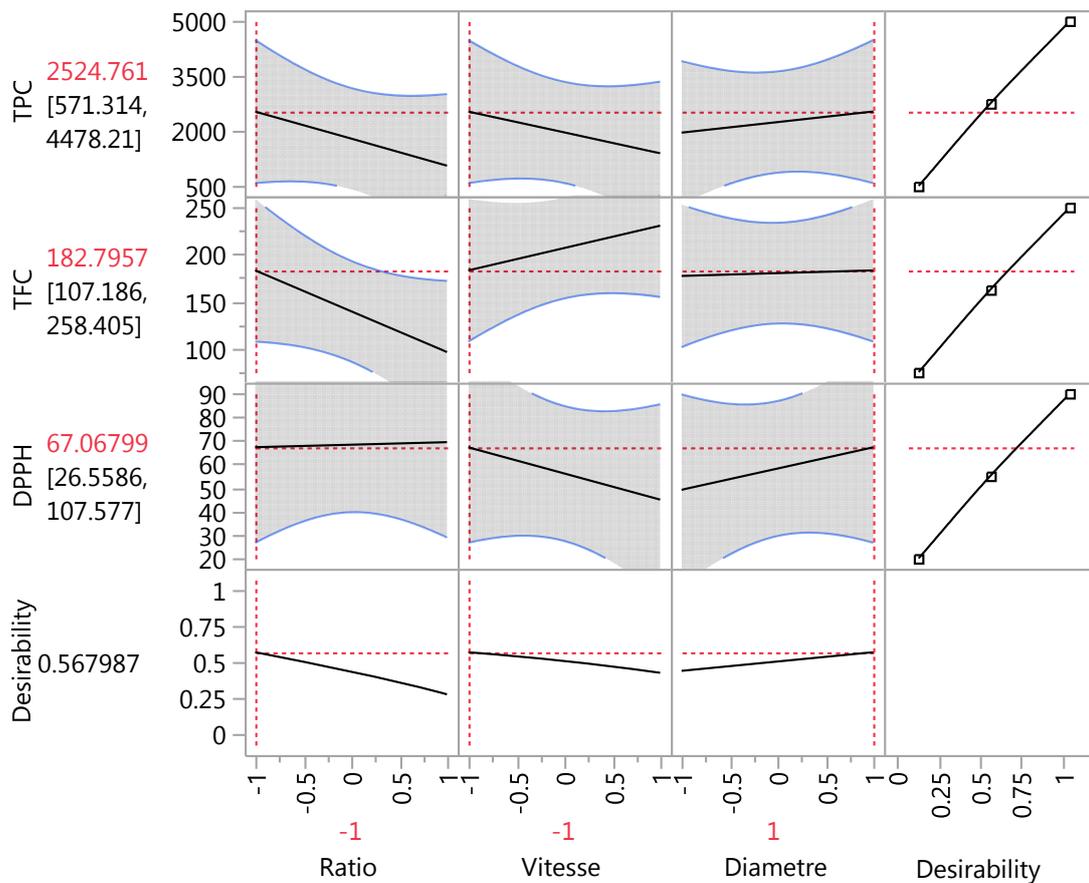


Figure N°12 : Optimisation des conditions de la sonication par la fonction de désirabilité

4.2. Conclusion de l'étude

Le rendement d'extraction est maximisé lorsque le ratio liquide/solide et la vitesse de l'extraction sont faibles et que le diamètre des particules est important. Ces réglages assurent un meilleur rendement des substances bioactives de la plante étudiée. On veillera particulièrement à la vitesse de l'extraction, qui est le facteur le plus influent.

Pour écrire les modèles, il suffit de reprendre les valeurs des coefficients des résultats des calculs. On a :

Rendement_{TPC}

$$\begin{aligned} &= 1619.92 - 284.19 \text{ Ratio} + 82.62 \text{ Vitesse} + 301.48 \text{ Diametre} \\ &+ 416.04 \text{ Ratio} * \text{vitesse} + 248.90 \text{ Ratio} * \text{Diametre} + 51.39 \text{ Vitesse} \\ &* \text{Diametre} + 286.03 \text{ Ratio} * \text{Vitesse} * \text{Diametre}. \end{aligned}$$

Rendement_{TFC}

$$\begin{aligned} &= 150.82 - 32.86 \text{ Ratio} - 1.42 \text{ Vitesse} + 3.20 \text{ Diametre} - 5.24 \text{ Ratio} \\ &* \text{vitesse} - 19.57 \text{ Ratio} * \text{Diametre} + 15.99 \text{ Vitesse} * \text{Diametre} \\ &- 3.87 \text{ Ratio} * \text{Vitesse} * \text{Diametre}. \end{aligned}$$

5. Validation expérimentale

Le modèle postulé à priori est validé statistiquement. Pour le vérifier expérimentalement afin de l'exploiter pour une éventuelle prédiction, nous avons testé ce modèle via un point test. Les résultats expérimentaux dans les conditions optimales sont montrés dans le tableau N°11.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tableau N°11 : Valeurs expérimentales et prédite pour le point test

Les coordonnées du point expérimental			Réponse TPC		Réponse TFC		Réponse DPPH	
Ratio	Vitesse	Diamètre	prédite	expérimental	prédite	expérimental	prédite	Expérimental
1/20	Discontinu	500µm	2513.3	2105.61	182.79	177.22	67.06	54.47

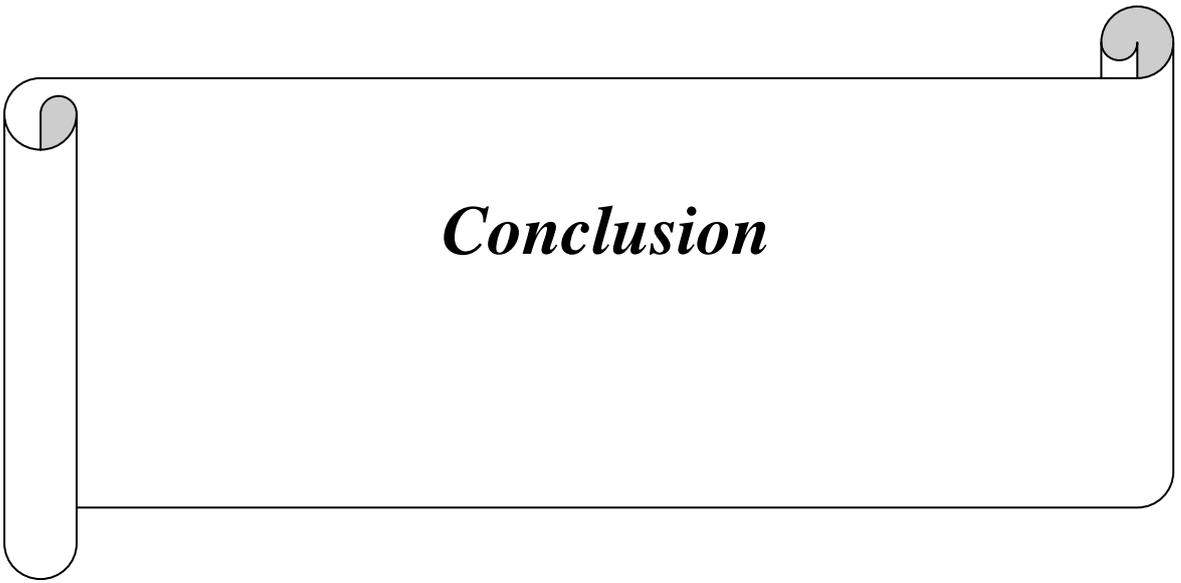
Les résultats présentés sur ce tableau montrent qu'il n'y a pas une grande différence entre la réponse expérimentale et celle prédite.

6. Comparaison entre les trois techniques (Ultrason, Microonde et Agitation).

Les résultats de la quantification des polyphénols, flavonoïdes et activité antioxydante des méthodes d'extraction (UAE, MAE et CSE) sont donnés dans le **tableau N°12**. D'après le tableau on remarque que les concentrations des TPC, TFC et DPPH des *Z. lotus* obtenues par la méthode de l'ultrason sont plus élevées à ceux obtenus par microonde et macération par agitation. Ce qui confirme que c'est plus avantageux de choisir l'ultrason comme méthodes d'extraction.

Tableau N° 12 : Résultats de TPC, TFC et DPPH selon les méthodes MAE, UAE, CSE (macération avec agitation).

Réponses Méthodes	TPC (mg AGE/100gMS)	TFC (mg QE/100gMS)	DPPH (%)
Ultrasons	3219,21±117.11	239,36±5.23	63,64±2.59
Microonde	3037.46±495.02	213.84±13.51	57.84±3.2
Agitation	2665.14±126.37	157,47±65.28	55.59±9.01

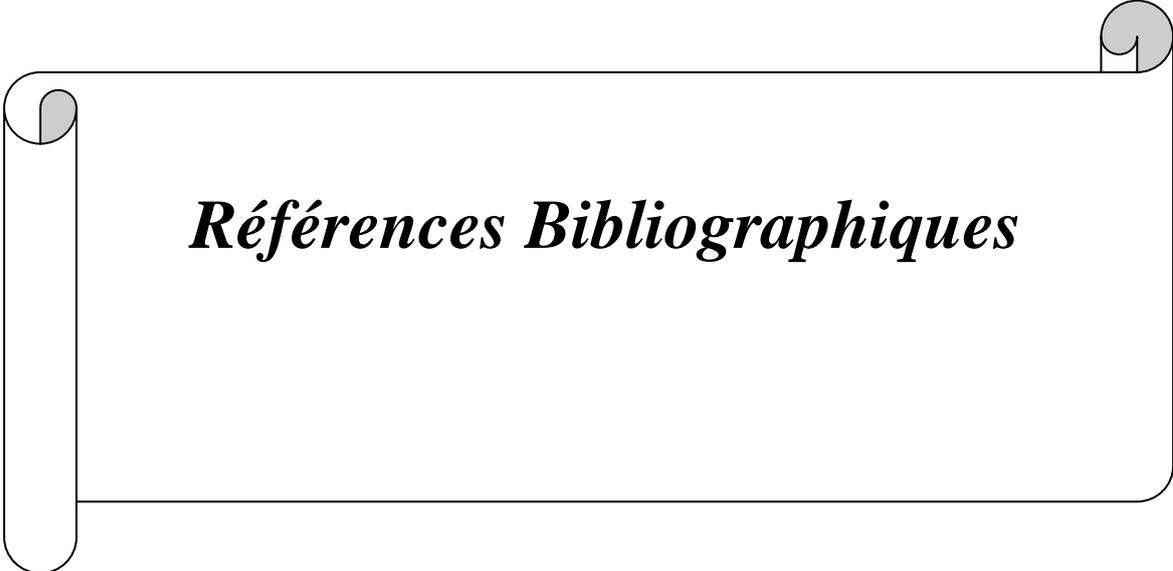


Dans ce travail, nous avons déterminé les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques en utilisant comme stratégie la méthodologie des plans d'expériences. Les résultats montrent clairement que la conception expérimentale est une méthode appropriée pour faire le criblage des facteurs agissant sur l'opération. Le plan de Plackett - Burman qui a été appliqué a conduit à un modèle du premier ordre dont les coefficients significatifs sont statistiquement relatifs aux facteurs les plus influents sur la réponse. Après la modélisation c'est faite par le plan fractionnaire puis l'optimisation par surface de réponse et validation par un test point.

L'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction de composés phénoliques à partir du fruit de *Z.lotus*. L'étude des effets des principaux paramètres opératoires a permis d'identifier les paramètres optimaux pour l'extraction. L'effet du ratio solide-liquide (1/20), les pulsations et le diamètre des particules (500µm) a été confirmé par les résultats du point test. L'application des ultrasons améliore considérablement les rendements d'extraction des composés phénoliques, en particulier quand les conditions opératoires sont mieux favorables pour l'extraction. La sonication permet de réduire le temps et l'énergie consommée durant l'opération par d'autres des techniques.

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

- Elargir le cadre de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par l'utilisation d'autres méthodes d'extraction et d'autres parties de plante avec l'étude de l'effets des autres paramètres .
- Prendre en considération d'autres réponses à optimiser en vue de développer les recherches pour d'autres composés de *Z.lotus*.
- Identification des principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques, avec la détermination des conditions optimales pour l'extraction de ces principes actifs.
- Elargir le palet des activités antioxydante *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques: anti tumorale, anti cancéreux, anti inflammatoire, anti diabétique, anti coagulant et autres



Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Michel T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*): Université d'Orléans; 2011.
2. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry*. 2015;166:585-95. Epub 2014/07/24.
3. Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdely C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007;45(3-4):244-9.
4. Gourguillon L, Destandau E, Lobstein A, Lesellier E. Comparison of different ways to extract dicaffeoylquinic acids from a halophytic plant. *COMPTES RENDUS CHIMIE*. 2016;19(9):1133-41.
5. Torreggiani A, Tamba M, Trincherio A, Bonora S. Copper (II)-Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure*. 2005;744:759-66.
6. Hynes MJ, Coinceanainn MnÓ. The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of inorganic biochemistry*. 2001;85(2-3):131-42.
7. ÓCoinceanainn Mn, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the reactions of aluminium (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and adrenaline. *Journal of inorganic biochemistry*. 2001;84(1-2):1-12.
8. Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;397(2):360-9.
9. Viollier E, Inglett P, Hunter K, Roychoudhury A, Van Cappellen P. The ferrozine method revisited: Fe (II)/Fe (III) determination in natural waters. *Applied geochemistry*. 2000;15(6):785-90.
10. Pascual-Reguera M, Ortega-Carmona I, Molina-Díaz A. Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*. 1997;44(10):1793-801.
11. Thompsen JC, Mottola HA. Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical chemistry*. 1984;56(4):755-7.
12. Afanas' ev IB, Dcrozshko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. 1989;38(11):1763-9.
13. De Souza RF, De Giovanni WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*. 2004;9(2):97-104.
14. Korkina LG, Afanas' Ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in pharmacology*: Elsevier; 1996. p. 151-63.
15. Afanas'eva IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Ibragimova GA, Korkina LG. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical pharmacology*. 2001;61(6):677-84.
16. Fukuzawa K, Saitoh Y, Akai K, Kogure K, Ueno S, Tokumura A, et al. Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2005;1668(1):145-55.
17. Jungbluth G, Rühling I, Ternes W. Oxidation of flavonols with Cu (II), Fe (II) and Fe (III) in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 2000(9):1946-52.
18. Karamać M, Pegg RB. Limitations of the tetramethylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(14):6425-31.

Références Bibliographiques

19. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47.
20. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *The Journal of nutrition*. 2007;137(10):2196-201.
21. Cheng J-C, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu Z-L. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure–activity relationship. *Food chemistry*. 2007;104(1):132-9.
22. Nagata T, Hayatsu M, Kosuge N. Identification of aluminium forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. *Phytochemistry*. 1992;31(4):1215-8.
23. Dangleterre L. Apport des spectroscopies moléculaires à l'étude des mécanismes de fixation d'ions métalliques polluants par les substances humiques. Complexation de Al (III), Pb (II) et Zn (II) par des systèmes modèles: Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I; 2007.
24. Abdoul-Azize S. Potential Benefits of Jujube (*Zizyphus Lotus* L.) Bioactive Compounds for Nutrition and Health. *J Nutr Metab*. 2016;2016:2867470. Epub 2017/01/06.
25. Cheurfa M, Allem R, Zabel K, Aichouni W, Medjkane M. Étude des effets des extraits des racines de *Glycyrrhiza glabra* L. et *Zizyphus lotus* L. sur quelques bactéries pathogènes de l'Homme. *Phytothérapie*. 2017.
26. El Hachimi F, Alfaiz C, Bendriss A, Cherrah Y, Alaoui K. Activité anti-inflammatoire de l'huile des graines de *Zizyphus lotus* (L.) Desf. *Phytothérapie*. 2017;15(3):147-54.
27. Quezel P, Santa S, Schotter O. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2. 1962.
28. Abdoul-Azize S, Bendahmane M, Hichami A, Dramane G, Simonin A-M, Benammar C, et al. Effects of *Zizyphus lotus* L. (Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *International Immunopharmacology*. 2013;15(2):364-71.
29. Borgi W, Ghedira K, Chouchane N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. *Fitoterapia*. 2007;78(1):16-9.
30. Abdel-Zaher AO, Salim SY, Assaf MH, Abdel-Hady RH. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;101(1-3):129-38.
31. Al-Saeedi AH, Al- Ghafri MTH, Hossain MA. Comparative evaluation of total phenols, flavonoids content and antioxidant potential of leaf and fruit extracts of Omani *Zizyphus jujuba* L. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*. 2016;18(1):78-83.
32. Makino R, Ohara S, Hashida K. Efficient extraction of polyphenolics from the bark of tropical tree species. *Journal of Tropical Forest Science*. 2009:45-9.
33. Diouf PN, Stevanovic T, Cloutier A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food chemistry*. 2009;113(4):897-902.
34. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*. 2011;126(4):1821-35.
35. PERRUT M. Extraction par fluide supercritique. *Techniques de l'ingénieur Génie des procédés*. 1999;2(J2770):J2770. 1-J. 12.
36. Murga R, Ruiz R, Beltrán S, Cabezas JL. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(8):3408-12.
37. Pansera MR, Iob GA, Atti-Santos AC, Rossato M, Atti-Serafini L, Cassel E. Extraction of tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004;47(6):995-8.

Références Bibliographiques

38. Chupin L, Maunu S, Reynaud S, Pizzi A, Charrier B, Bouhtoury FC-E. Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*. 2015;65:142-9.
39. Proestos C, Komaitis M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-food science and technology*. 2008;41(4):652-9.
40. Routray W, Orsat V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(2):409-24.
41. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17(6):300-12.
42. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*. 2007;1(1):7-18.
43. ANIZON J-Y, LEMAIRE B, SURBLED M. Extraction assistée par micro-ondes. *Techniques de l'ingénieur Agroalimentaire*. 2003;2(F3060):F3060. 1-F. 11.
44. Poirier J. Analyse de la variance et de la régression. Plans d'expérience: Ed. Techniques Ingénieur; 1993.
45. Naima R, Oumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A, et al. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*. 2015;70:245-52.
46. Assou M, Madinzi A, Aboulhassan MA, Souabi S. Removal of Turbidity in Tannery Waste Water: Modelling by the Experimental Design. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, ISSN. 2014:1701-8285.
47. Gyliénė O, Aikaitė J, Nivinskienė O. Recovery of EDTA from complex solution using Cu (II) as precipitant and Cu (II) subsequent removal by electrolysis. *Journal of hazardous materials*. 2004;116(1-2):119-24.
48. Schössler K, Jäger H, Knorr D. Effect of continuous and intermittent ultrasound on drying time and effective diffusivity during convective drying of apple and red bell pepper. *Journal of Food Engineering*. 2012;108(1):103-10.
49. Eskilsson CS, Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 2000;902(1):227-50.
50. Bashi DS, Mortazavi SA, Rezaei K, Rajaei A, Karimkhani MM. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*. 2012;21(4):1005-11.
51. Shirsath S, Sonawane S, Gogate P. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2012;53:10-23.
52. Mason T, Cintas P, Clark J, Macquarrie D. *Handbook of green chemistry and technology*. Blackwell Science, Oxford. 2002;372.
53. Goupy J. Modélisation par les plans d'expériences. *Techniques de l'ingénieur Mesures et contrôle*. 2000(R275):R275. 1-R. 23.
54. George AL, Bennett A. *Case studies and theory development in the social sciences: mit Press*; 2005.
55. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144-58.
56. Serra Bonvehí J, Soliva Torrentó M, Centelles Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(4):1848-53.
57. Safdar MN, Kausar T, Jabbar S, Mumtaz A, Ahad K, Saddozai AA. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*. 2017;25(3):488-500.

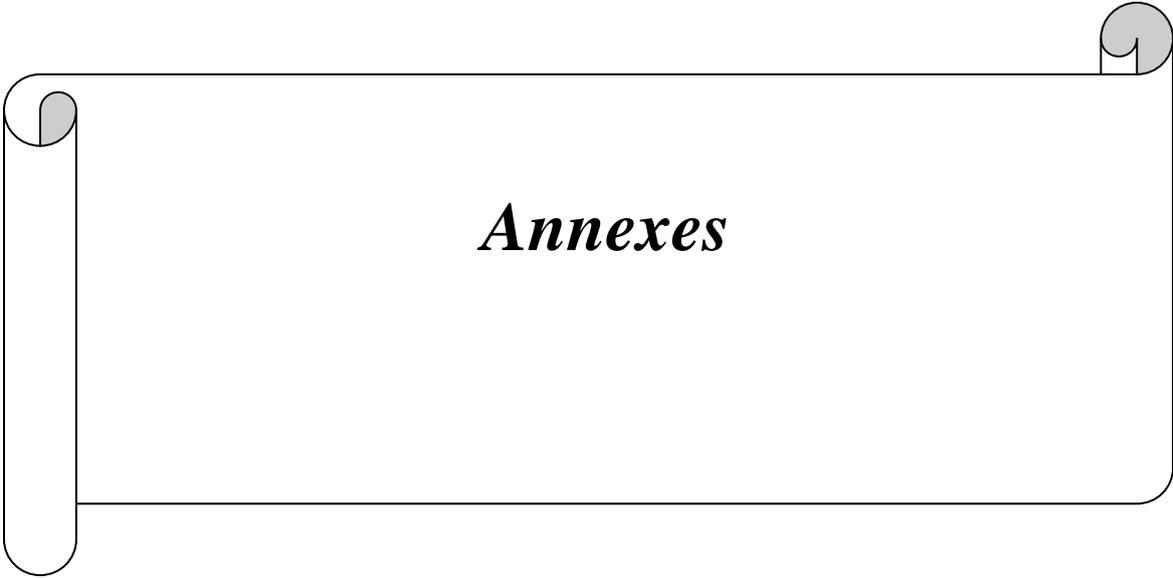
Références Bibliographiques

58. Khennouf S, Amira S, Arrar L, Baghiani A. Effect of some phenolic compounds and quercus tannins on lipid peroxidation. *World Appl Sci J.* 2010;8(9):1144-9.
59. Dudonné S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Mérillon J-M. 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.* 2009;57(5):1768-74.
60. Lanouari S, Nasser B, El Haddoury J, Bencharki B. Caractérisation physico-chimique des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*) sous traitement herbicide par l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique [Physico-chemical characterization of the seeds of bread wheat (*Triticum aestivum*) under herbicide treatment with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid]. *International Journal of Innovation and Applied Studies.* 2015;10(2):604.
61. GHALEM M. Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria* 2014.
62. Abdeddaim M. Etude de la composition biochimique des fruits de cinq espèces végétales présentes dans la région des aurès en vue de leur utilisation alimentaire ou pharmacologique (*celtis australis* L, *crataegus azarolus* L, *crataegus monogyna* J, *elaegnus angustifolia* L, et *zizyphus lotus* L) 2018.
63. Birgitta G, Gullick C, editors. Exploring the potential of indigenous wild food plants in Southern Sudan. Proceeding of a Workshop held in Lokichoggio, Kenya; 2000.
64. Ruiz-Rodríguez B-M, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata M-C, Cámara M, Díez-Marqués C, et al. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International.* 2011;44(5):1244-53.
65. Abdoul-Azize.

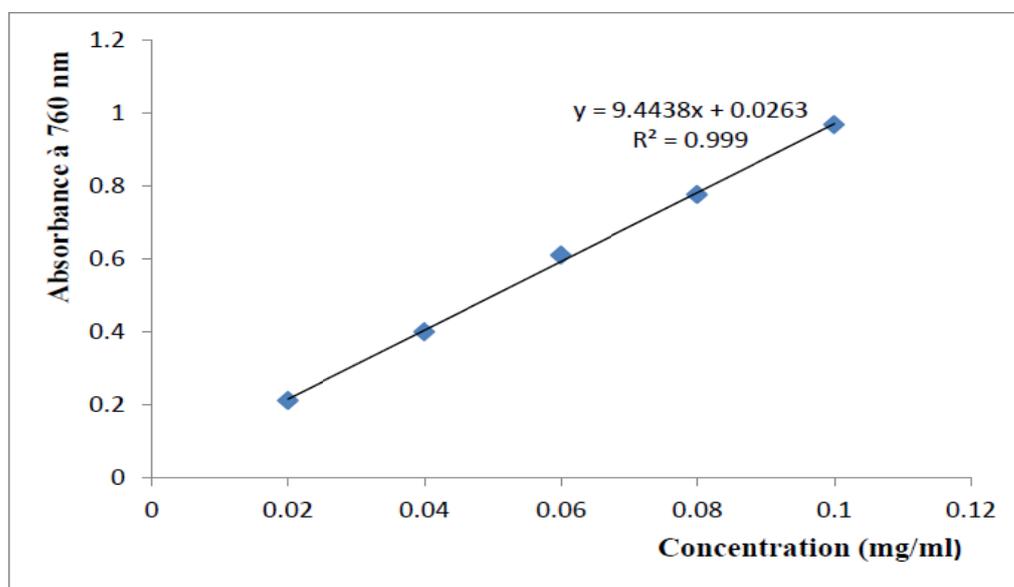
Potential Benefits of Jujube (*Zizyphus Lotus* L.) Bioactive

Compounds for Nutrition and Health. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2016;Volume 2016,(Article ID 2867470):13.

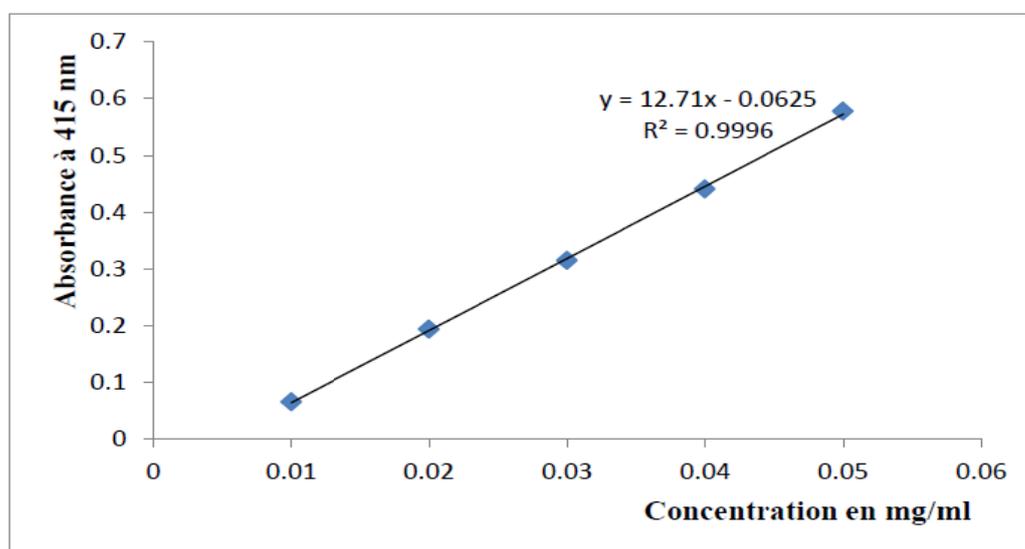
66. Khouchlaa A, Talbaoui A, El Idrissi AEY, Bouyahya A, Lahsen SA, Kahouadji A, et al. Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie.* 2018;16(1):14-9.
67. Sheabar FZ, Neeman I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1988;65(6):990-3.
68. Lehtinen P, Laakso S. Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1998;46(12):4842-5.
69. Marinova E, Yanishlieva N. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food chemistry.* 1997;58(3):245-8.
70. Penchev PI. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions: INPT; 2010.
71. Prati S, Baravelli V, Fabbri D, Schwarzingher C, Brandolini V, Maietti A, et al. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *Journal of separation science.* 2007;30(4):491-501.
72. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering.* 2007;81(1):236-42.
73. Larrauri JA, Rupérez P, Saura-Calixto F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1997;45(4):1390-3.
74. Nićiforović N, Abramović H. Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2014;13(1):34-51.



Annexes



Annexe 01: Calibration par la courbe d'acide gallique



Annexe 02: Calibration par la courbe de quercitine.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, ce travail consiste, à extraire les composés phénoliques du fruit de *Zizyphus lotus* issue de la région Djelfa ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante par le test de DPPH: Ce fruit a été soumis à l'extraction solide-liquide assistée par ultrason en utilisant l'eau comme solvant avec une optimisation des conditions d'extraction (solvant, diamètre, ratio, température, vitesse, pH et le temps), par l'application de la méthodologie des plans d'expériences. En effet, ces plans ont permis de sélectionner les paramètres influents l'opération qui sont le ratio solide/ liquide (1/20), les pulsations ultrasonique et le diamètre des particules 500µm. Le dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et DPPH a été fait par la méthode colorimétrique. Les résultats obtenus dans les conditions optimales sont 3219.21 ± 117.11 , 239.36 ± 5.23 et 63.64 ± 2.59 respectivement. Ces résultats ont révélé qu'ils sont meilleurs que sont obtenus par l'extraction par microonde et agitation.

Mots clés : *Zizyphus lotus* ; composés phénoliques ; méthodes d'extraction ; activité antioxydante ; Ultrasons.

Abstract

Natural extracts from plants contain a variety of biologically active molecules. In this context, this work consists, in extracting the phenolic compounds from the *Zizyphus lotus* fruit from the Djelfa region as well as the evaluation of the antioxidant activity by the DPPH test: This fruit has been subjected to Ultrasonic-assisted solid-liquid extraction using water as a solvent with optimization of the extraction conditions (solvent, diameter, ratio, temperature, speed, pH and time), by the application of the experimental plans. Indeed, these plans have made it possible to select the parameters influencing the operation which are the ratio 1/20, the discontinuous speed and the diameter 500µm. The total polyphenols, flavonoids and DPPH were determined by spectrophotometer. The results of their concentration in the optimal conditions are 3219.21 ± 117.11 , 239.36 ± 5.23 and 63.64 ± 2.5 respectively. These results revealed that they are better than are obtained. by microwave extraction and maceration with stirring.

Key words: *Zizyphus lotus*, phenolic compounds, extraction methods, antioxidant activity.

المستخلصات الطبيعية من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيا. في هذا السياق، هذا العمل يتمثل في استخراج المركبات الفينولية من فاكهة السدر للمنطقة الجلفة وتقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار DPPH تعرضت هذه الفاكهة لاستخراج الصلبة والسائلة بمساعدة الموجات فوق الصوتية باستخدام الماء كمذيب مع ضبط ظروف استخراج (المذيبات، نسبة القطر، ودرجة الحرارة، وسرعة، ودرجة الحموضة والوقت)، من خلال تطبيق منهجية تصميم التجارب. في الواقع، وتستخدم هذه الخطط لتحديد معايير التأثير على العملية التي هي نسبة الصلب / السائل (20/1)، بالموجات فوق الصوتية قطر الجسيمات 500 µm. تم تحديد إجمالي polyphenols ، flavonoids و DPPH بواسطة طريقة اللونية. النتائج التي تم الحصول عليها في ظل الظروف المثلى هي: 3219.21 ± 117.11 و 239.36 ± 5.23 و 63.64 ± 2.59 على التوالي. وكشفت هذه النتائج أنه أفضل من التي يتم الحصول عليها عن طريق استخراج الميكروويف والتحرك.

كلمات البحث: مركبات فينولية، طرق الاستخراج، نشاط مضاد للأكسدة، الموجات فوق الصوتية، *Zizyphus lotus*