

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : physiologie cellulaire et physiopathologie
Présenté par :

ADJAL Samiha & CHOUDANI Fatima

Thème

***Optimisation d'extraction des polyphénols des grains de
Pinus halepensis Mill. Par des méthodes conventionnelles et
non conventionnelles***

Soutenu le : 02 / 07 / 2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. LEKBAL Farouk

MCA

Univ. de Bouira

Président

M.KADRI Nabil

MCA

Univ. de Bouira

Promoteur

M. REMINI Hocine

MCB

Univ. de Bouira

Co-Promoteur

M. DAHMOUNE Farid

MCA

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciement

Au terme de notre travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères Au bon Dieu pour la patience et la santé qui nous ont été utiles tout au long de notre parcours.

Il nous est agréable de remercier notre promoteur M. KADRJ.N pour nous avoir assuré l'encadrement.

Et tout particulièrement notre Co-promoteur M. REMINI.H pour son aide précieuse et ces conseils avisés autant que pour sa disponibilité que pour le temps qu'il nous a consacré.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Monsieur K. MADANI directeur de laboratoire 3BS.

Comme nous sommes très reconnaissantes à tous les membres de laboratoire de 3BS pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de notre travail, en particulier Melle Sarah GUEMOUNI.

Nous remercions également M. LEBBAL F qui a bien voulu présider le jury Ainsi que M. DAHMOUNE .F pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Enfin, on remercie profondément nos chers parents pour leur soutien moral et matériel durant nos études ainsi que toute personne ayant contribué de près

ou

de loin à la réalisation de ce travail.

Samaha et Fatima

La liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ABTS : 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ANOVA-MANOVA : Analyse de la variance pleuri et mono critères..

E.A.A : Equivalent d'Acide Ascorbique.

E.A.G : Equivalent d'Acide Gallique.

FeCl₂ : Chlorure ferreux

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliqué.

P : Probabilité.

RMS : Méthode de Surface de Réponse.

TPC : Teneur en Composés Phénoliques.

UFC : Unité formant Colonies.

CCD : central composite design

H : heure

C° : degré siliceuse

JMP : John's Machintosh Project

Liste des figures

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure N°1 | (a) arbre de pin d'Alpe. (b) fruit de pin d'Alep (c) les feuilles de pin d'Alep. | 2 |
| Figure N°2 | les différentes classes des polyphénols. | 5 |
| Figure N°3 | principe de l'ultrason. | 9 |
| Figure N°4 | Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH* et un antioxydant. | 16 |
| Figure N°5 | Mécanisme réactionnel de la réduction du radical ABTS*. | 17 |
| Figure N°6 | schéma de protocole de détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques. | 19 |
| Figure N°7 | Intervalle de confiance observé par rapport aux valeurs prédites du CCD. | 30 |
| Figure N°8 | Analyse de surface de réponse pour le rendement phénolique total des grains de <i>Pinus halepensis</i> Mill avec l'extraction assisté par Micro-onde. | 33 |
| Figure N°9 | Surface de réponse d'interaction X_1^2 . | 33 |
| Figure N°10 | Intervalle de confiance observé par rapport aux valeurs prédites du CCD. | 35 |
| Figure N°11 | Analyse de surface de réponse pour le rendement phénolique total des grains de <i>Pinus halepensis</i> Mill avec l'extraction assistée par macération. | 38 |
| Figure N°12 | Pouvoir réducteur des optimums étudiés. | 40 |
| Figure N°13 | Pourcentage d'inhibition du radical DPPH ⁺ des optimums étudiés. | 41 |
| Figure N°14 | Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ des optimums étudiés. | 41 |
| Figure N°15 | diamètre de zone d'inhibition des extraits étudiés vis à vis des souches bactériennes étudiées. | 42 |

liste des tableaux

| | | |
|---------------------|---|----|
| Tableau I | classification de <i>Pinus halepensis</i> Mill | 3 |
| Tableau II | Appareillage et réactifs utilisés | 10 |
| Tableau III | Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques assistés par micro-onde | 13 |
| Tableau IV | conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques assistés par macération. | 14 |
| Tableau V | Niveaux des variables choisies pour les essais de l'extraction par micro-onde. | 14 |
| Tableau VI | Niveaux des variables choisies pour les essais de l'extraction par macération. | 14 |
| Tableau VII | Résultats d'expériences à un seul facteur pour l'extraction assistée par macération de graine de <i>Pinus halepensis</i> Mill | 20 |
| Tableau VIII | Résultats d'expériences à un seul facteur pour l'extraction assistée par micro-ondes de graine de <i>Pinus halepensis</i> Mill. | 23 |
| Tableau IX | Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expériences CCD de la poudre des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill avec la méthode de macération . | 26 |
| Tableau X | Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expériences CCD de la poudre des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill par micro-ondes. | 27 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau XI | Conditions optimales et résultats prédites et expérimentaux des dosages des TPC par macération et par micro-ondes. | 28 |
| Tableau XII | Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré. | 31 |
| Tableau XIII | Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée. | 34 |
| Tableau XIV | Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré. | 35 |
| Tableau XV | Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée. | 39 |

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

| | |
|-----------------------------|---|
| Introduction générale | 1 |
|-----------------------------|---|

Synthèse bibliographique

| | |
|---|---|
| <i>I-Pinus halepensis</i> | 2 |
| <i>I-1-Description botanique</i> | 2 |
| <i>I-1-1-Genre Pinus</i> | 2 |
| <i>I-1-2- Espèce Pinus halepensis</i> | 2 |
| <i>I-1-3-Taxonomie</i> | 3 |
| <i>I-2- Composition chimique de grain Pinus halepensis Mill</i> | 3 |
| <i>I-3- Utilisation traditionnelle</i> | 4 |
| <i>I-4- Propriétés biologique</i> | 4 |
| <i>II- Les composés phénoliques</i> | 5 |
| <i>II-1- Définition</i> | 5 |
| <i>II-2- Propriétés biologiques des polyphénols</i> | 5 |
| <i>II-3-les méthodes d'extraction</i> | 6 |
| <i>II-3-1-Méthodes d'extractions traditionnelles</i> | 6 |
| <i>II-3-1-1- Décoction</i> | 7 |
| <i>II-3-1-2- Infusion</i> | 7 |
| <i>II-3-2- Méthodes d'extraction conventionnelles</i> | 7 |
| <i>II-3-2-1- Extraction par Macération</i> | 7 |
| <i>II-3-2-2- Extraction par Soxhlet</i> | 8 |
| <i>II-3-2-3- Extraction au CO₂ supercritique</i> | 8 |
| <i>II-3-3- Méthodes d'extraction non conventionnelle</i> | 8 |
| <i>II-3-3-1- Extraction par Ultrasons</i> | 9 |
| <i>II-3-3-2- Extraction par Micro-ondes</i> | 9 |

Partie pratique

| | |
|---|----|
| I-Matériel et méthodes | 11 |
| I-1-Matériel végétal | 11 |
| I-1-1-Prétraitements du matériel végétal | 11 |
| I-1-2-Délipidation des grains de <i>Pinus halepensis</i> Mill | 12 |
| I-2-Optimisation des conditions d'extraction polyphénols totaux | 12 |
| I-2-1-1-Extraction des polyphénols totaux assistée par solvant/ micro-onde. | 12 |
| I-2-1-2-Extraction des polyphénols totaux assistée par solvant macération..... | 13 |
| I-2-2-Dosage des polyphénols totaux..... | 15 |
| I-2-3- Détermination de l'activité antioxydante..... | 15 |
| I-2-3-1-Pouvoir réducteur | 15 |
| I-2-3-2- Test DPPH ⁺ | 16 |
| I-2-3-3- Test ABTS ⁺ | 17 |
| I-2-4-Détermination de l'activité antibactérienne..... | 18 |
| I-2-4-1Test d'activité antibactérienne..... | 18 |
| I-2-4-2-Standardisation des souches..... | 18 |
| I-2-4-3-Test d'activité antibactérienne..... | 18 |

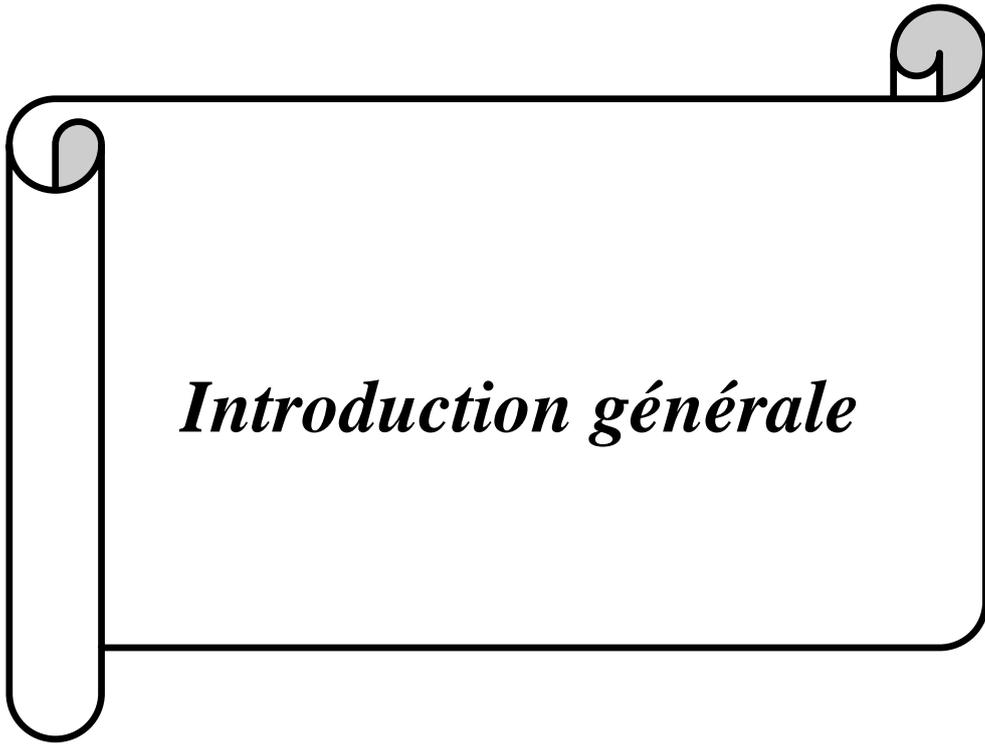
Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| II-1-extraction des composés polyphénoliques des grains de <i>Pinus halepensis</i> Mill | 20 |
| II-1-1-Essais préliminaires d'extraction polyphénols totaux..... | 20 |
| II-1-2-Plans d'expériences (CCD)..... | 26 |
| II-1-2-1-Validation du model micro-onde | 30 |
| II-1-2-2-Validation du model macération | 35 |
| II-2-Activités antioxydantes | 39 |
| II-2-1- Réduction du chlorure ferrique..... | 48 |
| II-2-2-Pouvoir antiradicalaire..... | 39 |
| II-2-2-1- Test DPPH ⁺ | 40 |
| II-2-2-2-Test ABTS ⁺ | 41 |
| II-3-L'activité antibactérienne..... | 42 |

Conclusion et perspectives..... 55

Références bibliographiques

Résumé



Introduction générale

Introduction générale

Le règne végétal, représentant une source importante d'une grande variété de molécules bioactives qui ont été mises à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie (**Bahorun et al., 1996**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90% de la médecine traditionnelle en Afrique (**OMS, 2003**).

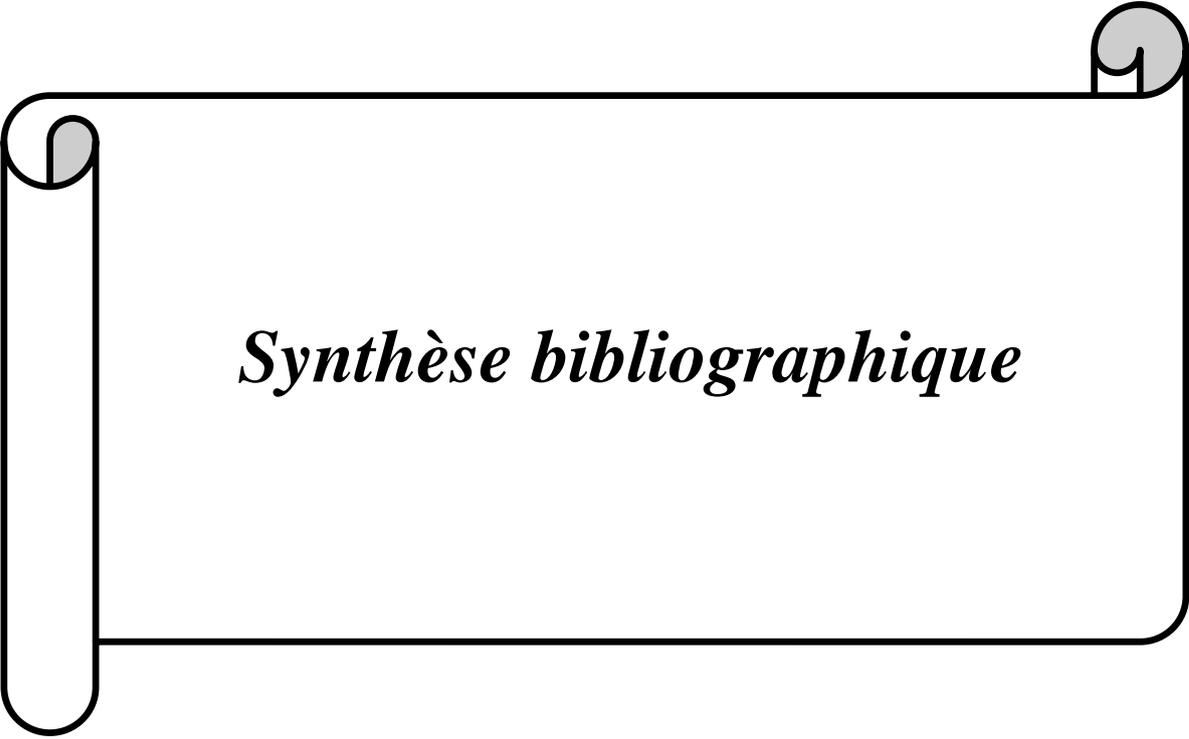
Actuellement les industriels développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tanins et les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Les polyphénols, en particulier, sont doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique, expliquant ainsi leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (**Bruneton, 2009**).

Vu la diversité de composition et les différentes sources naturelles des polyphénols, un protocole d'extraction universel de ces composés n'est pas conseillé, et des processus spécifiques et optimisés doivent être désignés pour leur extraction (**Pinelo, Rubilar, Jerez, Sineiro, & Núñez, 2005**).

La famille des résineuses, spécialement le groupe " halepensis " représente un capital forestier majeur sur le pourtour de la méditerranée. Les graines de cette plante a été choisie sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle locale comme antiseptique des voies respiratoires et urinaires, antifongique, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobien et anti tumoraux (**Motte-Florac, 2000**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des graines de *Pinus halepensis*, comparaison avec les deux méthodes d'extraction macération et micro- onde en appliquant le modèle de plan d'expérience centrée, et étudiée l'activité antioxydante et antimicrobienne.



Synthèse bibliographique

I- *Pinus halepensis*

I-1-Description botanique

I-1-1-Genre *Pinus*

Le genre *Pinus* appartient à la famille des pinacées, il comprend plus de 120 espèces aux branches étalées qui occupent une aire de répartition morcelée sur tout le pourtour méditerranéen, appelés aussi les résineux ou sécrétrices de la résine, une substance visqueuse utilisée dans la fabrication de nombreux produits. Ils sont des arbres ou plus rarement des arbustes aux rameaux régulièrement verticillés. Les feuilles sont persistantes en forme d'aiguilles (FARJON, 1996)

I-1-2-Espèce *Pinus halepensis*

Le pin d'Alep doit son nom à Miller qui l'a décrit en 1768. Il a été décrit auparavant pour la première fois en 1755 par Duhamel du Monceau sous un autre nom (eaux, forêts, recherches, & expériences, 1933): *Pinus hierosolimitana*; il a reçu par la suite plusieurs appellations (Nahal, 1962). (Naczk & Shahidi, 2006), on l'appelle aussi parfois *pin* blanc. Cette résineuse se trouve dans les régions côtières de la méditerranée. Elle est capable de s'adapter aux plusieurs types de sol et aux climats variés. Le pin d'Alep est un arbre de 5 à 20 m de hauteur et d'une longévité qui peut atteindre 300 ans. Son tronc est tortueux avec une écorce de couleur gris argent. Ses aiguilles mesurent de 6 à 10 cm de longueur et sont groupés par deux. Ses fruits sont des cônes de 8 à 12 cm de longueur, qui renferment des graines environ 5 mm de longueur.

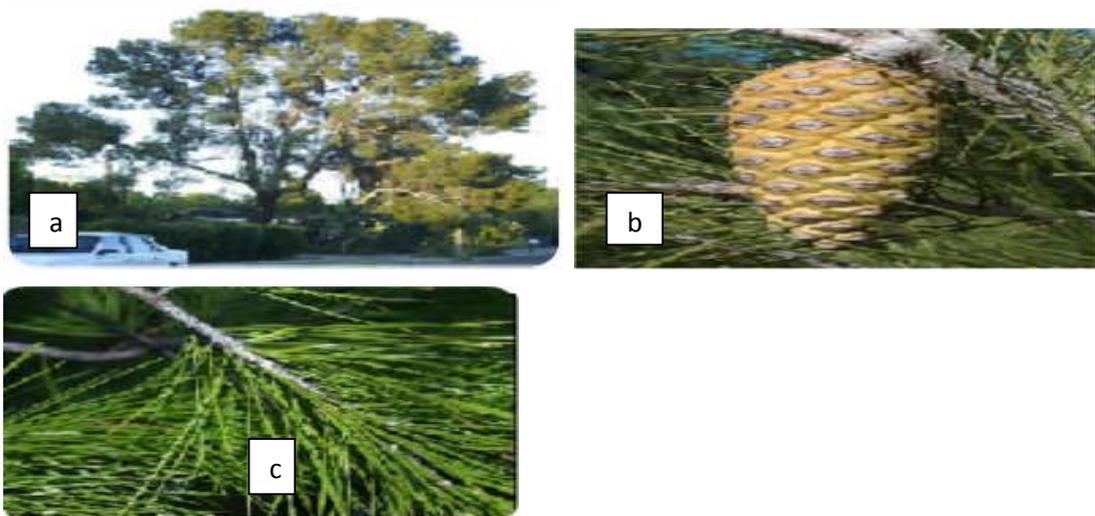


Figure 1 : *Pinus halepensis* Mill :a) arbre b) fruit c) feuilles

I-1-3-Taxonomie

La classification de *Pinus halepensis* Mill est la suivante (FARJON, 1996)

Tableau I : classification de *Pinus halepensis* Mill.

| Classification | |
|---------------------|-------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Spermaphyta |
| Sous- embranchement | Gymnosperme |
| Classe | Pinopsida |
| Ordre | Abiales |
| Famille | Pinacées |
| Sous-famille | Pinoïdeae |
| Genre | <i>Pinus</i> |
| Sous-genre | <i>Eupinus</i> |
| Espèce | <i>Pinus halepensis</i> Mill. |

I-2-Composition biochimique des graines de *Pinus halepensis* Mill.

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de pin ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélé que ces graines sont riches en plusieurs constituants hétérogènes tels que les lipides, les protéines, les sucres, et les composés phénoliques, dont la teneur varie d'une espèce à une autre selon les conditions géographiques et climatiques.

Les graines de *Pinus halepensis* Mill sont très riches en métabolites primaires (Sucres, protéines, lipides) et secondaires (Phénols totaux flavonoïdes, huiles essentielles...) comme elles présentent une importante concentration en oligo-éléments (Phosphore, potassium, magnésium, Zinc, fer, cuivre et manganèse). Les études phytochimiques réalisées sur les graines de *Pinus halepensis* Mill. Ont montré qu'elles sont composées de 22,7% de protéines, 43,3% d'huile, 8,3% de cendre, 25,7 % de

glucides, et une faible quantité (1%) des éléments minéraux (K, Mg, Ca⁺²)(**Cheikh-Rouhou et al., 2006**).

I-3-Utilisations traditionnelles du genre *Pinus*

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle algérienne comme : Antiseptique puissant à action dynamisant ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires et les calculs biliaires. C'est aussi un rubéfiant et balsamique efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes. Les sirops, les infusions, les tisanes. Les jus de *Pinus halepensis* Mill sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire. On utilise les bourgeons de cette espèce en parfumerie et en savonnerie. Mais, les principales utilisations de pin sont liées à la production de bois comme bois d'industrie ainsi que pour la charpente ou la menuiserie. Il est aussi utilisé pour la protection des sols et dans le domaine cosmétique expliqué par sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturels(**Boulaacheb, 2009**).

I-4-Propriétés biologiques des graines de pin d'Alep

Parmi toutes les espèces de pins employées dans les recherches scientifiques, le pin d'Alep occupe une place très importante dans les études récentes grâce à ses graines.

Ces graines sont très utilisées en médecine traditionnelle mais aussi dans le domaine agroalimentaire (la pâtisserie) .Plusieurs études indiquent que leurs métabolites présentent diverses activités biologiques. Les travaux qui ont été réalisés dans ce contexte montrent qu'elles présentent des activités antioxydant et anti inflammatoire qui sont en générales associées à la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Elles ont aussi montré qu'elles pouvaient être utilisées dans la prévention des maladies liées à l'angiogenèse et pour la lutte contre le cancer. (**Nabil Kadri et al., 2014**)

II- Les Composés phénoliques

II-1-Définition

Les composés phénoliques, issus des plantes, présentent un intérêt croissant et reçoivent de plus en plus d'attention ces dernières années en raison de leurs fonctions bioactives. Ces composants sont connus en tant que métabolites végétaux secondaires

Synthèse bibliographique

et possèdent également des propriétés antimicrobiennes, antivirales et anti inflammatoires ainsi qu'une capacité antioxydante élevée (**Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999**). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure (**Kühnau, 1976**). Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné (**Bruneton, 2009**). La figure suivante regroupe les différentes classes de polyphénols(**Bravo, 1998**).

| Squelette carboné | Classe | Exemple | Origine |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------------|
| C ₆ | Phénols simples | Catéchol | Nombreuses espèces |
| C ₆ -C ₁ | Acides hydroxybenzoïques | <i>p</i> -hydroxybenzoïque | Epices, fraise |
| C ₆ -C ₃ | Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes | Acide caféique, acide férulique | Pomme de terre, Pomme, citrus |
| | Coumarines | Myristicin, eugénol | |
| | Isocoumarines | Scopolétine | |
| | Chromones | Myristicine, eugénol | |
| C ₆ -C ₄ | Naphtoquinones polyphénols | Eugenine | Noix |
| C ₆ -C ₁ -C ₆ | Xanthones | Juglone, plumbagine | |
| C ₆ -C ₂ -C ₆ | Stilbènes | Mangiferine | |
| | Anthraquinones | Resvératrol | Vigne |
| C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoïdes, isoflavonoïdes | Anthraquinones | |
| (C ₆ -C ₃) ₂ | Lignanes | Quercétine, cyanidine, daidzéine | Fruit, légumes, fleurs, soja, pois |
| | Neolignanes | Pinorésinol | Pin |
| (C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂ | Biflavonoïdes | Eusiderine | |
| (C ₆ -C ₃) _n | Lignines | Amentoflavone | |
| (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n | Tanins condensés | | Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki |

Figure 02 : Les différentes classes des polyphénols.

II-2-Propriétés biologiques des polyphénols

Chez les plantes, les composés phénoliques sont impliqués dans différents processus comme la germination des graines et la croissance des plantes(**Macheix, Fleuriet, and Jay-Allemand (2005)**).

Ces dernières années les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques, antioxydant et même anticancéreuse.

-Activité anti-inflammatoire :

Les propriétés anti-inflammatoires des composés phénoliques peuvent être dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (Aquilano, Baldelli, Rotilio, & Ciriolo, 2008).

-Activité antioxydantes :

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur capacité à piéger les radicaux libres, donner l'atome d'hydrogène et électron et chélate les cations métalliques.

-Activité antibactérienne :

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Williamson & Manach, 2005).

-Activité anticancéreuse :

Les flavonoïdes et autres phénols peuvent jouer un rôle préventif dans le développement du cancer. Ils interviennent dans l'étape d'initiation comme piègeurs des mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation de l'ADN muté. Durant les étapes de promotion et de progression, ils agissent comme des agents supprimeurs de tumeurs par différents mécanismes comme l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Pincemail, Meurisse, Limet, & Defraigne, 1999).

II-3-Les Méthodes d'extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols s'effectuent par différents procédés classiques et intensifiés, (Panja, 2017). Les premières techniques d'extraction de produits aromatiques d'origine végétale ont vu le jour lorsque l'Homme a pris conscience de l'intérêt de la nature qui l'entourait et de ses bienfaits. Depuis ces temps très anciens, les diverses civilisations du monde entier ont chacune apporté une pierre à l'édifice dans le domaine de l'extraction. (Lucchesi, 2005)

II-3-1-Méthodes d'extraction traditionnelles

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs. Les méthodes traditionnelles sont celles utilisant les procédés de base les plus simples pour extraire

l'extrait brut de la plante par l'intermédiaire de l'eau (pour les molécules hydrosolubles) ou de l'huile (pour les molécules liposolubles). Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales. **(Sacchi, Bisson, & Adams, 2005)**

II-3-1-1-Décoction

Est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable **(LEYBROS & FREMEAUX, 1990)**

II-3-1-2-Infusion

C'est la forme de préparation la plus simple durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. **(Singh, 2008)**. Elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de la matière végétale fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales **(Sofowora, 2010)**. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération

II-3-2-Les méthodes d'extractions conventionnelles

Les techniques conventionnelles d'extraction ou d'isolation de composés chimiques de matrices végétales présentent souvent des contraintes telles que celles des faibles rendements, des temps d'extraction très longs et d'utilisation de grandes quantités de solvants **(Achat, 2013)**.

II-3-2-1-Extraction par macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer de 4 à 10

jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives (**Galvan D'Alessandro, 2013**).

II-3-2-2-Extraction par soxlhet

L'extraction Soxlhet est une technique conventionnelle de récupération les plus élevés de caroténoïdes et des polyphénols (**De Castro & Garcia-Ayuso, 1998**). L'extraction par l'appareil de Soxlhet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules(**Galvan D'Alessandro, 2013; Lucchesi, 2005**).

II-3-2-3-Extraction au CO₂ supercritique

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au-delà de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de molécules à partir de matière végétale (**Azmir et al., 2013**).

Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. La basse viscosité des fluides supercritiques confère une capacité élevée pour la diffusion permettant l'accès du solvant aux composés phénoliques liés aux parois cellulaires. En outre, tous les processus de dégradation possibles, tels qu'oxydations ou isomérisations, sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit et que le processus d'extraction peut être suivi en absence de lumière et d'air. Toutefois, cette technique d'extraction présente comme inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique.(**da Silva, Rocha-Santos, & Duarte, 2016**).

II-3-3-Les méthodes d'extraction non conventionnelles

Les méthodes modernes ont été employées depuis le 18e siècle pour la séparation et l'isolement des principes actifs majoritaires des plantes médicinales et qui utilisent principalement des solvants organiques. Ces méthodes sont les plus employées

jusqu'à ce jour à l'échelle de laboratoire ou industrielle. Mais l'impact des solvants organiques sur l'homme et son environnement a incité les chercheurs à trouver des solutions pour diminuer ou éliminer leur usage, parmi elles les micro-ondes et les ultrasons. Toutes visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement(Achat, 2013).

II-3-3-1-Extraction par ultrasons

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons est une technique simple, efficace et peu coûteuse (Azmir et al., 2013) qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps soumise à l'action des ultrasons. Elle a été reconnue pour son application potentielle dans l'extraction des huiles essentielles (carvone, gingerols, huile d'amande...), des protéines (soja), des polyphénols, des anthocyanines, des saponines, des polysaccharides ainsi que dans la pasteurisation et la production de produits laitiers.(Azmir et al., 2013)

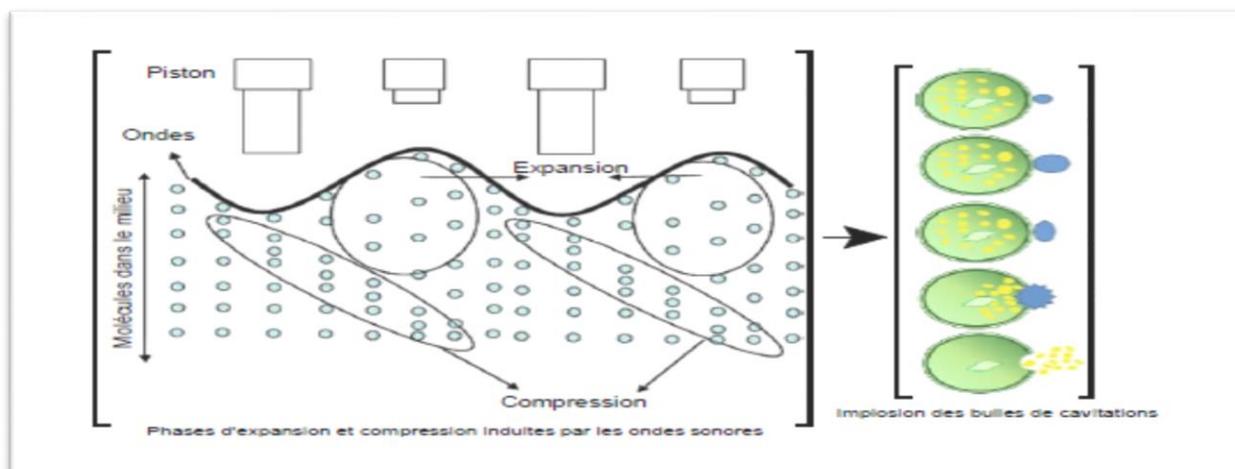


Figure 3: principe de l'ultrason

II-3-3-2-Extraction par micro-onde

L'extraction assistée par micro-ondes est un processus qui emploie l'effet des micro-ondes pour extraire les matériaux biologiques(Farhat, Ginies, Romdhane, & Chemat, 2009). Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur communiquer un mouvement de fluctuation ce qui se traduit donc par une augmentation de la température de la matière

Synthèse bibliographique

en question à la profondeur de pénétration. L'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble «solvant et matrice végétale solide»



Matériel et méthode

I-Matériel et méthodes

Tableau I : Appareillage et réactifs utilisés

| Matériels | Les réactifs |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Plaque magnétique agitatrice | Carbonate de sodium |
| Réfrigérateur (SAMSUNG) | Chlorure ferrique |
| Spectrophotomètre(SHIMADZU). | Ethanol |
| Vortex (VELP SCIENTIFICA) | Méthanol |
| Etuve ventilée (MEMMERT) | Ferricyanure de potassium |
| Tamiseur électrique | Réactif de Folin-Ciocalteu |
| Bain-marie (MEMMERT) | DPPH ⁺ |
| Bec benzène | ABTS ⁺ |
| Boîte bétie | Acide gallique, acide ascorbique. |
| Papiers filtre | Muller-Hinton. |
| Plaque agitatrice | Bouillon nutritif |
| Micro-onde(Maxi-power) | La poudre des grains de <i>Pinus</i> |
| Tamiseur électrique | Hexane |
| Appareil de soxhlet | Acide ascorbique |

I-1-Matériel végétal

Le travail réalisé s'agit de l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des graines de *Pinus d'halepensis* Mill. Et l'évaluation du rendement d'extraction et de quelques activités biologiques (activité antioxydante et antimicrobienne).

I-1-1-Prétraitement du matériel végétal

- **Séchage, broyage et tamisage**

. L'espèce *Pinus halepensis* Mill étudiée pousse à l'état spontané en Algérie. La présente étude s'intéresse aux fruits de cette espèce appelés « connes », plus particulièrement, à la graine contenue dans ces connes. Les connes ont donc été récoltées pendant le mois de février 2018 (durant son stade optimal de maturation) dans la région de Tikejeda (Algérie)

Après triage et nettoyage, les graines sont étalées sur un filet pour sécher à l'air libre et à l'abri du soleil (température ambiante) dans un endroit sec et ventilé, elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière a été ensuite tamisée à l'aide d'un tamiseur électrique afin d'avoir une poudre de taille inférieure à 150 µm et conservée dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière pour éviter toute détérioration de l'échantillon et pour la réalisation des extractions.

La délipidation a été réalisée selon la technique d'extraction conventionnelle par Soxhlet qui est une technique standard. Des quantités de 20 g ont été pesées et soumises à une extraction par Soxhlet pendant 6h avec l'hexane comme solvant d'extraction. (De Castro & Garcia-Ayuso, 1998)



Photo 3 : La poudre de grain de *Pinus halepensis* Mill après délipidation par soxhlet.

I-2-Optimisation des conditions d'extractions

Cette étape consiste à déterminer les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques contenus dans les graines de *Pinus halepensis* Mill par l'utilisation de deux méthodes d'extraction macération et par micro-onde.

Le modèle expérimental est divisé en deux parties. Un essai préliminaire est effectué pour déterminer les types des facteurs qui influent sur la réponse d'intérêt, ainsi que leur niveau haut et bas, selon la méthode classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres (Al-Farsi & Lee, 2008).

I-2-1-1-Extraction assistée par micro-ondes

Le four microonde utilisé au niveau du laboratoire 3BS est une microonde industrielle modifiée, qui fonctionne à une fréquence de 2450 MHz et une puissance de sortie maximale de 1000 W avec une incrémentation de 100 W.

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques des grains de *Pinus halepensis* Mill assisté par micro-ondes

| Type de solvant | Concentration d'éthanol(%) | Puissance (W) | temps (S) | Ratio (g/ml) |
|-----------------|----------------------------|---------------|-----------|--------------|
| Eau | 40 | 200 | 60 | 10 |
| Méthanol | 60 | 400 | 30 | 20 |
| Ethanol | 80 | 600 | 90 | 40 |
| | 100 | 800 | 120 | 60 |

I-2-1-2-Extraction par macération

L'extraction des polyphénols totaux par macération /agitation a été réalisée avec les mêmes solvants utilisés pour EAM. La poudre obtenue a été soumise à une extraction par macération selon la procédure décrite par (**Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad, & El-Elimat, 2007**), avec de légères modifications. Une prise d'essai de la poudre (250 mg) est mise en contact avec 10 ml de solvant d'extraction dans une plaque chauffante sous agitation pendant selon les conditions représentés dans le tableau IV. Le choix de la condition adéquate est déterminé selon la teneur en polyphénols totaux extraits.

Tableau IV: Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques des grains de *Pinus halepensis* Mill assisté par agitation.

| Type de solvant | concentration d'éthanol% | Temps (h) | Température (°C) | Ratio (g/mL) |
|-----------------|--------------------------|-----------|------------------|--------------|
| Eau | 40 | 1,5 | 25 | 10 |
| Ethanol | 60 | 3 | 37 | 20 |
| Méthanol | 70 | 4,5 | 50 | 40 |
| | 80 | 6 | 60 | 60 |

Application de plan Central Composite Désigné (CCD)

L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, à partir de la poudre des graines de Pinus selon la méthode de surface de réponse (MSR). Le plan est le CCD pour les deux méthodes d'extraction. Quatre facteurs (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) à trois niveaux (-1, 0 et +1) sont appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la poudre.

Tableau V : Niveaux des variables choisies pour les essais de l'extraction par micro-onde.

| X_1 Concentration (%) | X_2 puissances (w) | X_3 temps (s) | X_4 Ratio (g/ml) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| (-1) 40 | (-1) 400 | (-1) 30 | (-1) 20 |
| (0) 60 | (0) 600 | (0) 60 | (0) 40 |
| (+1) 80 | (+1) 800 | (+1) 90 | (+1) 60 |

Tableau VI : Niveaux des variables choisies pour les essais de l'extraction par macération

| X_1 Concentration (%) | X_2 températures (°C) | X_3 temps (h) | X_4 Ratio (g/ml) |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|
| (-1) 40 | (-1) 25 | (-1) 1.5 | (-1) 10 |
| (0) 55 | (0) 37.5 | (0) 2.25 | (0) 25 |
| (+1) 70 | (+1) 50 | (+1) 3 | (+1) 40 |

Le plan CCD comprend 30 essais dont l'essai centré (0, 0, 0) est répété six fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction.

I-2-2-Dosage des composés phénoliques totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par (Ahn et al., 2003) avec une légère modification. Une quantité de 100 µl de l'extrait est mélangée avec 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois) fraîchement préparé. Après 5 minutes, une solution de Na₂CO₃ à 7 % (1 ml) est ajoutée tout en agitant. Après une incubation de 30 min dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300 visible Spectrophotomètre), contre un blanc (le même mélange excepté l'extrait qui est remplacé par 100 µl d'éthanol 70%). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de poudre (mg EAG/g de poudre).

I-2-3-Détermination de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique des graines de *Pinus halepensis* Mill, deux méthodes ont été utilisées à savoir : la première est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux). La deuxième est l'évaluation du pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation d'un radical (DPPH⁺ et ABT⁺) par les antioxydants présents dans notre échantillon.

I-2-3-1-Pouvoir réducteur

L'analyse de pouvoir réducteur est basée sur la réduction de fer ferrique Fe³⁺ du ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe²⁺), en présence d'antioxydant réducteur. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait. La réduction de chlorure ferrique (FeCl₃) de l'extrait est déterminée selon la méthode décrite par (Lim, Lim, & Tee, 2007) Pour 1ml d'extrait sont ajouté 1ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50°C pendant 30 minutes dans un Bain Marie, 1,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés, le mélange est centrifugé à 3000 g. Ensuite, 1,5 ml du surnageant sont additionnés à 1,5 ml d'eau distillée et de 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%), l'absorbance est mesurée à 700 nm après 10 minutes.

L'évaluation du pourcentage de réduction du chlorure ferrique par rapport aux concentrations des standards (vitamine C) sont réalisées dans les mêmes conditions.

I-2-3-2- Test DPPH

La méthode du DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H (diphénylpicryl-hydrazine). La réduction du DPPH⁺ en DPPH-H induit un changement de sa couleur violette en jaune, dont l'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (Mansouri, Embarek, Kokkalou, & Kefalas, 2005).



Figure 4 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH⁺ entre l'espèce radicalaire DPPH⁺ et un antioxydant.

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités anti radicalaires des extraits végétaux (Lim et al., 2007).

✓ Protocole

Un volume de 100 μ L d'extrait est ajouté à 3 ml de la solution du DPPH (5,9 mg/250 ml d'éthanol) préparée fraîchement dans du méthanol. Le mélange est laissé 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 515 nm contre le blanc. L'activité anti

radicalaire des extraits a été exprimée en pourcentages d'inhibition du radical DPPH⁺ suivant l'équation suivante (ASADI et al. 2010) :

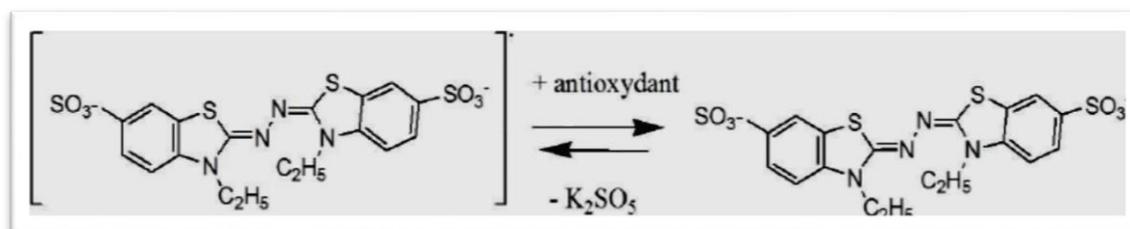


Figure 5 : Mécanisme réactionnel de la réduction du radical ABTS (Essalim et Serve, 1991).

✓ Protocole

Un volume de 50 µl d'extrait est additionné à 1 ml de la solution d'ABTS fraîchement préparée. L'absorbance a été lue à 734 nm après 6 min d'incubation au bain marie à 30 °C. Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ :

$$\% \text{ Inhibition} = ((\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Où : - % inhibition : pourcentage d'inhibition ;

-Abs contrôle : absorbance du contrôle ;

-Abs échantillon : absorbance de l'échantillon ;

I-2-3-3- piégeage du radical ABTS⁺

La méthode qui détermine l'activité scavenger du radical ABTS est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique ABTS⁺ de coloration bleu verte en le transformant en ABTS-H⁺ incolore par un don d'hydrogène. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant indique sa capacité de capture du radical libre (Re et al., 1999).

$$PI \% = [(Abs\ Contr\^ole - Abs\ Extrait) / Abs\ Contr\^ole] \times 100$$

D'où :

Abs Contrôle : Absorbance du témoin après 6 minutes à 734 nm.

Abs Extrait : Absorbance de l'extrait après 6 minutes à 734 nm.

I-2-4-Détermination de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits, vis-à-vis des sept souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Acinobacter*, *Salmonella*, et *Pseudomonas*), Les souches bactériennes issues institue de pasteur ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités. Les sept souches bactériennes sont des lots de « American Type Culture Collection » : ATCC.

L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide.

-2-4-1-Test d'activité antibactérienne

- **Standardisation des souches**

Une standardisation des souches est réalisée par dénombrement sur milieu solide pour l'obtention d'une suspension de 10^6 UFC/ml. Le but de la standardisation est d'avoir une charge homogène de toutes les souches étudiées pour pouvoir comparer l'effet antibactérien des extraits.

I-2-4-2-Test de l'activité antimicrobienne

Une dilution de 10^{-2} a été préparée à partir des souches mères de 10^8 UFC/ml obtenus après standardisation, et chaque souche a étéensemencé par des écouvillons dans les boîtes de pétri coulées de milieu gélose Muller Hinton. Des disques en papier (5 mm de diamètre) stériles sont imprégnés avec un volume de 10 μ l de notre extrait à tester. Un disque témoin imbibé de l'éthanol (à 70 et 80% est déposé dans chaque boîte.

Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37 °C pendant 24 h. L'activité antibactérienne des extraits testés est évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

I-2-5-L'analyse statistique

L'analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2010, pour déterminer les moyennes, les écarts-types et les coefficients de corrélation.

Les résultats des essais préliminaires sont analysés par XLSTAT 2018, basé sur l'analyse de la variance (ANOVA-MANOVA) (**test de Tukey**). Tous les résultats sont exprimés en moyennes de trois valeurs \pm écart types. D'autre part, les résultats expérimentaux du plan d'expérience de CCD sont analysés par le logiciel JMP (logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience).



Résultat et discussions

Résultats et discussions

Les résultats obtenus indiquent une influence du solvant sur les polyphénols extraits. Il s'avère que l'eau est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols avec $0,503 \pm 0,085$ mg EAG/g de poudre, en présentant une différence avec l'éthanol $0,45 \pm 0,017$ mg EAG/g de poudre et le méthanol, $287 \pm 0,032$ mg EAG/g de poudre. Cette variation de la teneur extraite est due probablement à la différence de polarité existant entre les solvants utilisés (Naczk & Shahidi, 2006). Mais l'éthanol a été choisi comme meilleur solvant d'extraction parce que l'extrait obtenu après l'extraction est trouble, ce qui risque de fausser les résultats malgré les fortes teneurs en TPC qui ont été obtenues avec l'eau.

- **Choix de la concentration du solvant**

En ce qui concerne l'influence de la concentration d'éthanol, la sélection de solvant d'extraction est essentielle car il permettra de déterminer la quantité et le type de composés phénoliques extraits, particulièrement l'éthanol, est le plus communément employé dans l'extraction phénolique de matériaux botaniques (F. Dahmoune, B. Nayak, K. Moussi, H. Remini, & K. Madani, 2015).

Le mélange solvant-eau distillé semble très efficace pour l'extraction des polyphénols, car l'eau en combinaison avec l'éthanol contribue à la création d'une moyenne modérément polaire qui assure à la fois l'extraction des composés phénoliques et la préservation de leur activité antioxydante.

L'étude statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les teneurs en polyphénols extraits par les différentes concentrations d'éthanol utilisées, allant de $0,243 \pm 0,002$ à $0,383 \pm 0,004$ mg EAG/g de poudre, la concentration d'éthanol idéale doit être égale ou au voisinage de 60%. (Les niveaux haut et bas de concentration du solvant sont (40, 55 et 70%)).

- **Choix du ratio du solvant**

D'après ces résultats et l'étude statistique faite, le ratio idéal pour l'extraction optimale des polyphénols est aux environs de 1/10, avec une teneur en polyphénols extraits de $0,458 \pm 0,004$ mg EAG/g de poudre.

Les teneurs les plus faibles ont été obtenues lorsque le milieu d'extraction est entièrement composé d'eau ou de solvant. Concernant les proportions 20%, 40% et

Résultats et discussions

60%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (**Chirinos, Campos, & Pedreschi**). l'intervalle de la ration d'extraction qui a été choisie est de (10, 25 et 40g/ ml) .

- **Choix de la température** : les niveaux haut et bas choisis est de (25,37.5 et 50°C)

La sélection de la température d'extraction est l'une des étapes importantes de l'optimisation. L'augmentation de la température améliore l'extraction des polyphénols, en rendant les membranes cellulaires plus perméables, et augmente la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire et elle diminue la viscosité du solvant ce qui facilite son passage dans les substrats solides. Cependant, les températures excessives peuvent causer la dégradation des composés phénoliques, ou cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction, ce qui limite les températures d'extraction à un certain seuil (**Careri, Elviri, Mangia, & Musci, 2000**).

D'après les résultats obtenus et l'étude statistique faite, qui montre une différence significative ($p < 0.05$) entre l'effet des températures utilisées sur les teneurs en polyphénols extraite, allant de $0,383 \pm 0,005$ à $0,458 \pm 0,004$ mg EAG/g de poudre. Mais aucune différence significative n'a été obtenue entre 37°C et 25°C c'est pour cela l'intervalle choisi a été de (25,37.5 et 50°C) même si les hautes teneurs en TPC ont été enregistrées à une température de 60°C : parce que à ce niveau élevé des températures y a un risque des destructions et détérioration des TPC et que la méthode de Folin chlorométrique utilisée n'est pas assez précise.

Ces résultats trouvés dans notre étude sont concordants avec les résultats d'autres auteurs ayant travaillé sur pin d'Alep (**Alu'datt et al., 2010**).

- **Choix du temps d'extraction** : Les niveaux sélectionnés pour cette analyse d'extraction (1.5h, 2.25 et 3h).

Le temps d'extraction est un autre paramètre principal dans la procédure d'extraction des composés phénoliques, il peut varier de quelques minutes à 24 heures (**Lapornik, Prošek, & Wondra, 2005**).

Résultats et discussions

Le temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela influence l'efficacité de l'extraction (**Michiels, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes, 2012**) Par contre, un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques (**Santos-Buelga, Gonzalez-Manzano, Dueñas, & Gonzalez-Paramas, 2012**)

L'étude statistique révèle une différence significative, entre les teneurs en polyphénols extraits à différents temps d'extraction, qui varient entre $0,118 \pm 0,004$ à $0,331 \pm 0,003$ mg EAG/g de poudre.

Ces résultats sont opposés aux données rapportées précédemment sur *grigno d'Olive* (**Alu'datt et al., 2010**) montrant une augmentation proportionnelle du rendement à l'augmentation de temps d'extraction.

II-2-Extraction des composés phénoliques par micro-onde

En général, l'efficacité d'extraction d'un composé est influencée par de multiples paramètres tels que : le temps, la puissance, l'acidité et la polarité du solvant entre autre. Les effets peuvent être indépendants ou interactifs (**Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005**). L'influence de ces paramètres a une importance majeure sur le rendement d'extraction des composés phénoliques.

Tableau VIII : Résultats d'expériences à un seul facteur pour l'extraction assistée par micro-ondes de graine de *Pinus halepensis* Mill

| Type de solvant | Puissance (W) | | Concentration éthanol(%) | | |
|-----------------|------------------|-----|--------------------------|-----|---------------------|
| | TPCmgEAG/g | | TPCmgEAG/g | | TPCmgEAG |
| Eau | $0,34 \pm 0,01$ | 200 | $0,25 \pm 0,005^c$ | 40 | $0,593 \pm 0,030^b$ |
| Méthanol | $0,36 \pm 0,002$ | 400 | $0,33 \pm 0,006^b$ | 60 | $0,62 \pm 0,043^a$ |
| Ethanol | $0,41 \pm 0,009$ | 600 | $0,62 \pm 0,004^a$ | 80 | $0,563 \pm 0,051^b$ |
| | | 800 | $0,58 \pm 0,003^a$ | 100 | $0,410 \pm 0,08^c$ |

| Temps (S) | Ratio (g/ml) | |
|-----------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 60 | TPCmgEAG/g $0,650 \pm 0,0301^b$ | 10 TPCmgEAG/g $0,1 \pm 0,000^c$ |

Résultats et discussions

| | | | |
|------------|---------------------------|----|---------------------------|
| 30 | 0,416±0,0302 ^a | 20 | 0,62±0,004 ^a |
| 90 | 0,316±0,0340 ^b | 40 | 0,216 ±0,001 ^b |
| 120 | 0,310±0,0330 ^b | 60 | 0,153±0,002 ^c |

- **Choix de solvant**

Le méthanol, l'éthanol et l'eau séparément sont utilisés généralement pour extraire les composés phénoliques à partir de la poudre des grains de *Pinus halepensis* Mill

D'après les résultats obtenus, tous les solvants ont la capacité d'extraire les composés phénoliques totaux.

Les taux d'extraction en polyphénols totaux les plus élevés sont enregistrés par les extraits éthanoïques suivis des extraits méthanoïques avec des teneurs de 0,41±0,009 mg EAG /g de poudre et 0,36±0,002 mg EAG /g de poudre respectivement, alors que l'extraction par l'eau a donné un taux faible de 0,34±0,002 mg EAG/g de poudre mais qui reste important.

Suite à l'étude réalisée, on constate que l'éthanol reste le solvant le plus approprié pour cette extraction. En effet, l'éthanol est un solvant généralement le plus appliqué pour des raisons hygiéniques et d'abondance (**Kiassos, Mylonaki, Makris, & Kefalas, 2009**), et par conséquent il a été employé comme solvant d'extraction pour la suite de nos analyses.

- **Choix de la concentration de solvant** : Les niveaux haut et bas choisis (40,60 et 80%) ;

L'analyse statistique révèle une différence significative ($p < 0.05$) entre les différentes concentrations. L'éthanol 60% a donné un meilleur rendement en polyphénols totaux avec un taux de 0,62±0,043 mg EAG/g de poudre, suivie de l'éthanol 40% avec une teneur de 0,593±0,030 mg EAG/g de poudre, suivie de l'éthanol 80% avec une teneur de 0,563±0,563 mg EAG/g alors que l'éthanol 100% a donné le taux le plus bas de 0,413±0,08 mg EAG/g de poudre.

L'allure des résultats obtenus est similaire avec celle des résultats (**Dahmoune et al., 2014**).

Résultats et discussions

- **Choix de la puissance de micro-onde :** Les niveaux haut et bas choisis (400,600 et 800 W)

D'après les résultats obtenus, l'extraction des composés phénoliques a été considérablement influencée par la puissance de la micro-onde. Les taux des composés phénoliques augmentent avec l'augmentation de la puissance d'extraction avec un taux maximal de $0,620 \pm 0.004$ mg EAG /g de poudre à 600 W, au de la de cette puissance le taux en ces composés diminue légèrement, on enregistre une teneur de $0,580 \pm 0.003$ mg EAG /g de poudre à 800 W.

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative ($p < 0.05$) entre 200 W, et les trois autres puissances (400, 600 et 800 W), par contre aucune différence significative n'a été enregistrée entre 600 et 800 W.

(**Dahmoune et al., 2013**) Ont étudié l'effet de la puissance des micro-ondes sur l'extraction des composés phénoliques totaux de *Myrtus*. Ils ont trouvés que la puissance augmentait considérablement les teneurs en TPC, ce qui confirme les résultats obtenus.

- **Choix de temps d'extraction les niveaux haut et bas choisis (30 ,60 et 90 S)**

Le temps d'extraction est un autre paramètre principal du procédé d'extraction. Les résultats obtenus indiquent que plus le temps d'extraction est long, meilleur est le taux des composés phénoliques avec une valeur maximale de $0,65 \pm 0.030$ mg EAG /g de poudre à 60 S. Au de la de cette période, le rendement baisse avec une valeur de 0.316 ± 0.03 à 90 S).

Cependant une exposition prolongée des rayonnements électromagnétiques pendant le processus d'extraction au micro-onde peut mener à la dégradation thermique des constituants bioactifs (**Hayat et al., 2010**) et la possibilité d'oxydation de ces composés (**Talli et al., 2010**), ce qui confirme les résultats obtenues .

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative ($p < 0.05$) entre 60 S, et les trois autres temps (30,90 et 120 S), par contre aucune différence significative n'a été enregistrée entre ces derniers.

Résultats et discussions

• Choix de ration de l'extraction

L'impact du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols des graines de *Pinus halepensis* Mill est mesuré avec les rapports 1 /10, 1 /20, 1/ 40 et 1/ 60. Une différence significative est enregistrée entre les différents rapports.

En augmentant le rapport solide/liquide de 1/20 à 1/60, on obtient un meilleur rendement d'extraction qui passe de $0,100 \pm 0.000$ mg EAG/g de poudre à $0,620 \pm 0.004$ mg EAG/g de poudre respectivement, au-delà de ce rapport les taux en composés phénoliques diminuent presque de moitié, il passe de $0,620 \pm 0.004$ à $0,153 \pm 0.002$ mg EAG/ g de poudre.

II-3-Plan d'expérience Central Composite Design (CCD)

✓ Macération

Beaucoup de paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols, comme la méthode d'extraction, la nature et la concentration du solvant, la température et le temps d'extraction et la puissance des ondes.

L'analyse des résultats est présentée dans le tableau suivant :

Tableau IX : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience CCD de la poudre des graines de *Pinus halepensis* Mill avec la méthode de macération.

| | Solvant (%) X ₁ | Température (C°) X ₂ | Temps (h) X ₃ | Ratio (g/ml) X ₄ | Valeurs réelles TPC (mg EAG/g) | Valeurs prédite TPC (mg EAG/g) |
|---|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 40 (-1) | 50(+1) | 1.5 (-1) | 40(+1) | 0.380 ± 0.005 | 0.626 |
| 2 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25(0) | 0.700 ± 0.005 | 0.749 |
| 3 | 55 (0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.637 ± 0.002 | 0.749 |
| 4 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25(0) | 40(+1) | 0.267 ± 0.0002 | 0.419 |
| 5 | 40(-1) | 25(-1) | 3(+1) | 40(+1) | 0.262 ± 0.0001 | 0.521 |
| 6 | 55(0) | 25(-1) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.633 ± 0.0012 | 0.430 |
| 7 | 70(+1) | 25(-1) | 1.5 (-1) | 40(+1) | 0.261 ± 0.005 | 0.526 |
| 8 | 70(+1) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.878 ± 0.006 | 1.175 |

Résultats et discussions

| | | | | | | |
|-----------|--------|---------|----------|---------|---------------|-------|
| 9 | 55(0) | 37.5(0) | 3 (+1) | 25 (0) | 0.550 ±0.001 | 0.698 |
| 10 | 40(-1) | 50(+1) | 1.5 (-1) | 10 (-1) | 1.566 ±0.0003 | 1.451 |
| 11 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.670 ±0.0021 | 0.749 |
| 12 | 55(0) | 37.5(0) | 1.5 (-1) | 25 (0) | 0.879 ±0.0009 | 0.924 |
| 13 | 70(+1) | 25(-1) | 3 (+1) | 40(+1) | 0.523 ±0.065 | 0.483 |
| 14 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 10 (-1) | 0.861 ±0.005 | 1.079 |
| 15 | 40(-1) | 50(+1) | 3 (+1) | 10 (-1) | 1.200 ±0.0023 | 1.041 |
| 16 | 40(-1) | 25(-1) | 1.5 (-1) | 40(+1) | 0.413 ±0.004 | 0.780 |
| 17 | 70(+1) | 50(+1) | 3 (+1) | 10 (-1) | 2.152 ±0.0001 | 2.142 |
| 18 | 70(+1) | 50(+1) | 1.5 (-1) | 10 (-1) | 2.488 ±0.0017 | 2.335 |
| 19 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.749 ±0.0004 | 0.749 |
| 20 | 55(0) | 50(+1) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.914 ±0.0001 | 0.935 |
| 21 | 70(+1) | 25(-1) | 1.5 (-1) | 10 (-1) | 1.197 ±0.0017 | 1.112 |
| 22 | 40(-1) | 50(+1) | 3 (+1) | 40(+1) | 0.379 ±0.002 | 0.308 |
| 23 | 40(-1) | 25(-1) | 1.5 (-1) | 10 (0) | 0.704 ±0.0009 | 0.996 |
| 24 | 70(+1) | 50(+1) | 3 (+1) | 40(+1) | 0.822 ±0.001 | 0.838 |
| 25 | 70(+1) | 50(+1) | 1.5 (-1) | 40(+1) | 1.090 ±0.0001 | 0.939 |
| 26 | 40(-1) | 25(-1) | 3 (+1) | 10 (-1) | 0.448 ± 0.008 | 0.445 |
| 27 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.495 ±0.0006 | 0.749 |
| 28 | 70(+1) | 25(-1) | 3 (+1) | 10 (-1) | 1.118 ±0.0062 | 0.978 |
| 29 | 40(-1) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.578 ±0.0005 | 0.752 |
| 30 | 55(0) | 37.5(0) | 2.25 (0) | 25 (0) | 0.702 ±0.004 | 0.749 |

Les résultats de la présente étude, montrent que les teneurs en composés phénoliques varient de 0,261 à 2,48 mg EAG/g de poudre. Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (concentration du solvant, température, temps et ratio) sur le taux des polyphénols extrait.

Résultats et discussions

✓ Micro-onde

Tableau X : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience CCD de la poudre des graines de *Pinus halepensis* Mill par microondes

| N° d'essai | éthanol (%) X_1 | Puissance (W) X_2 | Temps (S) X_3 | Ratio (g/ml) X_4 | Valeurs réelles TPC (mg EAG/g) | Valeurs prédites TPC (mg EAG/g) |
|------------|----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 40 (-1) | 400 (-1) | 30 (-1) | 20 (-1) | 0.480±0.0009 | 0.472 |
| 2 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 20 (-1) | 0.683±0.003 | 0.773 |
| 3 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.12±0.003 | 1.0003 |
| 4 | 60 (0) | 800 (+1) | 60 (0) | 40 (0) | 1.150±0.001 | 1.160 |
| 5 | 80 (+1) | 400 (-1) | 90 (+1) | 20 (-1) | 0.970±0.001 | 0.887 |
| 6 | 40 (-1) | 800 (+1) | 30 (-1) | 20 (-1) | 0.151±0.0004 | 0.751 |
| 7 | 40 (-1) | 400 (-1) | 90 (+1) | 20 (-1) | 0.847±0.0001 | 0.815 |
| 8 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 60 (+1) | 0.988±0.0005 | 0.915 |
| 9 | 80 (+1) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.520±0.0024 | 1.183 |
| 10 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.200±0.0009 | 1.0003 |
| 11 | 80 (+1) | 800 (+1) | 90 (+1) | 60 (+1) | 0.638±0.001 | 0.935 |
| 12 | 60 (0) | 600 (0) | 30 (-1) | 40 (0) | 1.057±0.002 | 0.832 |
| 13 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.200±0.004 | 1.0003 |
| 14 | 40 (-1) | 400 (-1) | 90 (+1) | 60 (+1) | 1.172±0.003 | 1.223 |
| 15 | 80 (+1) | 800 (+1) | 30 (-1) | 60 (+1) | 1.002±0.0005 | 1.006 |
| 16 | 80 (+1) | 400 (-1) | 30 (-1) | 60 (+1) | 1.406±0.005 | 1.407 |
| 17 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.191±0.0006 | 1.0003 |
| 18 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.188±0.002 | 1.0003 |
| 19 | 60 (0) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.199±0.001 | 1.0003 |
| 20 | 40 (-1) | 600 (0) | 60 (0) | 40 (0) | 1.050±0.005 | 1.001 |
| 21 | 80 (+1) | 800 (+1) | 30 (-1) | 40 (0) | 1.183±0.002 | 1.224 |
| 22 | 60 (0) | 600 (0) | 90 (+1) | 40 (0) | 1.237±0.001 | 0.969 |
| 23 | 40 (-1) | 400 (-1) | 30 (-1) | 60 (+1) | 0.736±0.008 | 0.800 |
| 24 | 80 (+1) | 800 (+1) | 90 (+1) | 20 (-1) | 0.972±0.001 | 0.980 |
| 25 | 40 (-1) | 800 (+1) | 90 (+1) | 60 (+1) | 1.403±0.007 | 1.268 |
| 26 | 80 (+1) | 400 (-1) | 30 (-1) | 20 (-1) | 1.222±0.003 | 1.167 |
| 27 | 60 (0) | 400 (-1) | 60 (0) | 40 (0) | 1.421±0.004 | 1.160 |
| 28 | 40 (-1) | 800 (+1) | 90 (+1) | 20 (-1) | 1.230±0.0003 | 1.224 |
| 29 | 40 (-1) | 800 (+1) | 30 (-1) | 60 (+1) | 0.746±0.003 | 0.716 |
| 30 | 80 (+1) | 400 (-1) | 30 (-1) | 60 (+1) | 1.476±0.006 | 1.407 |

L'optimisation des conditions d'extraction par micro-onde a été rapporté dans plusieurs études (Radojkovića, Zekovića, Jokićb, & Vidovića, 2012). En général, l'efficacité d'extraction d'un composé est influencée par plusieurs paramètres comme la température, le temps d'irradiation, la puissance et la polarité du solvant. Leurs effets peuvent être indépendants ou interactifs. Basées sur les observations des études

Résultats et discussions

préliminaires, les gammes de chaque variable indépendant (concentration en éthanol, puissance d'extraction, temps d'extraction et le ratio liquide/solide) influençant le TPC ont été choisies. Les réponses mesurées sont comparées à celles prédites pour l'estimation de l'écart et l'erreur expérimentale afin de vérifier la validité du modèle choisi. Les résultats ont montré que la teneur en polyphénols totaux varie de 0,480 à 1,520 mg EAG/g de poudre, impliquant que les facteurs (concentration du solvant, puissance, temps et le ratio) ont une influence significative sur le rendement d'extraction de ces composés bioactifs.

✓ Estimation des optimums de macération et de microondes

Tableau XI : Conditions optimales et résultats prédites et expérimentaux des dosages colorimétrique des TPC par macération et par microondes.

| | Ethanol (%) | Température (°C) | Temps (h) | Ratio (g/ml) | valeur expérimental TPCmgEAG/g | valeur Prédite TPCmgEAG/g |
|-------------------|--------------------|-------------------------|------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Macération | 70 | 50 | 1.5 | 10 | 2,55±0,001 | 2,456±0,217 |
| micro-onde | Ethanol (%) | Puissance (W) | Temps (S) | Ratio (g/ml) | | |
| | 80 | 400 | 30 | 43.3 | 1,683±0,0005 | 1,650±0,173 |

La valeur optimale en TPC est obtenue pour les conditions optimales de temps d'irradiation de 30 S, d'une concentration éthanol /eau de 80% et d'une puissance d'irradiation de 400 W avec un ratio de 43.3 ml alors que celles de macération sont : une concentration éthanol/eau 70% et une température 50°C pendant de 1.5h avec un ratio de 10 ml En effet, Il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en composés phénoliques prédite et celle obtenue par l'expérimentation pour les deux méthodes d'extraction respectivement :(2,45 ± 0.217 mg EAG/g de poudre et 2.55 ± 0.001mg EAG/g de poudre) pour macération et (1.65±0.173mg EAG/g de poudre ,1.68±0.0005mg EAG/g de poudre) pour microondes. Ce qui confirme la validité du plan d'expérience utilisé.

Les taux de métabolites secondaires polyphénols totaux des graines de *Pinus halepensis* Mill, obtenus par (N. Kadri et al., 2015). sont du même ordre de grandeur

Résultats et discussions

des taux que nous avons obtenus ($2,54 \pm 0,21$ mg EAG/g) de phénols totaux extraits par macération .

En effet, (N. Kadri et al., 2015) ont montré que les extraits de *Pinus halepensis* Mill contiennent $3,71 \pm 0,434$ en mg EAG/g en polyphénols totaux.

(N. Kadri et al., 2015) Ont rapportés des teneurs en polyphénols totaux de graines de quelques autres variétés de *Pinus* variant de 7,99 à 9,67 mg/g. Ces résultats sont supérieurs à la teneur obtenue dans le présent travail. Les différences peuvent être attribuées aux méthodes d'extraction, l'origine géographique, le degré de maturité, les facteurs climatiques et les conditions de stockage

II-3-1- validation des modèles expérimentaux

II-3-1-1-Validation du modèle micro-onde

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

✓ Coefficient de régression

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 (Chan, Lee, Yap, Aida, & Ho, 2009). Dans la présente étude, la valeur de R^2 est de 0,91, ce qui signifie qu'uniquement 0,09 des variations ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajustée est élevée (R^2 ajusté à 0,82), ce qui confirme la haute significativité du modèle. La valeur du R^2 ajusté (valeur du R^2 après élimination des coefficients inutiles du modèle) sera très inférieure à celle de R^2 si le modèle contient beaucoup de termes inutiles (non significatifs) (El-Adawi, Abdel-Fattah, & El-Wahab, 2011)

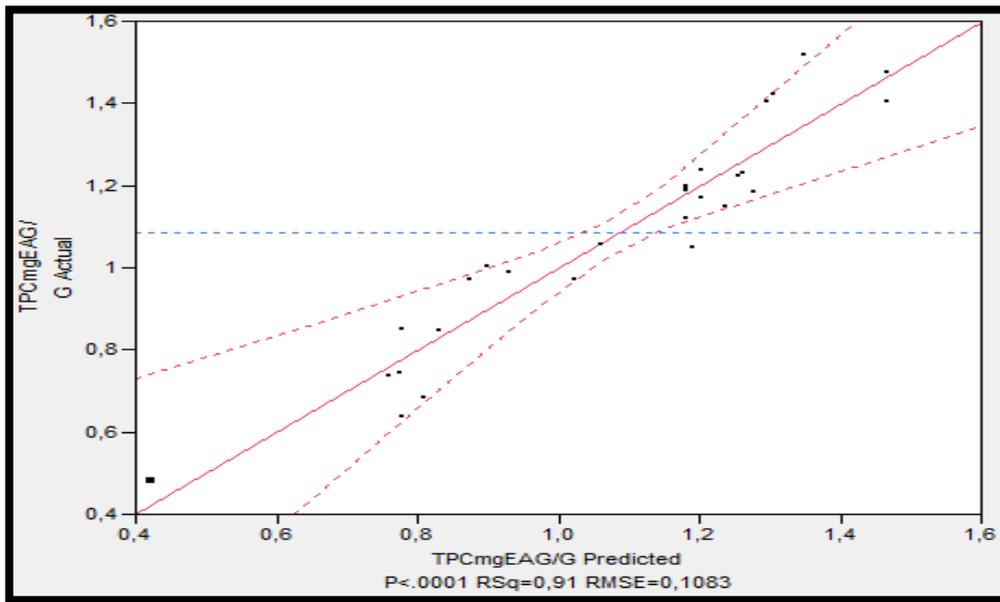


Figure 7 : comparaison entre les valeurs prédites et expérimentales .

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que le modèle est très significatif ($p < 0,001$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($p > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant (Fei, Salimon, & Said, 2010) Sachant que si dans un modèle, la p -value du manque d'ajustement est significatif ce modèle sera rejeté (Granato, Branco, & de Araújo Calado, 2010).

✓ Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) à $p < 0,05$, afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (concentration du solvant, puissance, temps et ratio) sur l'extraction des substances bioactives (Uma, Ho, & Wan Aida, 2010). Les p -value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la significativité de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les plus petits p -value présentent la plus grande significativité du facteur correspondant (Liu, Yang, Zhang, & Majetich, 2010). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XII.

Résultats et discussions

Tableau XII : Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de second degré

| Terme | Estimation | Erreur standard | Rapport t | P-value |
|--------------------|------------|-----------------|-----------|----------|
| Constante | 1.182 | 0.033 | 35.08 | <0.0001* |
| Linéarité | | | | |
| X_1 | 0.079 | 0.027 | 2.91 | 0.010* |
| X_3 | 0.071 | 0.028 | 2.55 | 0.022* |
| Interaction | | | | |
| X_1 - X_2 | 0.060 | 0.289 | -5.02 | 0.0002* |
| X_1 - X_3 | -0.160 | 0.0301 | -5.33 | <0.0001* |
| X_2 - X_4 | -0.0855 | 0.0301 | -2.84 | 0.0124* |
| Quadratique | | | | |
| X_4^2 | -0.313 | 0.0624 | -5.01 | 0.0002* |

Les résultats de l'étude montrent que le facteur qui possède une influence hautement significative sur l'extraction des polyphénols de la poudre étudiée est la concentration du solvant (X_1), et le temps d'extraction (X_3) avec une probabilité de $p=0,0107$; $0,0221$ et respectivement, cependant l'impact est non significatif pour les facteurs(X_2) (X_4) puissance micro-onde et rapport liquide /solide respectivement.

Des variations marginales dans la composition du solvant peuvent provoquer des impacts significatifs sur la qualité et la quantité des composés extraits (Luthria, 2008). En effet plusieurs études ont montré l'importance de la concentration du solvant par rapport aux autres facteurs(Chan et al., 2009) ?(Uma et al., 2010). Selon(Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007),les mélanges alcool-eau distillée donne une meilleure efficacité d'extraction des composés phénoliques comparant aux systèmes à solvant unique. En augmentant la proportion de l'eau distillée à l'éthanol, la polarité du solvant augmente, ainsi le système solvant sera capable d'extraire les polyphénols à haute polarité et ceux à polarité basse et également ceux à polarité moyenne (Zhang et al., 2007).

D'après les résultats trouvée par (Telli, Mahboub, Boudjeneh, Siboukeur, & Moulti-Mati, 2010), si le temps d'extraction est combiné au bon type de solvant, il influence considérablement sur l'extraction des polyphénols, ce qui permet de dire que

Résultats et discussions

la prolongation du temps d'extraction accroît d'une manière significative le rendement d'extraction.

Le non significativité des deux paramètres puissance, ratio d'extraction peut être attribué au choix des niveaux effectués dans les études préliminaires.

✓ Effet d'interaction

Les résultats obtenus indiquent que l'interaction -concentration de solvant – puissance micro-ondes (X_1 - X_2) est significative sur l'extraction des polyphénols avec une probabilité ($p=0,0002$). Et que les interactions temps d'irradiation- ratio solvant (X_2 - X_4) est significatif avec la probabilité ($P=0,0124$). Et que les interactions temps d'irradiation- ratio solvant (X_1 - X_3) est significatif avec la probabilité ($P<0,0001$).

La présente étude montre que les interactions ; (X_1 - X_4), (X_3 - X_4), (X_2 - X_3) sont non significatives avec des probabilités supérieures à 0.05.

Le degré de signification de l'interaction X_1 - X_2 (concentration-puissance micro-ondes), confirme l'influence de ces deux paramètres sur l'extraction des polyphénols du mélange étudié. En effet l'impact de ces deux facteurs a été confirmé par plusieurs auteurs(**Farid Dahmoune, Balunkeswar Nayak, Kamal Moussi, Hocine Remini, & Khodir Madani, 2015**).

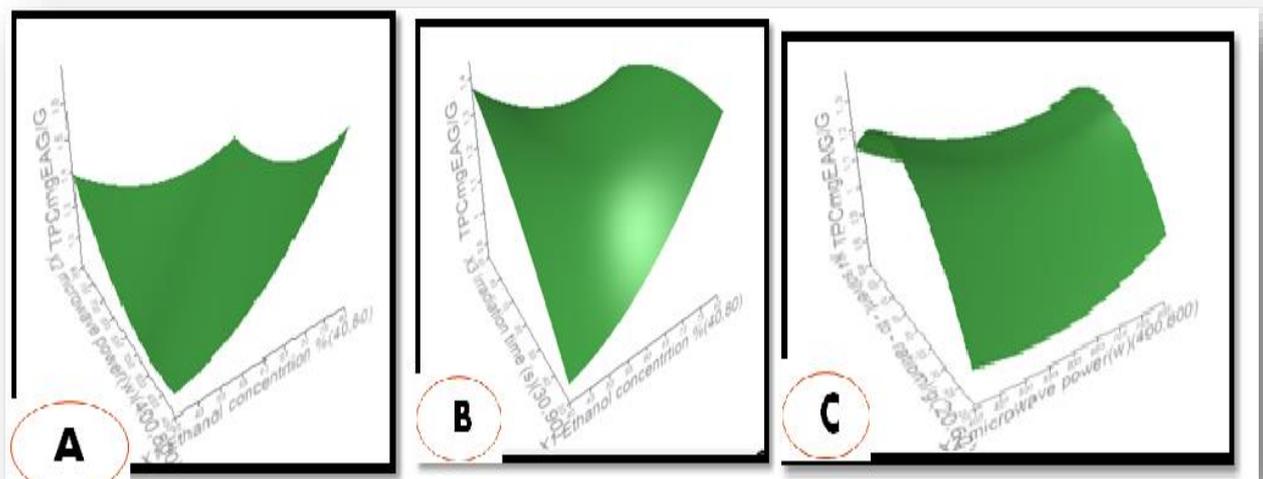


Figure 8 :Analyse de surface de réponse pour le rendement phénolique total des grains de *Pinus halepensis* Mill avec extraction assistée par micro-ondes ;(A) concentration

Résultats et discussions

d'éthanol et puissance micro-ondes ;(B) concentration d'éthanol et temps d'extraction ;(C)puissance micro-ondes et rapport solide /liquide .

✓ Effet quadratique

Les résultats de la présente étude (tableau VIII), indique que l'effet quadratique X_4^2 (ratio– ratio) est hautement significatif sur la teneur en polyphénols extraits avec une probabilité $p=0,0002$, contrairement aux trois autres effets quadratiques X_1^2 (concentration-concentration) X_2^2 (puissance– puissance) et X_3^2 (temps –temps) qui sont non significatifs avec une probabilité supérieure à 0,05. Ces résultats montrent l'importance du ratio du solvant par rapport aux autres facteurs.

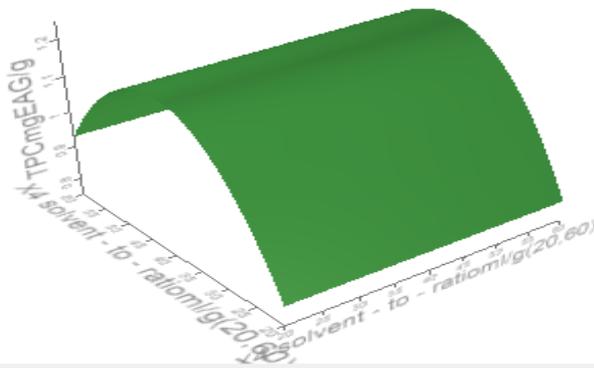


Figure 9 : Surface de réponse d'interaction (X_4^2)

✓ Modèle mathématique

Lorsque les facteurs sont clairement identifiés et la réponse est connue, un plan d'expérience avec une liste d'expériences à réaliser est proposé afin de cerner au mieux le phénomène étudié. Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux). Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan CCD pour quatre facteurs est un modèle de deuxième degré classique, qui est volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une

Résultats et discussions

qualité d'ajustement quasiment similaire.(Tinsson, 2010)Le modèle mathématique opté dans la présente étude est représenté par la relation suivante :

$$Y=1.182+0.079X_1+0.071X_3+0.060X_1X_2-0.160X_1X_3-0.0855X_2X_4-0.313X^2$$

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'extraction des polyphénols sont obtenues au sein du domaine expérimental.

Tableau XIII : Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.

| Variable | Valeur |
|--|---------|
| X_1 éthanol concentration % (40,80) | 64.592 |
| X_2 puissance micro-onde w (400,800) | 670.734 |
| X_3 temps s (30,90) | 72.551 |
| X_4 ratio g/ml (20,60) | 40.833 |
| Valeur prévue de la solution | 1.201 |

II-3-1-2-Validation de plan d'expérience assisté par solvant macération

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de régression R^2 (Chan et al., 2009). Dans la présente étude, la valeur de R^2 est de 0,97, ce qui signifie uniquement 0,03 (3%) des variations ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté est élevée (R^2 ajusté = 0,94), ce qui confirme la haute significativité du modèle. La valeur du R^2 ajusté (valeur du R^2 après élimination des coefficients inutiles du modèle) sera inférieure à celle de R^2 si le modèle contient beaucoup de termes inutiles (non significatifs) (El-Adawi et al., 2011).

Résultats et discussions

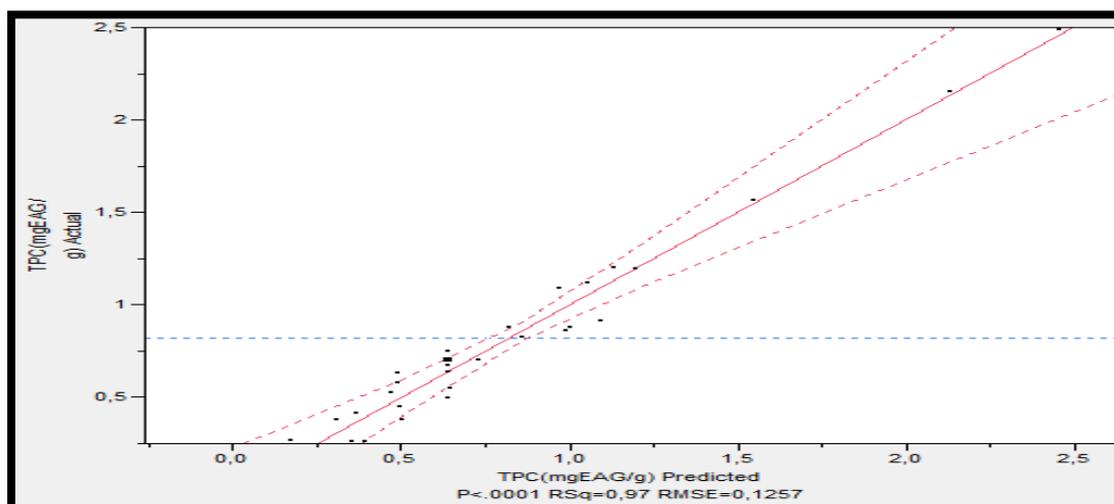


Figure 10 : comparaison entre valeurs prédites et expérimental.

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que le modèle est très significatif ($p < 0,005$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant. Sachant que si dans un modèle, la P-value du manque d'ajustement est significatif ce modèle sera rejeté(Granato et al., 2010).

✓ Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables (X_1 , X_2 , X_3 et X_4) à $p < 0,05$, afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (concentration du solvant, température, temps et ratio) sur l'extraction des substances bioactives(Uma et al., 2010). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XIV : Estimation des coefficients de régression du modèle polynôme de second degré.

| Terme | Estimation | Erreur standard | Rapport t | P-value |
|------------------|------------|-----------------|-----------|----------|
| Constante | 0.640 | 0.039 | 16.40 | <0.0001* |
| Linéarité | | | | |
| X_1 | 0.255 | 0.0296 | 8.62 | <0.0001* |
| X_2 | 0.0301 | 0.0296 | 10.19 | <0.0001* |
| X_3 | -0.0845 | 0.0296 | -2.585 | 0.021* |
| X_4 | 0.109 | 0.031 | -13.76 | <0.0001* |

Résultats et discussions

| Interaction | | | | |
|-------------|--------|---------|--------|----------|
| X_1-X_2 | 0.109 | 0.0314 | 3.5 | 0.0032* |
| $X_1- X_4$ | -0.110 | 0.0314 | - 3.50 | 0.0031* |
| X_2-X_4 | -0.170 | 0.03014 | - 5.42 | <0.0001* |

Les résultats de l'étude montrent que le facteur qui possède une influence hautement significative sur l'extraction des polyphénols de la poudre étudiée est la concentration du solvant (X_1), et température (X_2), le temps d'extraction (X_3), ratio (X_4) avec une probabilité de $P = <0,0001$; $<0,0001$; $0,021$; $<0,0001$ respectivement.

En effet plusieurs études ont montré l'importance de la concentration du solvant par rapport aux autres facteurs (Chan et al., 2009). Selon (Spigno et al., 2007), les mélanges alcool-eau distillée donne une meilleure efficacité d'extraction des composés phénoliques comparant aux systèmes à solvant unique. En augmentant la proportion de l'eau distillée à l'éthanol, la polarité du solvant augmente, ainsi le système solvant sera capable d'extraire les polyphénols à haute polarité et ceux à polarité basse et également ceux à polarité moyenne.

Dans la plupart des cas, les gammes élevées de température sont favorables au rendement d'extraction et ceci pour quatre principales raisons :

- La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation.
- La gamme des hautes températures usuelles augmente la solubilité des matières à extraire.
- Elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation.
- La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de dégradation thermiques du soluté et risque d'extraire des composés nuisibles. (Galvan D'Alessandro, 2013)

Résultats et discussions

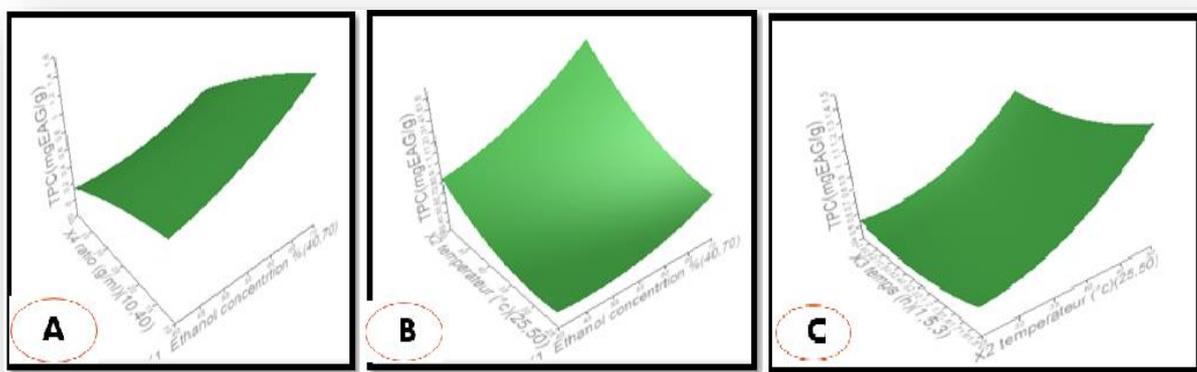
L'impact du rapport solide/liquide sur l'extraction des polyphénols l'augmentant le rapport solide/liquide, celui-ci a un effet positif sur l'extraction. Celui qui permet d'extraire le meilleur taux quel que soit le solvant étudié.

Le rapport solvant –solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre solvant et la quantité totale de composés est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide importants, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans l'extrait sont faibles et plus d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec. (Eskilsson & Björklund, 2000)

✓ Effet d'interaction

Les résultats obtenus indiquent que l'interaction concentration de solvant- température (X_1 - X_2) est significative sur l'extraction des polyphénols avec une probabilité $P=0,0032$. Et que les interactions concertation de solvant - ratio solvant (X_1 - X_4) est significatif avec la probabilité $P=0,0031$. Et que les interactions -température - ratio solvant (X_2 - X_4) est significatif avec la probabilité $P=<0,0001$.

La présente étude montre que les interactions ; (X_1 - X_3), (X_3 - X_4), (X_2 - X_3) sont non significatives avec des probabilités supérieures à 0,05.



Résultats et discussions

Figure 11 : Analyse de surface de réponse pour le rendement phénolique total des grains de *Pinus halepensis* Mill avec extraction assistée par macération ;(A) concentration d'éthanol et rapport solide /liquide ;(B) concentration d'éthanol et température d'extraction ;(C) température et temps d'extraction.

✓ Modèle mathématique

Lorsque les facteurs sont clairement identifiés et la réponse est connue, un plan d'expérience avec une liste d'expériences à réaliser est proposé afin de cerner au mieux le phénomène étudié. Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux) (Tinsson, 2010). Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan CCD pour quatre facteurs est un modèle de deuxième degré classique, qui est volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (Tinsson, 2010). Le modèle mathématique opté dans la présente étude est représenté par la relation suivante :

$$Y=0.640+0.255X_1+0.301X_2-0.084X_3-0.407X_4+0.109X_1X_2-0.046X_2X_3-0.110X_2X_4$$

✓ Solution

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'extraction des polyphénols sont obtenues au sein du domaine expérimental.

Tableau XV : Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.

| Variable | Valeur |
|---------------------------------------|--------|
| X_1 éthanol concentration % (40,70) | 37.052 |
| X_2 température (C°)(25,50) | 26.224 |
| X_3 temps (h) (1,5, 3) | 2.699 |
| X_4 ratio (g/ml) (10,40) | 13.341 |
| Valeur prévue de la solution | 0.484 |

II-3-2-Activités antioxydantes

L'activité antioxydante de la poudre des graines de pin étudiée est évaluée selon deux principes, le premier, regroupe les tests de la réduction de chlorure ferrique, qui mesure la capacité antioxydante ou le pouvoir réducteur. Le deuxième inclut les tests scavenger vis-à-vis des radicaux DPPH* et ABTS⁺, qui assure le pouvoir anti radicalaire des différentes substances présentes dans les extraits.

II-3-2-1-Pouvoir réducteur

✓ Réduction du chlorure ferrique

Le potentiel antioxydant de la poudre étudiée est estimé en utilisant la méthode de réduction du ferrocyanure de potassium. La présence des composés réducteurs (antioxydants) dans les extraits causent la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du ferrocyanure de potassium pour donner du fer ferreux (Fe^{2+}) (Bahorun et al., 1996). La couleur jaune de ferrocyanure de potassium vire vers une couleur bleu verte, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'extrait (Radojkovića et al., 2012) L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (Ozsoyetal., 2008; Ribeiro et al., 2008). Le résultat de l'évaluation du pouvoir réducteur est représenté dans la figure suivante :

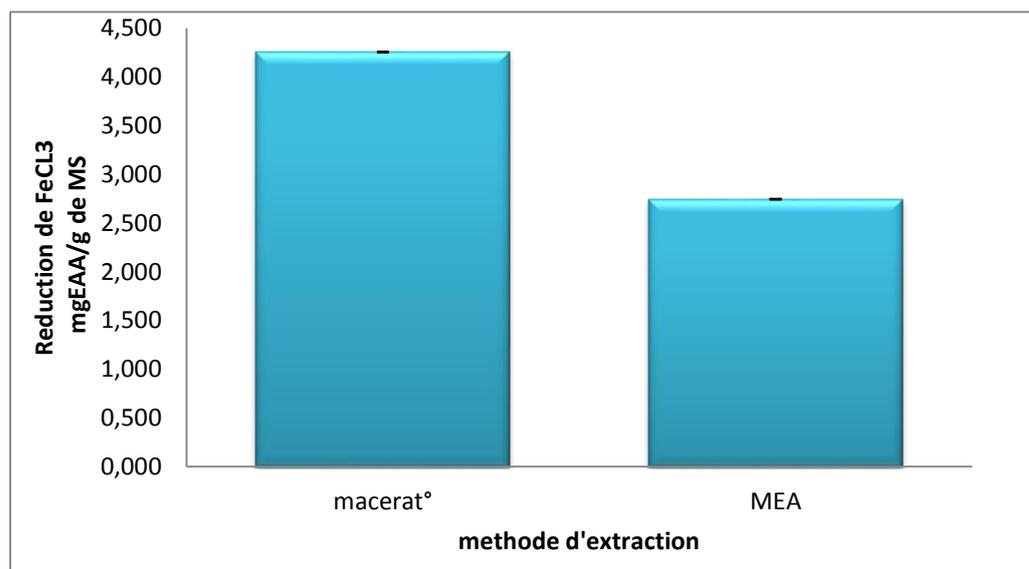


Figure 12 : Pouvoir réducteur des extraits optimal.

D'après le résultat obtenu dans la présente étude, le pouvoir réducteur des extraits de poudre des grains de 4,225 mg/ml pour l'extrait de macération et 2,745mg

Résultats et discussions

EAA/g de poudre pour l'extrait de micro-onde. La réduction du chlorure ferrique est souvent utilisée comme indicateur d'activité des donneurs d'électrons qui est un mécanisme important pour l'action antioxydante des polyphénols (Yang, Yu, Ou, Liu, & Ji, 2009).

II-3-2-2-Pouvoir antiradicalaire

✓ Pouvoir anti- radical DPPH⁺

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH⁺) est un radical libre stable, utilisé pour évaluer la capacité d'un antioxydant naturel d'épurer un radical libre (free radical-scavenging). Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH⁺ par le mélange étudié, est représenté dans la figure suivante :

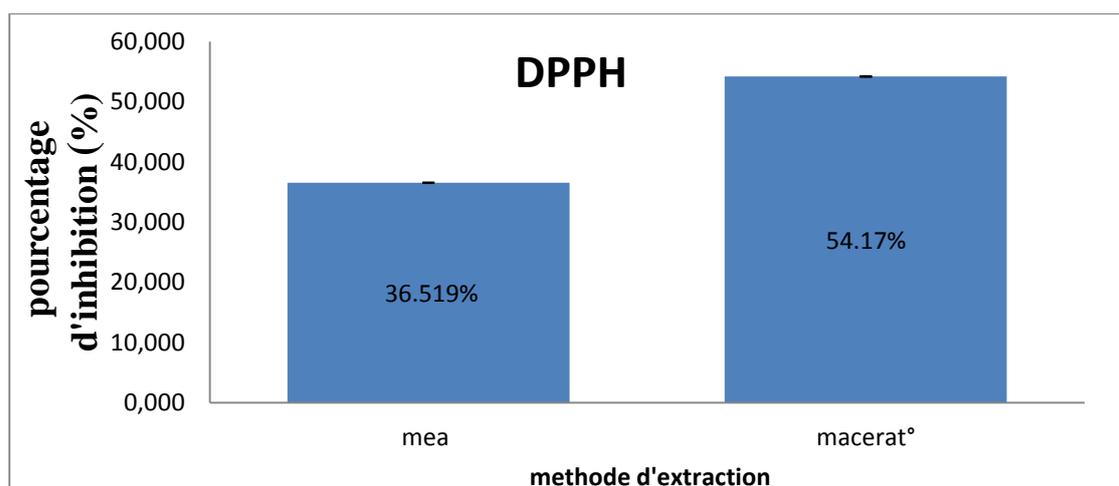


Figure 13 : pourcentage d'inhibition du radical DPPH• des optimums étudiées.

D'après le résultat obtenu, la capacité d'inhibition du radical DPPH⁺ par les extraits de poudre des deux méthodes étudiées, est de 54,178% pour macération et 36,519% pour MEA. Les résultats de l'étude statistique ($P < 0,05$) obtenus indiquent l'existence d'une bonne inhibition du radical DPPH⁺.

✓ Pouvoir anti- radical cation ABTS⁺

Le radical ABTS est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons. La neutralisation d'ABTS⁺ est basée sur la capacité d'oxydation de ce dernier en radical cationique ABTS⁺ par des antioxydants. Le

Résultats et discussions

pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS⁺, est représenté dans la figure suivante :

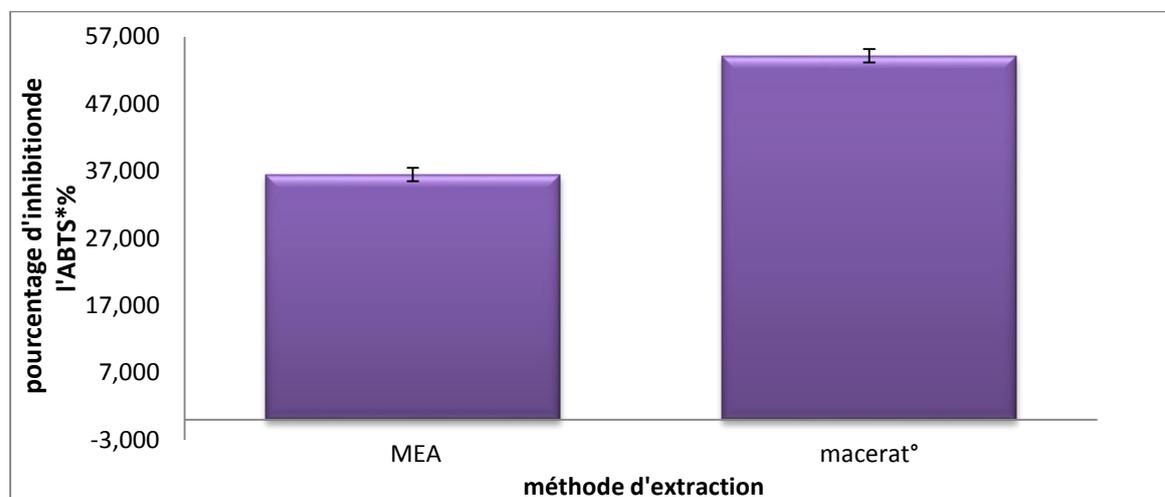


Figure 14 : pourcentage d'inhibition du radical ABTS des optimums étudiés.

D'après le résultat obtenu, la capacité d'inhibition du radical ABTS⁺ par les deux extraits de poudre étudiées, après l'incubation est de 70.402 % pour l'extraction par macération, et 43% pour l'extraction par micro- onde.

Les résultats de la présente étude montre que les extraits obtenus par l'extraction par macération présentent les teneurs les plus élevées en antioxydants (polyphénols totaux,), le pouvoir réducteur le plus élevé et l'activité antiradicalaire la plus élevée.

II-4-L'activité antibactérienne

Le pouvoir antimicrobien des polyphénols des graine de pin et de leurs extraits, issues de deux méthodes d'extraction défèrent (macération, micro-onde) a été étudié vis-à-vis sept souches pathogènes. Ce pouvoir est évalué par la détermination de zone d'inhibition.

Résultats et discussions

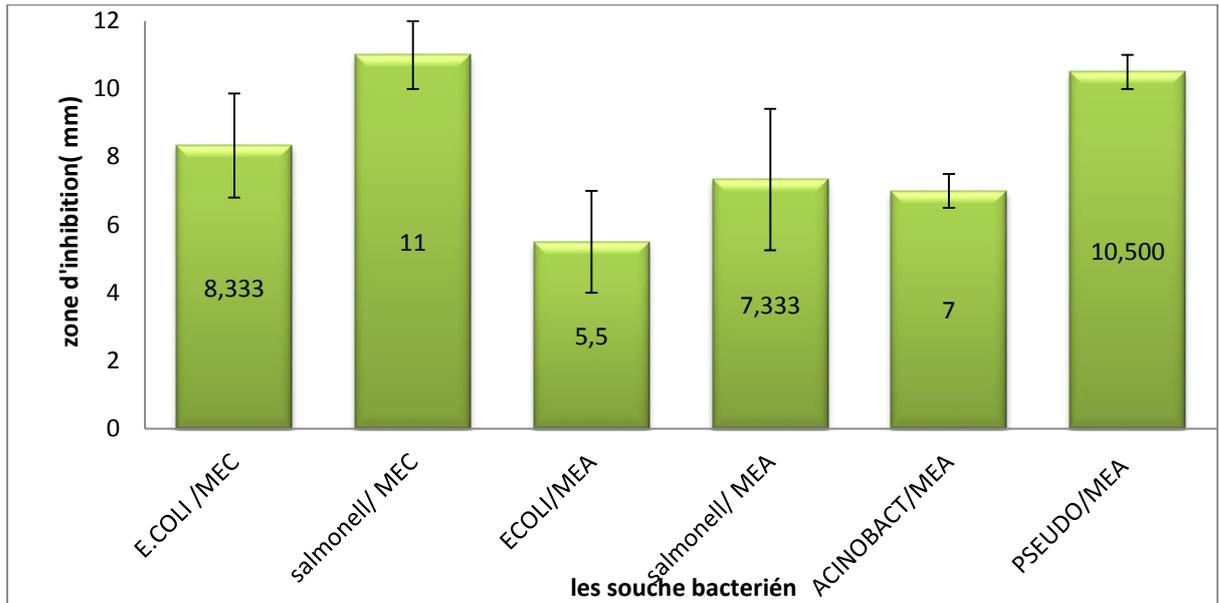


Figure 15 : diamètres de zones d'inhibition des extraits étudiés vis-à-vis des souches bactériennes étudiées.

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique, car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous. Pour cela l'éthanol a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente pas d'effet considérable sur la croissance normale des souches microbiennes.

Les résultats de la présente étude indiquent l'absence de zones d'inhibition aux tours des disques de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* pour les deux extraits. Cela signifie que ces souches bactériennes étudiées ne présentent pas une sensibilité vis-à-vis des extraits phénoliques de la poudre du grain de *pin*.

Les résultats de la présente étude, montre une sensibilité vis-à-vis les extrait étudiés (macération/ micro-onde), qui se traduit par apparition d'une zone d'inhibition aux tours des disques de *E-coli*, *Salmonella*, et *Pseudomonas* ainsi *Acétobacter*. Ces derniers présente une sensibilité vis-à-vis l'extrait de microonde et une résistance vis-à-vis l'extrait de macération. Les zones d'inhibition mesurées pour ces bactéries sont de 5 à 11 mm pour les deux extraits.

Résultats et discussions

L'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend surtout de la nature des bactéries Gram+ ou Gram– et aussi de la méthode d'extraction réalisée (**Basli, Chibane, Madani, & Oukil, 2012**). Selon (**Cowan, 1999**) qui explique que la toxicité des extraits envers les microorganismes est due aux différentes classes de polyphénols. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur les composés phénoliques. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques. (**Dhaouadi & Adhoum, 2010**)

Conclusion

La présente étude a pour but d'optimiser l'extraction des composés phénoliques des extraits de poudre des grains de *Pinus halepensis* Mill par deux méthodes d'extraction conventionnelles et non conventionnelles.

Le plan centrée a permis d'identifier les meilleurs paramètres d'extraction pour les deux méthodes : macération et microonde : Ethanol 70% à un volume de 10ml et à une température 50°C sous agitation, pendant un temps d'extraction de 1.5 h. Alors que l'extraction par micro-onde se fait pendant 30s à un volume de 43.31 ml et à une puissance 400 W et éthanol 80%.

Les taux des composés phénoliques retrouvés, sous les conditions optimales, sont respectivement de l'ordre de 2.54 mg EAG/g de poudre et 1.64 mgEAG/g de poudre pour macération et microonde.

Le pouvoir réducteur, estimé par le test de réduction de chlorure ferrique, des extraits optimaux est de l'ordre de 4,22 ; 2,74 mg d'Acide ascorbique/g respectivement pour les deux méthodes macération et micro-onde. Le pouvoir anti radicalaire DPPH* et l'ABTS+, des grains des *Pinus* étudiées, ont révélé des pourcentages d'inhibitions de l'ordre de 54.78,7% et 70.40% pour macération, 36,51% et 43% pour microonde respectivement.

Les résultats de l'activité antibactérienne, ont révélé une sensibilité variable des souches étudiés vis-à-vis les deux extraits testés. Les résultats obtenus indiquent que les extraits phénoliques des grains de *Pinus halepensis* Mill n'ont pas d'effet antibactérien avec quelque souche bactérienne et ont un effet avec d'autres souches.

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

- Utiliser des techniques d'analyse avancées (CCM, HPLC, CPG, ...) pour identifier les antioxydants de l'extrait.
- Déterminer l'activité antibactérienne vis-à-vis d'autres souches bactériennes.
- Étudier les autres activités biologiques (*in vivo*) de l'extrait optimal ; anti-inflammatoire, antimutagène, anti-cancérigène...etc. de l'extrait optimal.

- Élargir l'échantillonnage pour l'ensemble du territoire national ; et analyser l'effet de l'origine géographique sur la composition en antioxydant, et sur leur activité biologique

Références bibliographiques

Les Références Bibliographiques

- Achat, S. (2013). *Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques*.
- Ahn, W., Yoo, J., Huh, S., Kim, C., Lee, J., Namkoong, S., . . . Lee, I. (2003). Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. *European journal of cancer prevention*, 12(5), 383-390.
- Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 108(3), 977-985.
- Alu'datt, M. H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A. R., & Rababah, T. (2010). Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in *olive cake*. *Food Chemistry*, 123(1), 117-122.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2008). Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical research*, 33(12), 2416-2426.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Bahorun, T., Gressier, B., Troitin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., . . . Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
- Boulaacheb, N. (2009). La résine de *pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la population de la petite kabylie (algerie, nord afrique). Paper presented at the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009 853.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Bruneton, J. (2009). *Menthe in: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 4e éd., Tec & Doc, Paris: ISBN 978-2-7430-1188-8.

Références bibliographiques

- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., & Musci, M. (2000). Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 449-460.
- Chan, S., Lee, C., Yap, C., Aida, W. W., & Ho, C. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2), 203-213.
- Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, 12(5), 407-415.
- Chirinos, R. R., Campos, H., & Pedreschi, D. R. And Larondelle, Y.(2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51. Doi: 10.1016/j.trac.2015.11.013
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K. (2013). Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. Leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. Leaves. [Comparative Study]. *Food Chem*, 166, 585-595. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.066
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., & Madani, K. (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 61, 31-40.

Références bibliographiques

- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.
- Dhaouadi, A., & Adhoum, N. (2010). Heterogeneous catalytic wet peroxide oxidation of paraquat in the presence of modified activated carbon. *Applied Catalysis B: Environmental*, 97(1-2), 227-235.
- Eaux, É. N. D., forêts, recherches, f. S. D., & expériences. (1933). *Annales de l'École nationale des eaux et forêts et de la Station de recherches et expériences* (Vol. 5): École nationale des eaux et forêts.
- El-Adawi, H., Abdel-Fattah, Y., & El-Wahab, A. A. (2011). Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from 'milk thistle' seeds. *African Journal of Biotechnology*, 10(48), 9804-9811.
- Escribano-Bailon, M. (2003). Polyphenol extraction from foods. *Methods in polyphenol analysis*.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Farhat, A., Ginies, C., Romdhane, M., & Chemat, F. (2009). Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: experimental and theoretical study. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5077-5085.
- FARJON, A. (1996). Biodiversity of Pinus (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121(4), 365-384.
- Fei, C. Y., Salimon, J., & Said, M. (2010). Optimisation of urea complexation by Box-Behnken design. *Sains Malays*, 39(5), 795-803.
- Galvan D'Alessandro, L. (2013). *Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits*. Lille 1.
- Granato, D., Branco, G. F., & de Araújo Calado, V. M. (2010). WITHDRAWN: Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review. *Food Research International*.
- Hayat, K., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, S., Xia, S., Jia, C., . . . Zhang, J. (2010). Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry*, 123(2), 423-429.
- Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J.-L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids,

Références bibliographiques

- glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. Seeds. *Industrial Crops and Products*, 54, 6-12. Doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.051
- Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfellah, S., Sobhi, W., & Barragan-Montero, V. (2015). Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Chem*, 188, 184-192. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.138
- Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(2), 246-252.
- Kühnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition *World review of nutrition and dietetics* (Vol. 24, pp. 117-191): Karger Publishers.
- Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214-222.
- LEYBROS, J., & FREMEAUX, P. (1990). Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2, J2780. 2781-2780. 2721.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103(3), 1003-1008. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.038
- Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47-56.
- Lucchesi, M.-E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Université de la Réunion.
- Luthria, D. L. (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 107(2), 745-752.
- Macheix, J.-J., Fleuriot, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*: PPUR presses polytechniques.

Références bibliographiques

- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411-420.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommès, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.
- Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nahal, I. (1962).** Le pin d'Alep. Etude taxonomique, phytographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts*. 19 (4), 533-627.
- Panja, P. (2017). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*. Doi: 10.1016/j.cofs.2017.11.012
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Medi-Sphere*, 97, 29-33.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111-2117.
- Radojkovića, M., Zekovića, Z., Jokićb, S., & Vidovića, S. (2012). Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM). *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3), 7295-7308.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 197-206.
- Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds *Natural products isolation* (pp. 427-464): Springer.

Références bibliographiques

- Singh, J. (2008). Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 67, 32-35.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O., & Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) Variété ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, 2(2), 107-114.
- Tinsson, W. (2010). *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67): Springer Science & Business Media.
- Uma, D., Ho, C., & Wan Aida, W. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39(1), 119-128.
- Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies—. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 243S-255S.
- Yang, X.-m., Yu, W., Ou, Z.-p., Liu, W.-m., & Ji, X.-l. (2009). Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. Fruit. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 167-173.
- Zhang, Z.-S., Li, D., Wang, L.-J., Ozkan, N., Chen, X. D., Mao, Z.-H., & Yang, H.-Z. (2007). Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57(1), 17-24.

Résumé

Cette étude a été menée dans le but d'optimiser l'extraction des composés phénoliques par macération micro-onde à partir des graines de *Pinus halepensis* Mill. En utilisant la méthode de surface de réponse développée par le plan CCD, a fin déterminé les meilleures conditions de l'extraction des composés. Les résultats indiquent que les conditions optimums pour l'extraction par macération ont été : mélange d'éthanol/eau à 70%, une durée de 1.5h, à une température de 50°C, le ratio de 10 ml. Alors que l'extraction par micro-onde se fait avec mélange d'éthanol/eau à 80 %, pendant 30 s, à une puissance de 400w et un ratio de 43.31 ml et une évaluation des activités antioxydantes (pouvoir réducteur), (DPPH⁺ et l'ABTS⁺) effectués sur les grains de *Pinus halepensis* Mill. Dont les résultats obtenus indiquent des teneurs en PTC de 2,54mg EAG/g de MS avec macération et de 1.64 mg EAG/g de MS pour micro-onde, respectivement. Une teneur de 4,22 et 2,74 mg EAA/g de MS Pour le pouvoir réducteur. En dernier les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 54,78% et 36,51% pour le DPPH. Et de 70,40% et 43% pour l'ABTS⁺ respectivement.

L'activité antibactérienne vis-à-vis sept souches à savoir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Acinobacter*, *Salmonella*, et *Pseudomonas*, des grains étudiés sont effectués sur les grains de *Pinus halepensis* Mill.

Les mots clé : *Pinus halepensis* Mill, optimisation, Méthodes conventionnelles et non conventionnelles, polyphénols

Abstarct

This study was conducted to optimize the extraction of phenolic compounds by microwave maceration from seeds of *Pinus halepensis* Mill. Using the CCD method, an end determined by the best conditions of compound extraction. The results indicate that the optimum conditions for the extraction by maceration were: mixture of ethanol / water at 70%, a duration of 1.5h, at a temperature of 50 ° C, the ratio of 10 ml. While the microwave extraction is done with the mixture of ethanol / water at 80%, pendant 30, with a power of 400w and a ratio of 43,31 ml and an evaluation of the antioxidant activities (power reducer), (DPPH + and ABTS +) performed on *Pinus halepensis* Mill kernels. The results obtained with PTC contents of 2.54 mg were calculated from MS with maceration and 1.64 mg EAG / g of MS for microwave, respectively. A content of 4.23 and 2.74 mg EAA / g of MS for the reducing power. The last percentages of inhibition are of the order of 54.78% and 36.51% for the DPPH. And 70.40% and 43% for the ABTS + respectively. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Acinobacter*, *Salmonella*, and *Pseudomonas*, were studied on the seeds of *Pinus halepensis* Mill.

Key words: *Pinus halepensis* Mill, optimization, Conventional and unconventional methods, polyphenols