



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR-KHENCHELA

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie Département De
Biologie

MÉMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master académique

FILIERE : Science Biologique

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

*Optimisation de l'extraction des
polyphénols à activité antioxydante
de Pistacia lantiscus*

Présenté par

DRABNA KHALED

GUEZATI MEHDI

Encadré par

Mr. RAHAL Khalid

Soutenu : 20-06-2018

Jury de soutenance

Président : Mr MAZOUZ L. MAA Université Abbes Laghrour –Khenchela

Rapporteur : Mr RAHAL K. MAA Université Abbes Laghrour-Khenchela

Examineur : Mr FELLOUS S. MAB Université Abbes Laghrour –Khenchela

Année universitaire : 2017 -2018

Laboratoire où le travail a été réalisé : laboratoire de l'université Abbes Laghrour-Khenchela-

Remerciements

Nous remercions tout d'abord ALLAH tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons à remercier les personnes ayant contribué de près ou de loin pour préparer ce mémoire, plus particulièrement notre encadreur Mr. RAHAL KHALID pour sa disponibilité, son aide et ses conseils bénéfiques et rentables.

Nous remercions les membres de jury : Mr ZERAIJ AZZEDINE maître assistant à l'université Abbes Laghrour Khenchela et Mr. BOUSSAA ABD- ALHALIM maître assistant à l'université Abbes Laghrour Khenchela.

Tous nos remerciements aux enseignants de notre université ABBES LAGHROUR -KHENCHELA- pour leur précieuse aide et surtout d'avoir accepter de juger ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire de notre université pour leur aide dans la réalisation de cette étude.

Nous remercions toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à ce travail.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* à activité antioxydante et antibactérienne. L'optimisation est réalisée en utilisant le plan de Box-Behnken en prenant en considération quatre facteurs (Température, temps, rapport s/l, et concentration d'éthanol). Le taux des flavonoïdes (par la méthode de trichlorure d'aluminium), le pouvoir antioxydant. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les quatre réponses ($p < 0,01$) et R^2 [0,86 - 0,91].

L'établissement des équations polynomiales quadratiques et les courbes de surface des réponses nous a permis d'étudier l'influence de chaque facteur sur le dosage des flavonoïdes, ainsi que l'interaction entre les différents facteurs. En fin on a pu valider le modèle en appliquant les valeurs optimales pour chaque facteur. Les résultats trouvés ont été très proches des résultats prévus par le modèle.

Mots-clés : optimisation, extraction, *Pistacia lentiscus*, plan d'expérience, activité antioxydante, plan de Box-Behnken, antibactérienne

Abstract

The aim of this work is to optimize extraction of antioxidant and antibacterial polyphenols from young leaves of *Pistacia lentiscus*. Optimization is achieved using the Box Behnken plan taking into consideration four factors (temperature, time, the ratio m / V, and the concentration of the methanol). The rate of flavonoide (using the of trichlorure d'aluminium méthode), the antioxidant. The results showed that the model is adjusted properly to all responses with ($p < 0,01$) and R^2 [0.86 -0.91]. The establishment of quadratic polynomial equations and response surface curves allowed us to study the influence of each factor on the extraction of flavonoide, as well as the interaction between different factors. In the end we were able to validate the model by applying the optimal values for each factor. The results we found were very close results provided by the model.

Keywords: Optimization, Extraction, *Pistacia lentiscus*, design of experiment, antioxidant activity, antimicrobial activity, Box Behnken design.

الملخص

الهدف من عملنا هو تحسين استخراج مادة البولي فينول لأوراق نبات PISTACIA LANTISCUS

ذات النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للجراثيم. و يتحقق الأمثل باستخدام النموذج بوكس بنكن للأخذ بعين الاعتبار أربعة عوامل (درجة الحرارة، الوقت، تركيز الايثانول، النسبة كتلة/الحجم). تم تقييم معدل إجمالي الفلافونيد. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن النموذج متناسق مع الاستجابات الأربعة $R^2[0.86-0.91]$. إنشاء المعادلات متعددة الحدود من الدرجة الثانية و منحنيات استجابة السطوح سمح لنا بدراسة تأثير كل عامل على استخراج مادة الفلافونيد، و التداخل بين العوامل المختلفة و في النهاية كنا قادرين على التحقق من صحة هذا النموذج بتطبيق القيم المثلى لكل عامل. وجدت النتائج انها كانت قريبة جدا من النتائج التي تنبأ بها النموذج.

الكلمات المفتاحية ، مخطط التجربة، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروب، مخطط بوكس بنكن.

TABLE DES MATIERES

Dédicace
Remerciement
Sommaire
Abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

SOMMAIRE

Page

Introduction générale	01
------------------------------------	----

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Classification systématique et description botanique	02
I.1.1. Classification taxonomique.....	02
I.1.2. Description botanique.....	03
I.2. Produits et dérivés à base de <i>P.lentiscus</i>	05
I.3. Utilisation thérapeutique traditionnelle	06
I.4. Principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce	06
I.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques	07

Chapitre II: métabolites secondaires

II. Composés phénoliques	08
II.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....	08
II.2. Classification des composés phénoliques.....	10
II.2.1. Les phénols simples.....	10
II.2.2. Flavonoïdes.....	12

II.2.3. Les tannins.....	13
--------------------------	----

Chapitre III : les plans d'expériences

III.1. Généralité.....	16
III.2. Notions utilisées aux plans d'expériences.....	16
III.2.1.Espace expérimental.....	16
III.2.2. Surface de réponse.....	17
III.2.3. Notion de modélisation mathématique.....	17
III.2.3.1.Equation mathématique.....	17
III.2.3.2. Erreur.....	18
III.2.3.3.La p-valeur.....	18
III.2.3.4. Coefficient de détermination R^2	18
III.3. Types de plans d'expériences.....	19
III.3.1Les plans pour surface de réponse.....	19
III.3.1.1 Le plan central composite.....	19
III.3.1.2. Les plans de Box-Behnken.....	20

Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

I. Matériel.....	22
I.1. Matériel végétal.....	22
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations.....	22
II. Méthodes.....	22
II.1. Dosage des flavonoïdes.....	23
II.2. Activité antioxydante.....	24
II.2.1. Analyse des résultats.....	25

II. Résultats et discussions

I. Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes.....	26
I.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	28
I.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	29
I.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs.....	29
I.4. L'optimisation par surface de réponse de la teneur en flavonoïdes.....	30
II. Résultats de l'optimisation de l'activité Antioxydante.....	31
I.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	32
I.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	33
I.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs.....	33
I.4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Antioxydante.....	34
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	37

Liste des abréviations

Symbole	Désignation
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
ATCC	American type culture collection
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
MH	Mueller Hinton
Na₂ CO₃	Carbonate de sodium
nm	Nanomètre
μl, ml	Microlitre, milliliter
Q	Quercétine
Ms	Matière sèche
Abs	Absorbance
Temp	Température
S/L	Solide/Liquide

Liste des figures

Figure 01 : Pistacia lentiscus.....	02
Figure 02 : Description botanique de <i>P.lentiscus</i>	04
Figure 03 : Aire de répartition de <i>Pistacia lentiscus</i> auture dubassin Méditerranéen..	04
Figure 04 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	09
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique.....	12
Figure 06 : Exemple de structure d'un tannin hydrolysable (Gallotannin).....	14
Figure 07 : Exemple de structures des tannins condensés.....	15
Figure 08 : Domaine de variation d'un facteur.....	16
Figure 09 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse.....	18
Figure 10 : Plan composite pour l'étude de deux facteurs. Les points factoriels sont en noirs, les points en étoile sont en gris clair, les points centraux sont en blanc.....	19
Figure 11 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs.....	21
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	24
Figure 13 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de la teneur en flavonoïdes.....	30
Figure 14 : Surface de réponse de la variation de la teneur en flavonoïdes en fonction des conditions d'extraction.....	32
Figure 15 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de l'activité anti-oxydante.....	34
Figure 16 : Surface de réponse de la variation de l'activité antioxydante en fonction des conditions d'extraction.....	36

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des acides phénolique.....	11
Tableau 02 : Classification des flavonoïdes.....	13
Tableau 03 : Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs.....	21
Tableau 04 : Valeurs des variables réelles et codées des facteurs étudiés.....	23
Tableau 05 : Résultats du dosage des flavonoïdes.....	29
Tableau 06 : Analyse de la variance pour la teneur en flavonoïdes.....	30
Tableau 07 : Résultats du manque d'ajustement du model pour la teneur en flavonoïdes	31
Tableau 08 : Analyse de régression des résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes...	31
Tableau 09 : Résultats de l'activité Antioxydant.....	33
Tableau 10 : Analyse de la variance pour l'activité antioxydante.....	34
Tableau 11 : Manque d'ajustement du model sur l'activité antioxydante.....	35
Tableau 12 : Analyse de régression des résultats obtenus antioxydante.....	35

Introduction générale

Depuis des milliers d'années l'humanité, a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies. Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits, mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (**Athamena, 2009; Benaissa, 2011**).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

La Phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes - ou la seule "partie active" de ces plantes - ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales". Les préparations peuvent être obtenues par macération, infusion, décoction, ou sous forme de teinture, poudre totale, extraits,... etc. L'extraction des polyphénols à partir d'une matière naturelle en utilisant les solvants est une étape importante pour caractériser les systèmes naturels riche en polyphénols (**Mutlib et Abbott, 1992**). La solubilité des polyphénols est très influencée par sa structure chimique, qui peut être variée de petites molécules contenant différents groupements fonctionnels à de grosses molécules (tannins).

L'optimisation de l'extraction est plus que nécessaire pour l'extraction et la sélection des composés phénoliques à activité biologiques (**Nacz et Shahidi, 2006**).

La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain. Le but de notre étude est d'optimiser l'extraction des polyphénols de *pistacia lentiscus* à activité antioxydante en utilisant Les méthodes statistique appelées Plans d'expérience.

I.1. Classification systématique et description botanique

I.1.1. Classification taxonomique

Le *Pistacialentiscus* est une espèce appartenant à la famille des Anacardiaceas (syn. Pistaciaceae). Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistacia* sont:

- *Pistaciaatlantica*
- *Pistaciachinensis*
- *Pistacia lentiscus* L. — pistachierlentisque
- *Pistacia terebinthus* L. — pistachiertérébinthe
- *Pistacia vera* L. — pistachier vrai (qui donne lapistache)
- *Pistacia integerrima*
- *Pistacia palestina*
- *Pistacia khinjuk*

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (Quezelet Santa ,1962).

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus* L. est un arbrisseau très commun dans notre pays (Mitcheh 1986 , Baudière et al ;2002).

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermatophyta (Angiospermae)
- Classe : Dicotyledones
- Ordre : Sapindales
- Famille : Anacardiaceae (Pistaciaceae)



Figure 01 : *Pistacia lentiscus* (Mitcheh, 1986)

D'après Kornelson (1996) et Friedmann (2005), l'espèce *P.lentiscus* est reconnue par divers synonymes :

▪ Synonymes

Lentiscus massiliensis (Mill.) Fourr.

Lentiscus vulgaris Fourr. *Pistacia brevifolia* Gand. *Pistacia chia* Desf.

Pistacia gummifera Salisb. *Pistacia narbonensis* Mill. *Terebinthus lentiscus* (L.) Moench

Terebinthus vulgaris Fourr.

▪ Noms vernaculaires

(Anglais) /.....Chios mastic tree

(Allemand) /.....Mastixbaum

(Français) /.....Arbre aumastic, Lentisque

(Espagnol) /.....Lentisco

(Afrique du nord) /....Derw, darw (arabe)

Tidekt, Tidekst, (Berb.)

I.1.2. Description botanique

Arbrisseau dioïque thermophile de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise; les feuilles persistantes, composées, alternes pourvues d'un pétiole ailé, paripennées à 4- 10 petites folioles elliptiques-obtuses, mucronulées, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous.

Les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, subglobuleux, apiculé, rouge, puis noir à la maturité. (Yahya, 1992 ; Iserin, 2001 ; More et White, 2005).



Figure 2 : Description botanique de *P.lentiscus* (Yahya, 1992).

Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen (figure 03), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux.

En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières (**More et White, 2005**).

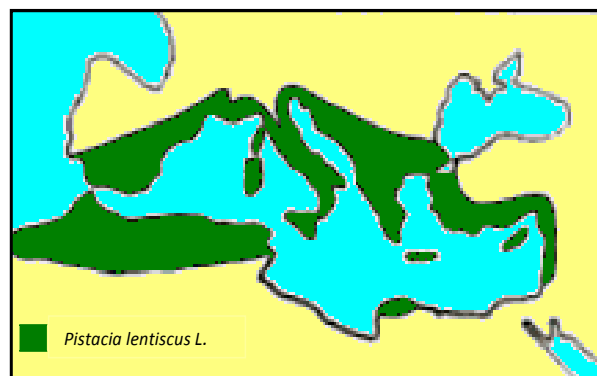


Figure 03 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* autour du bassin Méditerranéen (Seigue, 1985).

Une étude portant sur la variabilité naturelle de *Pistacia lentiscus* du bassin méditerranéen utilisant une analyse par RAPD (random amplified polymorphic DNA), combinée à des examens chimiques et morphologiques, conclue à l'existence d'une grande variabilité génotypique de cette espèce (**Barazani, 2003**).

I.2. Produits et dérivés à base de *P.lentiscus*

D'après Seigue (1985), les principaux produits dérivés du *P. lentiscus* et leur utilisation sont décrites.

- Bois: pour sa robustesse et la finesse de sa texture, le bois de cette espèce est très apprécié en ébénisterie.
- Résine: Des branches et du tronc exsude naturellement ou par incision une résine jaune claire fortement aromatique qui durcit au contact de l'air qui est appelée mastic ou gomme-mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic, généralement la production est d'environ 4 à 5 kilos par arbuste. Cette résine est produite à grande échelle dans de vastes plantations dans la région d'Emporio et Mesta, qui est d'ailleurs appelée "mastihohoria" qui se traduit par villages à mastic, d'où le nom commercial répandu de « Mastic de Chio ». Ce dernier entrait dans la confection d'eau-de-vie et de liqueurs, aromatiser certaines confitures, confectionner des pâtes ou des gommes à mâcher parfumées ou pastilles qui furent les douceurs favorites des sultans de l'empire ottoman et des femmes du Moyen-Orient. Cette pâte à mâcher au parfum subtil était aussi consommée telle quelle car elle avait entre autre la propriété de purifier l'haleine, blanchir les dents et traiter les problèmes de gingivites.

Aujourd'hui encore le mastic est employé dans l'industrie agro-alimentaire évidemment comme agent masticatoire, dans l'industrie photographique et dans les soins dentaires (dans les amalgames).

Depuis la plus haute antiquité le Mastic de Chio était réputé dans toute la méditerranée orientale pour traiter les affections pulmonaires.

- Essence de Mastic: après distillation du mastic est récupérée une essence qui entre dans la confection de parfums, produits cosmétologiques et pharmaceutiques, de vernis de grande qualité recherché par les peintres œuvrant à la peinture à l'huile et aussi dans l'industrie photographique.

- Essence des feuilles et rameaux : de ces parties est extraite une huile essentielle qui est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrite aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes.
- Huile de lentisque : du fruit comestible est extraite une huile qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et elle entrait aussi dans la confection de savons. L'huile est produite à l'Est de l'Algérie, dans les zones notamment côtière (El Milia, Skikda), où l'espèce abonde. Un procédé traditionnel est utilisé à cet effet : Les fruits atteignent leur maturité vers la fin d'été début de l'automne. Les baies prennent alors une coloration noire au lieu du rouge. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude et puis écrasées à l'aide d'une presse. Des baies s'exultent un liquide épais de couleur jaune vert. L'huile est récupérée par décantation.

I.3. Utilisation thérapeutique traditionnelle

Les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuées au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et brûlures légères.

La médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile grasse obtenue par expression des fruits de lentisque dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes.

L'huile est aussi employée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac. Ces usages sont surtout répandus à l'Est du pays (région d'El-Milia, Skikda, Guelma). L'huile est également très utilisée pour les mêmes indications en Tunisie (Yahya, 1992 ; Iserin, 2001 ; Baudoux, 2003 ; Grosjean, 2007).

I.4. Principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce

La chimie de la plante est relativement peu étudiée. La plante est connue pour contenir une huile essentielle et fixe (Grosjean, 2007), une huile grasse (Charef *et al.*, 2008), des tanins condensés et hydrolysables (Abbas et Boudriche, 2007), des glycosides flavonoïques (Vaya et Mahmood, 2006), des anthocyanes (Longo *et al.*, 2007), une résine « mastic de chio » (Leonti *et al.*, 2001), et des triterpènes (Atmani *et al.*, 2002).

De la résine extraite du tronc et des tiges de *Pistacia lentiscus* ont été isolés une huile essentielle, riche en monoterpènes en quantité majoritaire, des monoterpénols et des

sesquiterpènes en quantité moyenne, et des esters terpéniques en quantité mineure (**Baudoux , 2003 ; Grosjean, 2007**)

Des feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été isolés des tanins proanthocyanidiques et galliques, des glycosides flavonoïdes et des anthocyanes, et des dérivés à noyau gallique et quinique (**Longo et al., 2007**).

Des baies est extraite par expression une huile végétale dont la composition demeure peu étudiée.

I.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Les études expérimentales effectuées sur cette plante ont mis en évidence différents activités biologiques et pharmacologiques. Une activité anti-ulcéreuse du *Pistacia lentiscus* a été signalée par plusieurs auteurs (**Al-Said et al., 1986**) tels que l'effet antifongique (**Ali-Shtayeh et al., 1999**), antibactérien (**Iauk, 1996**), anti-ulcéreux duodénal (**Al-Said et al., 1986**) et hépatoprotecteur (**Janakat et Al-Merie, 2002**). En médecine traditionnelle, on utilise la résine de pistachier lentisque afin de combattre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *Helicobacter pylori* a en effet été confirmée. Cette méthode consiste à éliminer la bactérie *H. pylori* par mastication de résine du pistachier lentisque, comme une gomme à odeur prononcée.

L'huile de lentisque est souvent utilisée en médecine comme astringent, expectorant, et cicatrisant (**Seigue, 1985**).

En médecine traditionnelle, on utilise la résine de pistachier lentisque afin de combattre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *Helicobacter pylori* a en effet été confirmée. Cette méthode consiste à éliminer la bactérie *H. pylori* par mastication de résine du pistachier lentisque, comme une gomme à odeur prononcée. L'huile de lentisque est souvent utilisée en médecine comme astringent, expectorant, et cicatrisant. (**Seigue, 1985**).

Selon Baudoux D. (2003) et d'autres auteurs, les huiles essentielles de lentisque sont utilisées pour leurs effets pharmacologiques tant que décongestionnant veineux-lymphatique et antispasmodique (**Yahya, 1992 ; Iserin, 2001 ; Grosjean, 2007 ; Baudoux, 2003**).

II. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires très répandus dans le règne végétal ; ils sont présents dans les différentes parties de la plante : les racines et les feuilles, dans les fruits et l'écorce et surtout dans les fleurs (**Richter, 1993**). Ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999 ; Macheix *et al.*, 2005**).

II.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromatisation :

✓ Voie du shikimate

La voie la plus courante est celle du shikimate, elle débute par la condensation d'un phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate (voie des pentoses) pour former un composé hétérocycle à sept carbones C₇, le 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP), lequel après déphosphorylation et réduction donne du shikimate. Une série de réactions assure ensuite l'accrochage d'une chaîne latérale et la création d'une double liaison sur le cycle, d'où la formation de l'acide chorismique qui se transforme en acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine), conduisant par la suite à l'acide cinnamique et ses dérivés : acide benzoïque, acétophénone, lignines et lignanes, coumarines...etc.) (Figure 4) (**Richter, 1993 ; Bruneton, 1999**)

✓ Voie de polyacétate

Cette voie commence de l'acétate et conduit à des poly β -cétosters de longueur variable (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : quinones, xanthones, chromones, isocoumarines, ...etc (**Richter, 1993 ; Bruneton, 1999**). De plus, la diversité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composé d'origine mixte des deux voies, tels que les flavonoïdes (**Bruneton, 1999 ; Martin et Anriantsitoraino, 2002**).

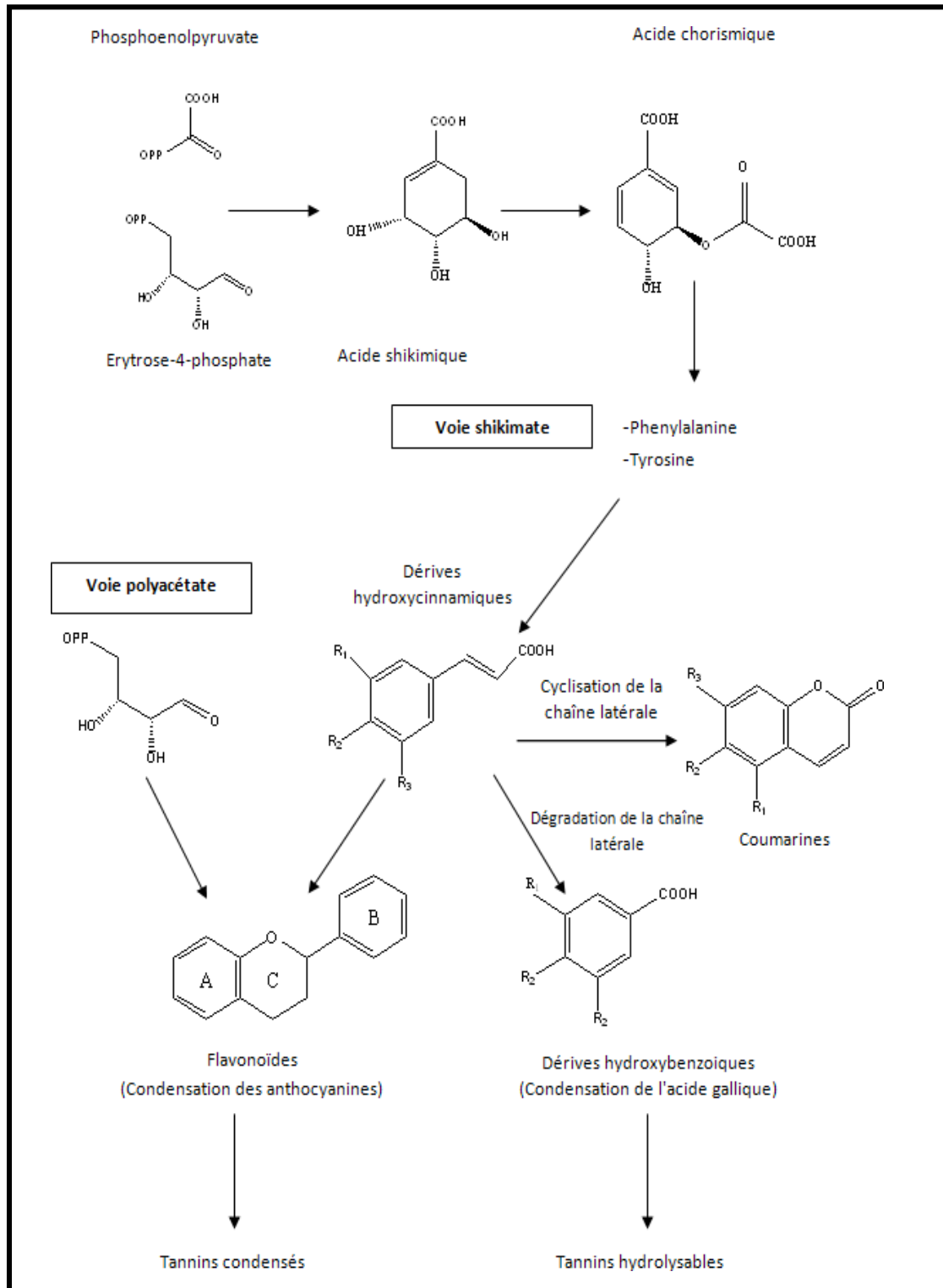


Figure 04: Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

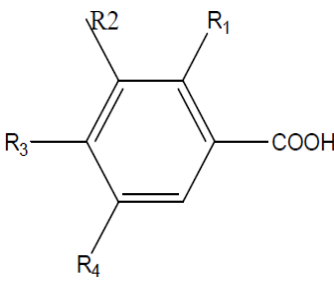
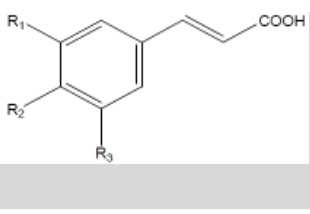
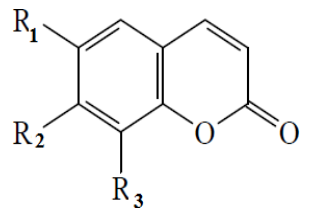
II.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent se regrouper en de nombreuses classes qui se différencient par la complexité, le degré de modification du squelette de base (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation.....) ainsi que les liaisons possibles avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines....) (Cheynier *et al.*, 1998 ; Macheix *et al.*, 2005). Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins constituent trois grandes classes regroupant la majorité des structures (Bruneton, 1999 ; Martin et Anriantsitoraino, 2002 ; Wollgast, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005).

II.2.1. Les phénols simples

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique (Chirac *et al.*, 2008), ils sont divisés en acides benzoïques à sept atomes de carbones (C6-C1), en acides cinnamiques à neuf atomes de carbone (C6-C3) et enfin en coumarines qui possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes, accolés à un noyau benzoïque et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation de leur chaîne latérale (Ribereau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999 ; Macheix *et al.*, 2005). Ainsi les principaux acides simples sont représentés dans le (Tableau 01)

Tableau 01 :Classification des acides phénolique

Les classes	Structure générale	Exemples de composés	Substituants	Références	
Acides phénoliques		Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	R1=R2=R4=H, R3=OH	Manach et al.,2004	
		Acide vanillique	R1=R4=H,R2=OCH3, R3=OH		
		Acide gallique	R1=H, R2=R3=R4=OH		
		Acide salicylique	R1=OH, R2=R3=R4=H		
	Acide hydroxycinnamiques		Acide <i>p</i> -coumarique	R1=R3=H, R2=OH	Manach et al.,2004
			Acide caféique	R1=R2=OH, R3=H	
			Acide sinapique	R1=R3=OCH3, R2=OH	
	Coumarines		Ombelliférone	R1= R3= H ; R2= OH	Bruneton, 1999
			Esculitol	R1= R2= OH ; R3= H	
			Scopolétole	R1= OCH ₃ ; R2= OH ; R3= H	

II.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration jaune, orange et rouge des fleurs, des fruits et des feuilles, ils constituent une énorme classe de composés phénoliques naturels de plus de 6 000 composés. (Ghedira, 2005).

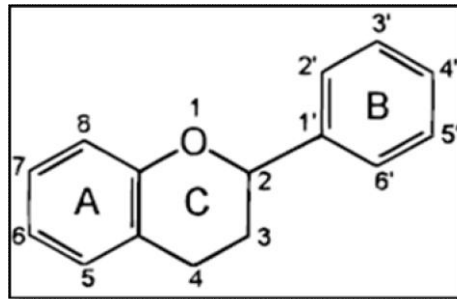


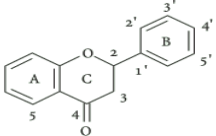
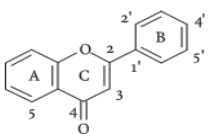
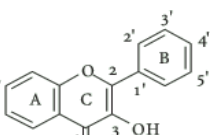
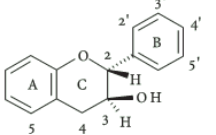
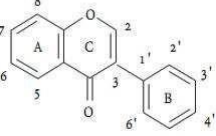
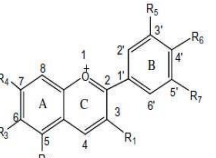
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Pietta, 2000 ; Balasundram *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et sont synthétisés dans la plante à partir des acides aminés aromatiques, et leurs structures de base (figure 5) est un noyau flavane constitué de 15 atomes de carbone arrangés en 3 cycles C6-C3-C6 : A, B et C avec un ou plusieurs substituant hydroxyl (Pietta, 2000 ; Vermerris et Nicholson, 2006).

Cette structure de base est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques ; le noyau B et le pont carbone constituant une unité phénylpronanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétate via la voie de l'acide malonique. La fusion de ces deux parties implique la condensation d'un phénylpronanoïde, le 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone, donnant ainsi le tétrahydroxychalcone, qui va à son tour donner tous les flavonoïdes (figure 5) (Martens et Mithofer, 2005 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Chira *et al.*, 2008)

On distingue un grand nombre de flavonoïdes, selon le degré d'oxydation de la chaîne à trois carbones ainsi qu'à leur degré d'insaturation. La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permet de distinguer les différentes classes des flavonoïdes. Différents groupes ont été identifiés dont six sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les anthocyanidines qui sont représentés dans le tableau 02 (Heim *et al.*, 2002 ; Chira *et al.*, 2008).

Tableau 02 : Classification des flavonoïdes

Classes de flavonoïdes	Structure générale	Exemples de composés	Substituants	Références
Flavonoïdes		Hespéridine	5=7=3'=OH ; 4'= OCH ₃	Heim <i>et al.</i> , 2002 ; Pietta, 2000
		Naringénine	5=7=4'= OH ; 3'= H	
		Lutéoline	5=7=3'=4'= OH	Pietta, 2000
		Apigénine	5=7=4'= OH ; 3'=H	
		Chrysin	5=7=OH ; 4'= 3'=H	
		Quercétine	5=7=3'=4'= OH ; 5'=H	Pietta, 2000
		Kaempferol	5=7=4'= OH ; 5'=3'=H	
		Myricétine	5=7=3'=4'= 5'=OH	
		Catéchine	3= β OH ; 5=7=3'=4'= OH	Havsteen, 2002 ; Pietta, 2000
		Epicatéchine	3= α OH ; 5=7=3'=4'= OH	
		Génesteine	5=7 =4'= OH	Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005
		génistine	5=4'= OH ; 7= Oglc	
	Delphinidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₅ = R ₆ = R ₇ =OH ; R ₃ = H	Cheynier, 2005 ; Castaneda-Ovando <i>et al.</i> , 2009	
	Cyanidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₅ = R ₆ =OH ; R ₃ = R ₇ =H		
	Malvidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₆ =OH ; R ₃ =H ; R ₇ =R ₅ = OMe		

II.2.3. Les tannins

Ce sont des composés phénoliques complexes largement distribués chez les plantes supérieures, obtenus à partir de la condensation des phénols simples et se caractérisent par des propriétés astringentes prononcées (Macheix *et al.*, 2005 ; D'Archivio *et al.*, 2007).

Ils s'intègrent dans la défense des végétaux contre les herbivores, en particulier pour les plantes se développant dans les zones difficiles (Zimmer et Cordesse, 1996).

Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da, et leur propriété importante réside dans la combinaison de leur nombreux hydroxyles avec les fonctions amides des protéines aux quelles ils se lient par différentes liaisons : hydrogènes, ioniques ou par des interactions hydrophobes (Makkar, 2003 ; Vermerris et Nicholson, 2006). Deux groupes de tannins se diffèrent aussi bien par leur structure que par leur origine biosynthétique : tannins hydrolysables et tannins condensés (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999).

✓ Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucides et d'acides phénoliques, la molécule glucidique est en général du glucose (Ribéreau-Gayon, 1968). Ils sont facilement hydrolysables par les acides ou les enzymes (tannases) en ose et en acide phénolique, selon la nature de celui-ci, on distingue les gallotannins (figure 6) et les ellagitannins (Bennick, 2002; Oszmianski *et al.*, 2007).

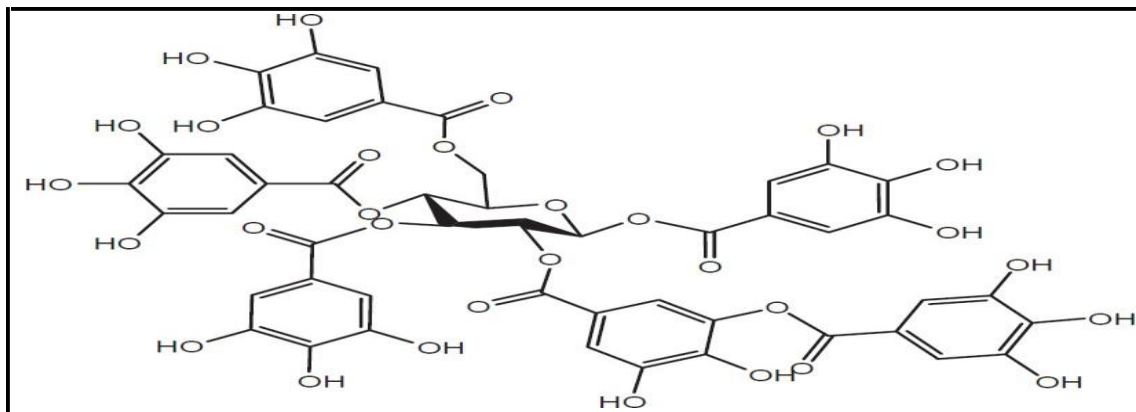
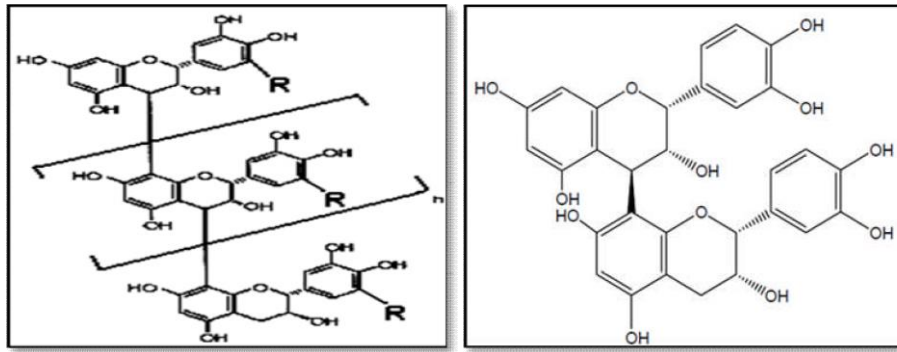


Figure 06 : Exemple de structure d'un tannin hydrolysable (Gallotannin) (Macheix *et al.*, 2005)

✓ Tannins condensés

Les tannins condensés (ou proanthocyanidines) sont des dimères ou polymères de flavane-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanes-3,4-diols (leucoanthocyanes ou proanthocyanidols) (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Bruneton, 1999). L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C, ou par ramification grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (figure 7) (Macheix *et al.*, 2005).



R=H: unité procyanidine, dérivée de l'écatechine.
 Procyanidine B2 :écatechine-(4 β →8')-
 Ecatechine
 R=OH : unité prodelphinidine, dérivée de la catéchine

Figure 07 : Exemple de structures des tannins condensés (Macheix *et al.*, 2005 ; Vermerris et Nicholson, 2006).

III.1. Généralité

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x_i .

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (Goupy, 2006).

III.2. Notions utilisées aux plans d'expériences

III.2.1. Espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs facteurs, Chacun de ces facteurs peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure 8). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux niveaux notés -1 et +1 (Goupy, 2006). L'espace expérimental, est donc l'espace coincé entre deux axes représentant deux facteurs différents.

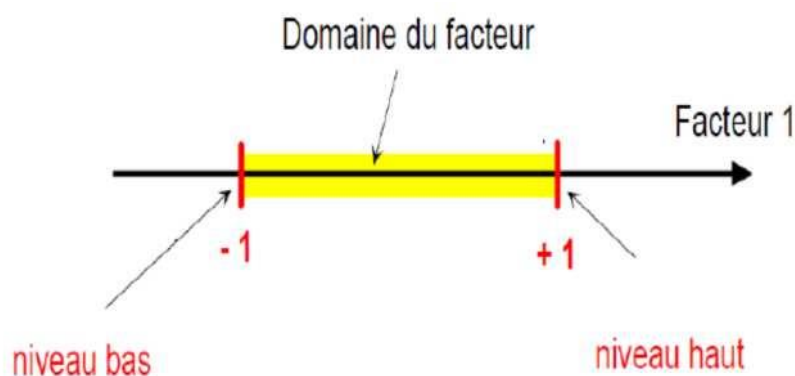


Figure 08 : Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

III.2.2. Surface de réponse

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (figure 9).

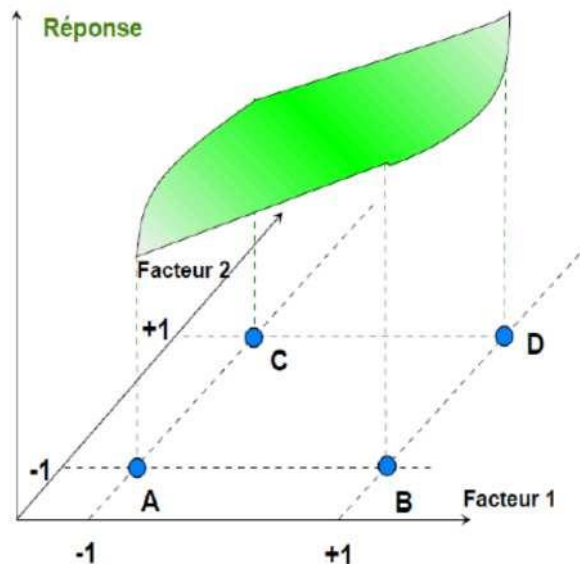


Figure 09 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

Cette surface de réponse est très importante puisque c'est elle qui représente le comportement de la réponse quand on fait varier les niveaux des facteurs. De sa connaissance on peut déduire les meilleurs ajustements des facteurs pour répondre à une question donnée. Les plans d'expérience permettent de trouver cette surface de réponse en effectuant un minimum d'essais et on obtenant une bonne précision sur sa localisation. La connaissance de cette surface permet de résoudre la plupart des problèmes qui se pose à l'expérimentateur (Goupy, 2005).

III.2.3. Notion de modélisation mathématique

III.2.3.1. Equation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne a priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante :

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$$

Cette fonction est très générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de la série de **Taylor-Mac Laurin**, c'est-à-dire une approximation. Si les dérivées peuvent être considérées comme des constantes, le développement précédent prend la forme d'un polynôme

de degré plus ou moins élevé : $y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_{ij} + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots$

Où :

- y est la grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur ; c est la réponse.

- x_i représente un niveau du facteur « i ».

- x_j représente un niveau du facteur « j ».

- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du polynôme (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.2.3.2. Erreur

L'erreur est la variation inexplicable dans un ensemble d'observation. On distingue deux types d'erreurs: erreur aléatoire (Random error) et l'erreur de manque d'ajustement (Lack of Fit Error). L'erreur aléatoire, appelée aussi erreur expérimentale, est une erreur due à la variation naturelle dans un processus. L'erreur de manque d'ajustement est une erreur qui se produit lorsque l'analyse omet un ou plusieurs termes importants ou des facteurs du modèle mathématique (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.2.3.3. La p-valeur

Le p-value est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. On calcule cette p-value à partir du rapport du coefficient à son écart-type (t de Student) (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.2.3.4. Coefficient de détermination R^2

Le R^2 est une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses. Dans la pratique, il est difficile d'indiquer la valeur d'un bon R^2 car les valeurs varient beaucoup d'une discipline à l'autre (**Goupy et Creighton, 2006**).

III.3. Types de plans d'expériences

Il existe plusieurs types de plans d'expériences qui permettent de s'adapter à la plupart des situations (**Goupy, 2006**) :

- Les plans factoriels complets ;
- Les plans factoriels fractionnaires ;
- Les plans de Plackett et Burman ;
- Les plans Taguchi ;
- Les plans pour surfaces de réponses ;
- Les plans de mélanges ;
- Les plans complètement randomisés ;
- Les plans des blocks randomisés ;
- Les plans optimaux ;
- Les plans pour simulations numériques ;
- Les plans booléens.

Le bon choix d'un plan expérimental maximise la quantité d'information qui peut être obtenue pour un effort expérimental donné. Le choix d'un plan d'expérience dépend des objectifs de l'expérience et du nombre de facteurs étudiés, selon les objectifs expérimentaux rencontrés (**Sado et Sado, 2000**).

III.3.1. Les plans pour surface de réponse

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ces plans sont utiles à chaque fois que l'on se trouve près d'un maximum ou d'un minimum. Il existe plusieurs types de plans du second degré dont on s'intéresse au Plan Central Composite (CCD).

III.3.1.1. Les plans de Box-Behnken

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 11). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. La matrice du (Tableau 3) indique ces douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 points au centre.

Les plans de Box-Behnken répondent à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de

prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère (ou une hyper sphère) centrée à l'origine du domaine expérimental. C'est le critère d'isovariance par rotation. Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs.

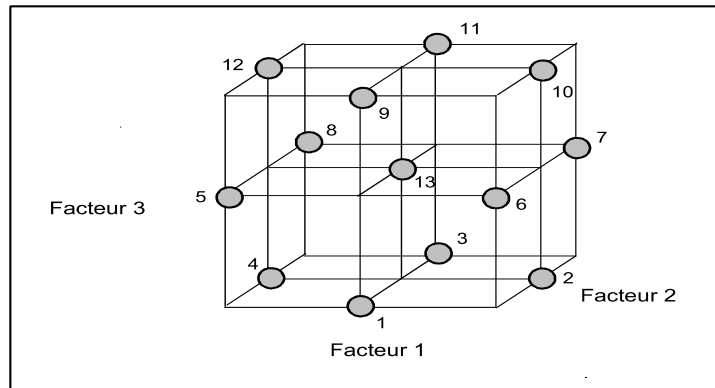


Figure 11 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs (Goupy, 2006).

Tableau 03 : Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs

n° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	0	- 1	- 1
2	+ 1	0	- 1
3	0	+ 1	- 1
4	- 1	0	- 1
5	- 1	- 1	0
6	+ 1	- 1	0
7	+ 1	+ 1	0
8	- 1	+ 1	0
9	0	- 1	+ 1
10	+ 1	0	+ 1
11	0	+ 1	+ 1
12	- 1	0	+ 1
13	0	0	0

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal comprend la partie aérienne (feuilles) de l'espèce *Pistacia lentiscus* récoltée de la région Elhamma, Wilaya de Khenchela au mois de Avril 2018 au stade pleine floraison. La partie aérienne est nettoyée, séchée à l'étuve à température 60°C pendant 24 heures, stockée à l'abri de la lumière puis broyée à l'aide d'un moulin à café puis tamisée avec un tamis dont le diamètre des pores est 0,2 mm pour avoir une poudre plus homogène à partir de laquelle les extraits ont été réalisés.

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Réactifs: Mueller Hinton (MH) (40mg/ml), AlCl₃ (2%), quercitine, éthanol, radical 1,1-diphenyl -2-picryl hydrazyl radical (DPPH'), nitrate de sodium (NaNO₃ à %), Hydroxyde de sodium (NaOH).

Appareillage utilisé: Spectrophotomètre UV-VIS à double faisceau (JENWAY 6305), Bain Marie (MEMMERT), Etuve(MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), Vortex (VELP) et Balance électrique (OHAUS), Boites de Pétri, Pipettes Pasteur, Micropipettes, Disques de papier wattman N°1, Ecouvillons stériles, Pince stérilisée, anse de platine, Bec Bunsen, Autoclave.

II. Méthodes:

Dans notre étude le plan plan de Box-Behnken a été utilisé pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols de *Pistacia lentiscus* en utilisant deux réponses, à savoir : les flavonoïdes (**Réponse Y1**), l'activité Antioxydante en utilisant le DPPH (**Réponse Y2**).

Afin d'évaluer les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols de l'espèce *Pistacia lentiscus*, quatre facteurs ont été étudiés: la température (30, 50, 70°C), le temps d'extraction (30, 75, 120 min), le rapport solide/liquide (0.5, 0. 1 g/10ml) et le rapport solvant /eau (60, 80, 100 %). Ces facteurs sont représentés en deux niveaux codés par -1 et +1 pour le minimum et le maximum et le 0 pour le centre.

Le (tableau 4) réunit les valeurs des variables réelles et codées des quatre variables. La construction de la matrice des expériences nous a donné 27 essais.

Tableau 04: Valeurs des variables réelles et codées des facteurs étudiés.

Variable	Code du variable	-1	0	+1
Température (°c)	X1	30	50	70
Temps (min)	X2	30	75	120
Solide/liquide (g)	X3	0.5	0.66	1
Solvant (%)	X4	60	80	100

Les extraits éthanoïques ont été préparés selon la technique décrite par (**Isbilir et al., 2012**) avec quelques modifications ; de différentes masses de poudre (0.33 ,0.66,1 g) sont mise à macérer dans un volume de 1ml de méthanol avec des différentes concentration (60% ,80%,100%) puis incubées dans le bain marie pendant (30 ,75,120 min) à températures variées (30,50,70 C°) selon 27 expériences. L'extrait a été ensuite centrifugé, après filtré sur un papier filtre N°1 et conservé dans le réfrigérateur 4C°, à l'obscurité.

II.1. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium; (AlCl₃) (**Vanhaelen et al., 1980**) à 100 µl de chaque extrait (dilué 1/2) et ajouté 50 µl de nitrate de sodium (5%) plus 900 µl d'eau distillée . Après 5 minutes d'incubation 100 µl de la solution d'AlCl₃ (10%) dans le méthanol) est ajouté. Après une deuxième incubation pour 6 min, 500 µl de NaOH plus 1000 µl d'eau distillée sont ajoutés, l'absorbance a été lue à 510 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine par gramme de matière sèche (µg EQ/g Ms)

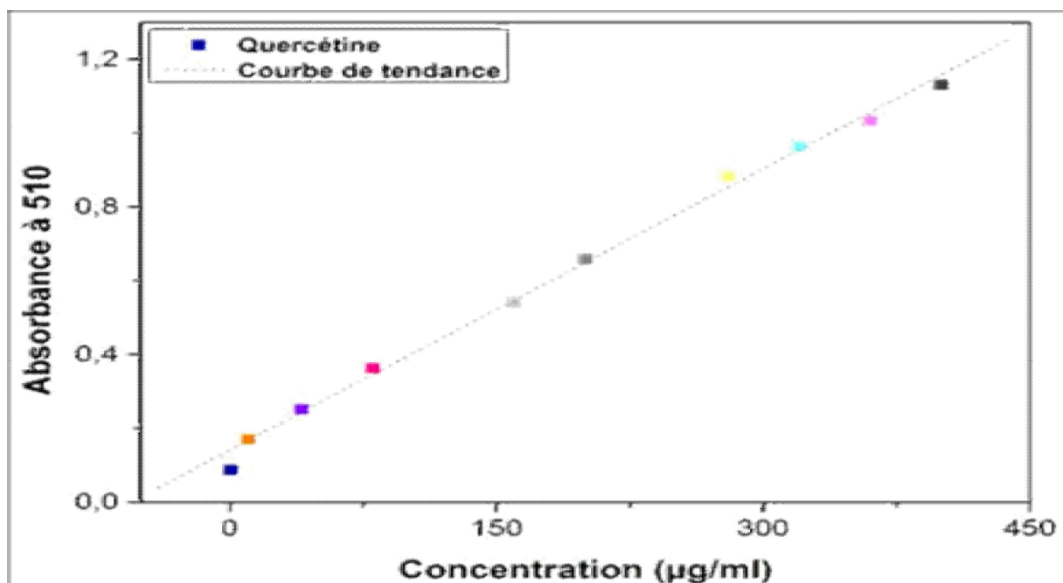


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

II.2. Activité antioxydante

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhammou *et al.*, 2007). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml du éthanol.

Un volume de 100µl de chaque extrait dilué (1/2) est ajouté à 900 µl de la solution éthanolique du DPPH (0,1 mM) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 µl d'éthanol avec 900µl d'une solution éthanolique de DPPH. Les tubes sont incubés pendant 30 min à l'obscurité et à la température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est exprimée en pourcentage et donnée par la formule suivante:

$$AA\% = \frac{Abs_{517\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon } 517}}{Abs_{517\text{ contrôle}}} \times 100.$$

II.2.1. Analyse des résultats:

Pour les trois réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir : la température (**X1**), temps de macération (**X2**), le rapport solide/liquide (**X3**), la concentration du solvant (**X4**) sont étudiées. La construction de la matrice des expériences nous a donné 27 essais.

Afin de prédire le point optimal, une fonction polynomiale de second ordre a été élaborée. Elle permet d'étudier la relation entre les variables indépendantes et les réponses (teneur en flavonoides et activité antioxydante).

La forme générale de l'équation polynomiale du second ordre est la suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

Y_i : la réponse.

β₀: la constante du modèle.

X_i, X_j: les variables indépendantes.

β_i: le coefficient linéaire.

β_{ij}: le coefficient d'interaction.

β_{ii}: le coefficient quadratique.

L'analyse statistique du modèle est exécutée en analysant la variance (ANOVA). Cette analyse inclut le test de Fischer (signification du modèle globale), sa probabilité associée $p(F)$, le coefficient de corrélation R et le coefficient de détermination R² qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés et les courbes de la surface de réponse (3D). Cette analyse est réalisée par le logiciel JMP 9.0 Discovery.

Résultats et discussion

L'optimisation par plans d'expérience est moins coûteuse et consomme moins de temps par rapport aux méthodes classiques car plusieurs paramètres sont testés simultanément avec un nombre d'expériences minimale d'une manière à trouver les interactions entre les variables (Montgomery, 2001). Ils offrent une grande quantité d'information à partir d'un nombre réduit d'essais (Baç et Boyaci, 2007). Dans notre étude le plan factoriel a été utilisé pour l'optimisation de :

- La teneur en flavonoïdes (**Réponse Y1**).
- L'activité antioxydante (**Réponse Y2**).

Pour les deux réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir : la température (**X1**), le temps de macération (**X2**), rapport solide/liquide (**X3**), la concentration du solvant (**X4**) sont étudiées. La construction de la matrice des expériences nous a donné 27 essais.

Les expériences ont été réalisées aléatoirement. Les valeurs trouvées ont été comparées avec les valeurs prévues par le modèle pour vérifier sa performance. L'ajustement du modèle a été vérifié par le test d'ANOVA, et la linéarité des interactions entre les facteurs indépendants a été vérifiée par la régression en utilisant la méthode des moindres carrés. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel JMP Statistical Discovery 9.0 (USA).

I. Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé en utilisant les réactifs nitrates de sodium (5%), AlCl₃ (10%), NaOH. Les conditions expérimentales, les résultats mesurés ainsi que les valeurs prévues en ($\mu\text{g EQ/g Ms}$) sont représentés dans le (tableau 5).

Tableau 05: Résultats du dosage des flavonoïdes

Essai	Variables indépendants				Taux des flavonoïde	
	X ₁ (°C)	X ₂ (min)	X ₃ (g/ml)	X ₄ (%)	Mesuré	Prévu
1	30	30	0.15	80	1100	1001.70907
2	30	120	0.15	80	1016.666666	1166.24843
3	70	30	0.15	80	619.696969	689.538403
4	70	120	0.15	80	672.727272	840.859634
5	50	75	0.1	60	586.81	694.487993
6	50	75	0.1	100	469	456.845435
7	50	75	0.2	60	940	1021.996
8	50	75	0.2	100	858	927.841433
9	30	75	0.15	60	1013.36366	1038.48899
10	30	75	0.15	100	692.424242	636.239089
11	70	75	0.15	60	480.545454	483.357919
12	70	75	0.15	100	634.848484	553.810701
13	50	30	0.1	80	725	765.816276
14	50	30	0.2	80	1176	1120.06828
15	50	120	0.1	80	879	878.746569
16	50	120	0.2	80	1420	1322.99857
17	30	75	0.1	80	749	806.435725
18	30	75	0.2	80	1146	1218.18773
19	70	75	0.1	80	568	500.155994
20	70	75	0.2	80	958	886.907995
21	50	30	0.15	60	763.636363	738.822661
22	50	30	0.15	100	728.787878	797.166524
23	50	120	0.15	60	1203.03030	1120.99538
24	50	120	0.15	100	719.696969	730.854393
25	50	75	0.15	80	1110.606061	1042.4242
26	50	75	0.15	80	1162.121212	1042.4242
27	50	75	0.15	80	954.545454	1042.4242

I.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire:

L'analyse du model par ANOVA a montré un effet hautement significatif vis-à-vis de la réponse teneur en flavonoïdes ($p < 0.001$) (tableau 7).

Tableau 06: Analyse de la variance pour la teneur en flavonoïdes

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	1412750.3	100911	8.1290
Résidus	11	136550.7	12414	Prob. > F
Total	25	1549301.1		0.0007*

La valeur du (R^2) était de l'ordre de 0,91 ce qui reflète une corrélation forte entre les valeurs prévues et les valeurs observées.

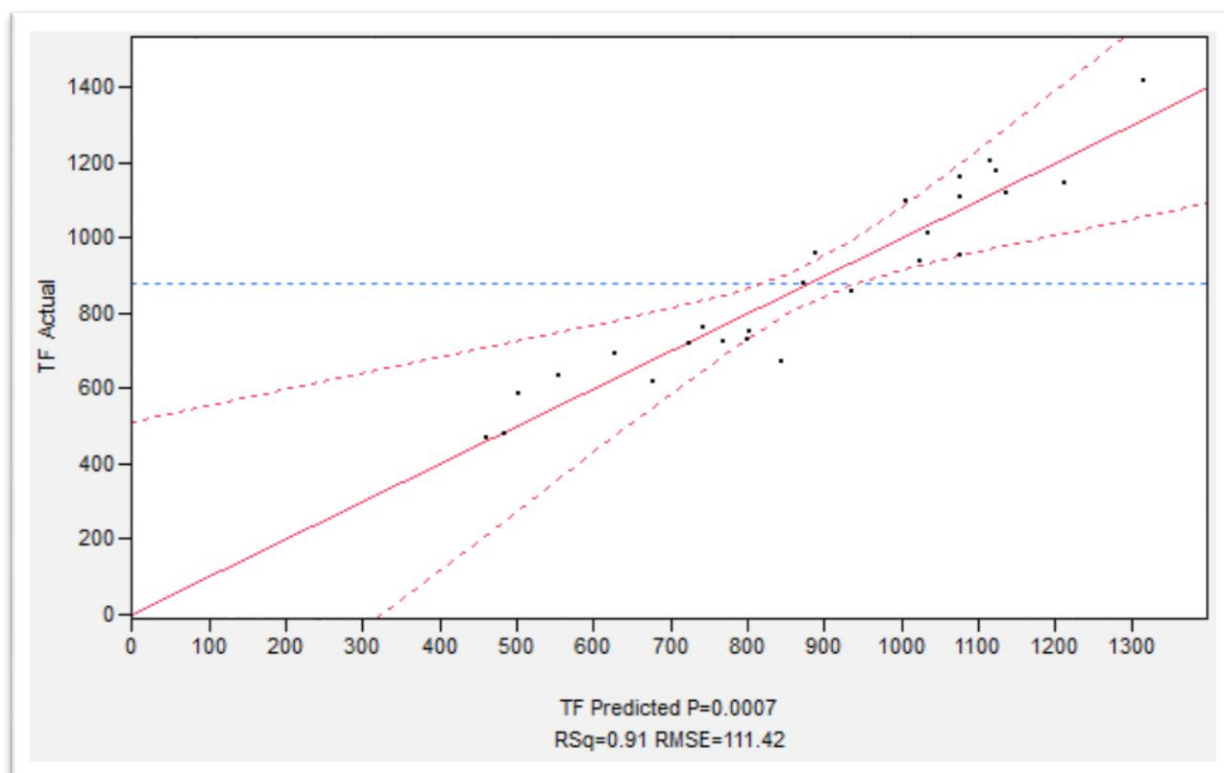


Figure13: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de la teneur en flavonoïdes.

I.2. L'analyse du manque d'ajustement

Les résultats d'analyse du manque d'ajustement sont résumés dans le (tableau 8).

Les résultats du manque d'ajustement ont été non significatifs ($p=0,99>0,07$). Ils sont en accord avec les résultats de l'analyse par ANOVA.

Tableau 07 : Résultats du manque d'ajustement du model pour la teneur en flavonoïdes

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	9	113185.25	12576.1	1.0765
Erreur pure	2	23365.47	11682.7	Prob. > F
Erreur totale	11	136550.72		0.99

I.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs

Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et leur influence sur la teneur en flavonoïdes sont représentés dans le (tableau 9).

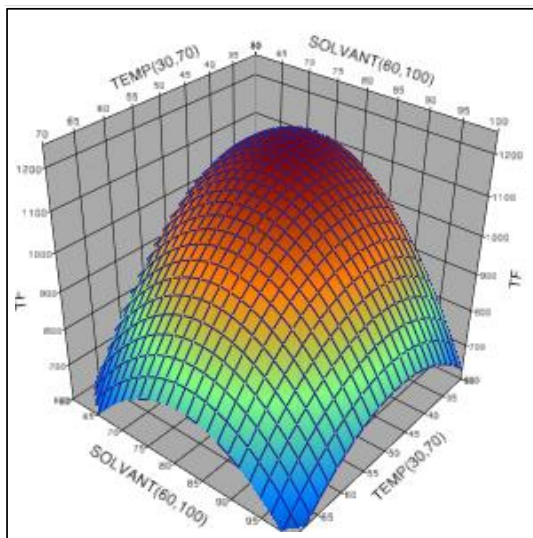
Tableau 08 : Analyse de régression des résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	1075.7576	64.32625	16.72	<,0001*
Température(30,70)	-155.4924	32.16326	-4.83	0,0005*
Temps(30,120)	74.833333	32.16326	2.33	0.0401*
Rapport m/V(0.1,0.2)	198.86995	35.23308	5.64	0.0002*
Ethanol %(60,100)	-83.47096	35.32308	-2.37	0.0372*
Température*Temps	9.0909091	55.7084	0.16	0,8733
Température*Rapport m/V	-6.25	55.7084	-0.11	0,9127
Temps*Rapport m/V	22.5	55.7084	0.40	0.6940
Température*Ethanol %	118.78789	55.7084	2.13	0,0562
Temps*Ethanol %	-112.1212	55.7084	-2.01	0.0693
Rapport m/V*Ethanol %	38.140152	70.46617	0.54	0,5991
Température*Température	-164.8213	48.778	-3.83	0.0062*
Temps*Temps	4.5151828	48.778	0.09	0,9279
Rapport m/V*Rapport m/V	-59.81944	50.34646	-1.19	0.2598
Ethanol %*Ethanol %	-235.1187	50.34646	-4.67	0,0007*

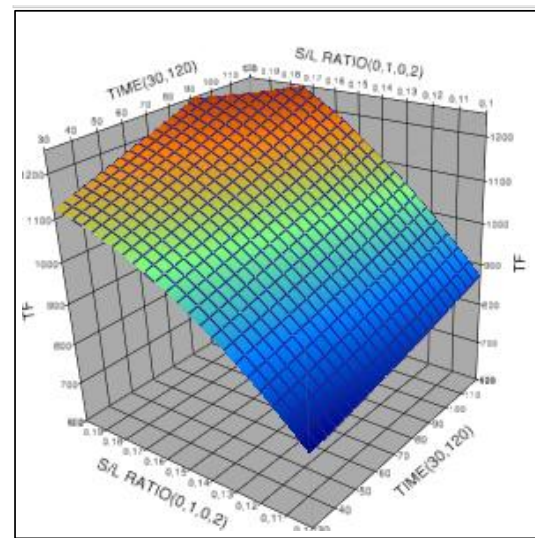
Selon le tableau 09, On observe un effet hautement significatif des variables linéaires : Température et le Rapport m/V, ont une influence hautement significative sur l'activité antioxydante ($p < 0,01$). la teneur en flavonoïdes est influencée significativement par les variables de Temps et d'éthanol et deux variables quadratiques (Ethanol %*Ethanol %) et (Température*Température).

I.4. L'optimisation par surface de réponse de la teneur en flavonoïdes

L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme des surfaces de réponse dans la figure 15.



(A)



(B)

Figure14 : Surface de réponse de la variation de la teneur en flavonoïdes en fonction des conditions d'extraction. (A) : le solvant avec la température, (B) : le rapport solide/liquide avec le temps.

II. Résultats de l'optimisation de l'activité Antioxydante

L'activité antioxydante a été mesurée en utilisant le radical DPPH. Les différents résultats trouvés ont été analysés et comparés avec des valeurs prévues tableau 10

Tableau 09 : Résultats de l'activité Antioxydant

Activité anti radicalaire (%)			Activité anti radicalaire (%)		
Essai	Mesuré	Prévu	Essai	Mesuré	Prévu
1	68.83	65.22	15	73.01	80.56
2	97.41	88.78	16	71.16	75.82
3	98.71	100.09	17	82.92	85.68
4	67.47	63.43	18	75.55	76.54
5	77.39	65.97	19	93.35	82.99
6	80.79	82.88	20	86.88	88.75
7	75.65	75.65	21	74.35	80.76
8	77.07	69.82	22	62.29	64.72
9	71.3	67.39	23	50.43	52.63
10	72.85	70.82	24	81.52	79.75
11	65.43	70.05	25	91.5	82.81
12	71.19	77.69	26	91.5	82.81
13	86.14	84.07	27	80.43	82.81
14	90.39	85.43			

D'après le tableau 09, on observe que les résultats trouvés sont proches des résultats prévus ce qui indique une bonne corrélation entre eux due au bon fonctionnement du modèle. Les résultats de l'activité antioxydante sont compris entre 52.63 et 100.09%. Dont la meilleure activité a été enregistrée avec les niveaux 30 °C, 120 min, 0.2 g/ml, et 80% pour les variables température, temps, rapport S/L et concentration du solvant, successivement.

II.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

L'analyse du model par ANOVA a montre un effet hautement significatif vis-à-vis de la réponse activité oxydante ($p < 0.001$) tableau 11.

Tableau 10 : Analyse de la variance pour l'activité antioxydante

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	2859.4805	204.249	4.7386
Résidus	11	474.1387	43.104	Prob. > F
Total	25	3333.6192		0.0068*

La valeur du R2 été de l'ordre de 0,86 ce qui reflète une corrélation forte entre les valeurs prévues et les valeurs observées. Donc notre model peut expliquer et prédire 86% de nos résultats.

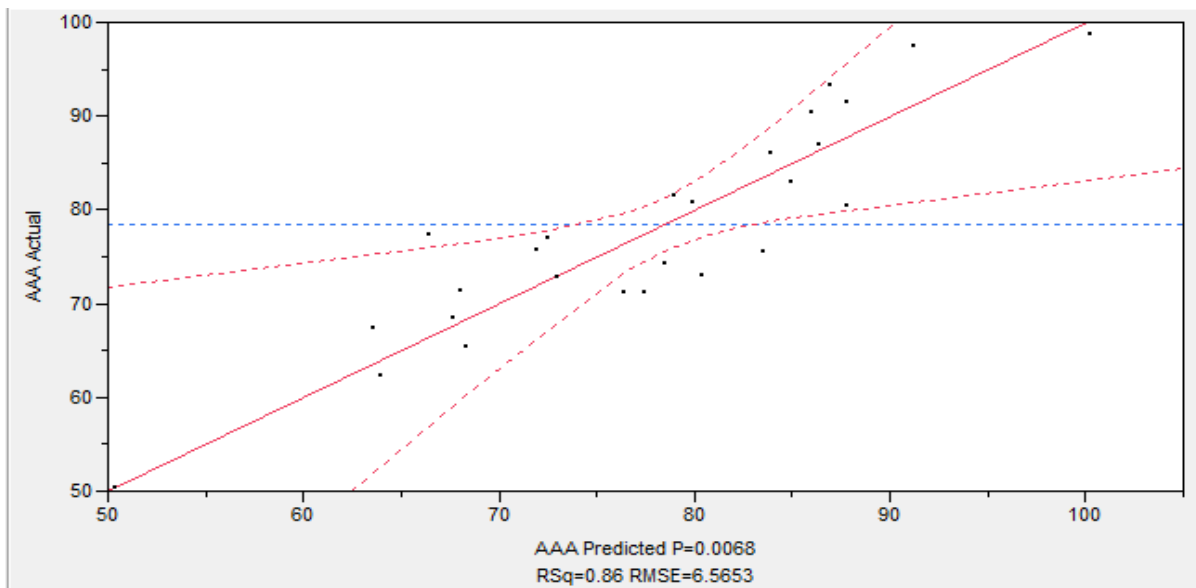


Figure15 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de l'activité antioxydante.

II.2. L'analyse du manque d'ajustement

Tableau 11: Manque d'ajustement du model sur l'activité antioxydante.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	9	392.44214	43.6047	1.0675
Erreur pure	2	81.69660	40.8483	Prob. > F
Erreur totale	11	474.13874		0.9755

Les résultats du manque d'ajustement ont été non significatifs ($p=0,98>0,15$). Ils sont en accord avec les résultats de l'analyse par ANOVA.

II.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs:

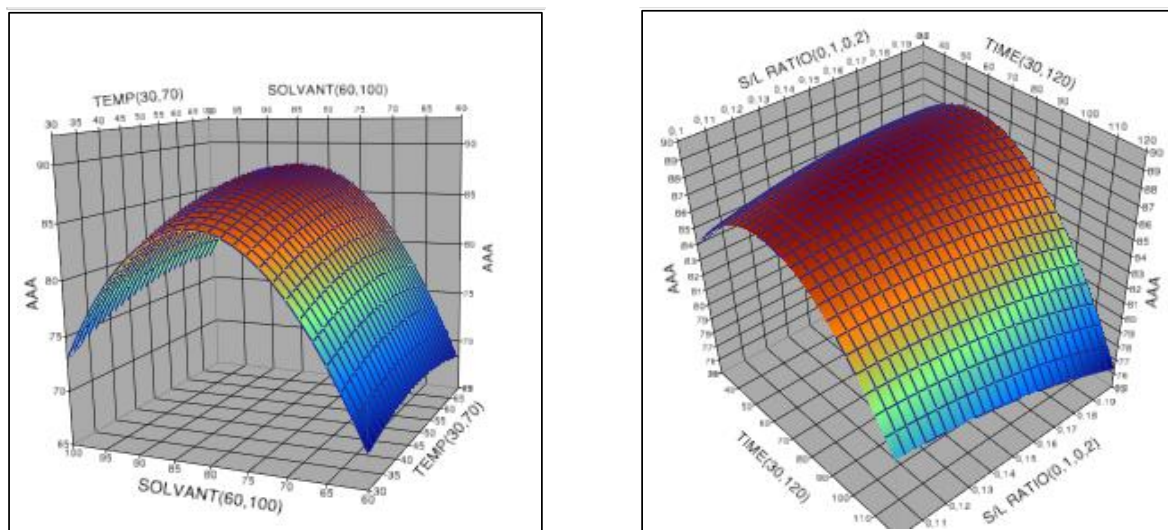
Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et leur influence sur l'activité antioxydante sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Analyse de régression des résultats obtenus antioxydante

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	87.81	3.790493	23.17	<,0001*
Température(30,70)	1.2141667	1.895247	0.64	0,5349
Temps(30,120)	-3.275833	1.895247	-1.73	0,1118
Rapport m/V(0.1,0.2)	-0.496333	2.076139	-0.24	0.8155
Ethanol %(60,100)	3.5086667	2.076139	1.69	0,191
Température*Temps	-15.055	3.282664	-4.59	0,0008*
Température*Rapport m/V	0.225	3.282664	0.07	0,9466
Temps*Rapport m/V	-1.525	3.282664	-0,46	0,6513
Température*Ethanol %	1.0525	3.282664	0.32	0,7545
Temps*Ethanol %	10.7875	3.282664	3.29	0,0073*
Rapport m/V*Ethanol %	-3.231	4.152278	0.78	0,4529
Température*Température	-1.666083	2.874284	-0.58	0.5738
Temps*Temps	-5.438583	2.874284	-1.89	0,0851
Rapport m/V*Rapport m/V	-0.682833	2.96653	-0.23	0,8222
Ethanol %*Ethanol %	-14.43783	2.96653	-4.87	0,0005*

II. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité antioxydante

L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme de surfaces de réponse dans la figure 17.



(A)

(B)

Figure 16: Surface de réponse de la variation de l'activité antioxydante en fonction des conditions d'extraction. (A): le solvant et la température, (B) : le rapport solide/liquide et le temps.

L'application des méthodes statistiques lors de l'optimisation de la composition de mélanges d'huiles essentielles ainsi que de solvants d'extraction afin d'isoler les composés biologiques de la matrice végétale semble être un outil utile pour obtenir les meilleurs paramètres biologiques (Baj *et al.*, 2018). Pour l'obtention d'une extraction complète, l'idéal solvant et celui qui présente une sélectivité maximale, une meilleure capacité d'extraction en terme du coefficient de saturation des molécules dans le milieu et la compatibilité avec le matériel à extraire (Wijesekera, 2010).

Le succès dans la procédure d'extraction dépend, non seulement de la méthode (Pool *et al.*, 1990), mais aussi d'autres paramètres tels le solvant, la température, le temps et la partie utilisée de la plante (Hernández *et al.*, 2009). Dans la littérature, différents solvants ont été utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires, parmi eux l'éthanol avait un pouvoir élevé d'extraction des flavonoïdes (Lonni *et al.*, 2012). Ces affirmations confirment notre

choix d'éthanol comme solvant d'extraction (choisi sur la base d'un essai préliminaire en mesurant la teneur des flavonoïdes).

Les résultats obtenus dans notre essai montraient des teneurs très faibles en flavonoïdes dans les jeunes feuilles du *Pistacia lentiscus*, ceci est en accord avec les résultats obtenus par **Gardeliet al. (2008)** et **Cherbalet al.(2012)**, qui rapportaient que les feuilles de *Pistacia lentiscus*, étaient riches en tannins et pauvres en flavonoïdes. En revanche des teneurs plus élevées de 12.93 à 147.68 mg/g ont été rapportées par **Atmani et al. (2009)** et **Piluzza et Bullitta(2011)** respectivement. Ceci pourrait être expliqué en partie par le stade de développement précoce des feuilles, qui n'avait pas atteint la croissance maximale qui leur procurait une forte activité physiologique, permettant ainsi d'accumuler le maximum de substances bioactives.

Maintes publications ont rapporté que l'activité antioxydante est fortement corrélée avec la teneur en flavonoïdes (**Fang et al., 2009 ; Xia et al., 2010 ; Ignatet al., 2011 ; Piluzza et Bullitta, 2011 ; Beghlal et al., 2016**). Cependant, l'extrait éthanolique du *Pistacia lentiscus*, dans notre essai, exhibait une forte activité antioxydante, malgré sa faible teneur en flavonoïdes. Nos résultats sont en parfaite accord avec ceux rapportés par **Beghlal et al. (2016)**, qui affirmaient que les extraits éthanoliques du *Pistacia lentiscus* montraient une forte activité antioxydante comparée aux huiles essentielles de la même plante. Dans leurs travaux, l'activité antioxydante du *Pistacia lentiscus* a été attribuée, majoritairement, aux tannins, saponines et coumarines. Ceci est expliqué par le fait que la présence de substances phénoliques spécifiques dans l'extrait est influencée par le génotype, la qualité du sol, le climat et les conditions de stress du milieu (**Castro-López et al., 2016**).

Conclusion

Les plantes médicinales présentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. L'extraction des composés phénoliques est une étape primordiale dans l'étude des différentes activités biologiques des plantes médicinales.

Les techniques classiques d'optimisation sont coûteuses, lentes et les résultats ne sont pas toujours reproductibles. Dans les dernières années les méthodes statistiques sont de plus en plus utilisées vue leur rapidité, précision et l'économie du matériel.

L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols à activité antimicrobienne et antioxydante en utilisant la méthodologie de surfaces de réponse. Le plan Box Benken a été utilisé pour l'analyse de l'influence et les interactions entre les variables indépendantes.

A partir des résultats trouvés, on a montré l'efficacité, l'économie (temps et matériels), la reproductibilité et la précision de la méthode de surfaces de réponse pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols, cette dernière est devenue l'alternative des méthodes d'optimisation classiques. Les plans d'expérience fournissent aux chercheurs le maximum d'information avec le minimum d'expériences.

References:

Al-Said M.S., Ageel A.M., Parmar N.S., Tariq M., (1986). Evaluation of mastic, a Crude Drug obtained from *Pistacia lentiscus* for Gastric and Duodenal Anti-ulcer Activity, *Ethnopharmacol*;15(3):271-8.

Ali-Shtayeh M.S., Abu Ghdeib S.I., (1999). Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes, *Mycoses* , 42(11- 12):665-72.

Abbas M., Boudriche D., (2007). Identification et Extraction des Molécules Bioactives de *Pistacia lentiscus L.* et Détermination de Quelques Effets Pharmacologiques, Centre de recherche et de développement, Saidal, Alger.

Atmani D.,Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D., (2009). Antioxydant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, *J. Elsevier, Food Chemistry*, 112 : 303–309.

Athamena S., (2009). Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique, mémoire magister, université el-hadj lakhdar-batna . p: 12.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation*, p : 1120.

Bennick A., (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol. Med.* 13 (2):184-196.

Baudière A., Monange Y., Gauquelin Th., (2002). Le Monde des Plantes; Intermédiaire des Botanistes, Toulouse: 477, 2 – 5.

Barazani O.Z., Dudai N., Golan-Goldhirs., (2003). Comparaison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* Genotype by Random Amplified Polymorphic DNA, Chemical, and Morphological Analyses. *Journal of Chemical Ecology*, 29(8).

Baudoux D., (2003). L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, édition Amyris, 145-146.

Balasundram N., Sundram K., Sammam S., (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products, antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99: 191-203.

Benhammou N., Bekkara A., Kadifkova P., (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L., and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29(3): 155-161.

Bas D., Boyaci I H., (2007).Modelling and optimization II: comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*, February, 78(3): 846- 854.

Benaissa O., (2011).Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. P63.

Baj T., Andrew B., Elwira S., (2018). Department of Pharmacognosy with Medicinal Plant Unit, Medical University of Lublin, Chodzki Str., Lublin, Poland. Lakeridge Health Oshawa, University Heath Network, Hospital Court, Oshawa, ON, L1G 2B9, Canada.

Cheyrier V., (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 223–229.

Chira K., Suh J.H., Saucier C., Teissèdre P.L., (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.

Charef M., Yousfi M., Saidi M., Stocker P., (2008). Determiration of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria, Springerlink.

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R., (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4): 348-361.

Feidemann J., (2005). *World Spices Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy* Springer Verlag, Berlin Heidelberg, European Union, 196.

Grosjean N., (2001). *L'Aromathérapie, Santé et bien-être par les Huiles Essentielles*, Albin Michel, 99.

Ghedira K., (2005). Les flavonoides: Structure, propriétés biologique, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4 : 162-169.

Goupy J., (2005). *Pratiquer les plans d'expériences*. Dunod, Paris, France, 15 : 114-115.

Goupy J., (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad*, 34 : 74-116

Goupy J., Creighton L., (2006). Introduction aux plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.

Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., Komaitis M., (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem* 2008; 107(3): 1120-30.

Hernandez Y., Lobo M.G., Gonzalez, M., (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry* 114 (2), 734–741.

Iauk L., Ragusa S., Rapisarda A., Franco S., Nicolosi V.M., (1996). In vitro Antimicrobial Activity of *Pistacia lentiscus* L. Extracts: Preliminary Report, *Chemother* ; 8(3):207-9.

Iserin P., (2001). Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soin 2ième édition Ed Larousse/VUEF, 13-16, 250, 291-296.

Isbilir S.S., Orak H.H., Yagar H., Ekinci N., (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages., *Acta Sci. Pol.Hortorum Cultus*, 11(3): 223-237.

Janakat S., Al-Merie H., (2002). Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*, *Ethnopharmacol* ; 83(1-2):135-8

Leonti M., Casu L., Sanna F., Bonsegnore L., (2001). A Comparison of Medicinal Plant Use in Sardinia and Sicily, *De Materia Medica* 72, 09122, Italy.

Longo L., Scardino A., Vasapollo G., (2007). Identification and Quantification of Anthocanins in The Berries of *Pistacia lentiscus* L Elsevier, Italy.

Mitchell A., (1986). Tous les Arbres de nos Forêts, édition Bordas, 319.

Mutlib A E., Abbott F S., (1992). Isolation and characterization of carbinolamide and phenolic glucuronide conjugates of (+-)-N-methyl-N-(1-methyl-3, 3-diphenylpropyl) formamide and Nformylmethamphetamine by FAB/MS, LC/MS/MS, and NMR. *Drug Metabolism and Disposition*. 20(3): 451-460.

Montgomery D.C. (2001), *Design and Analysis of Experiments* (5th ed.) New York: John Wiley and Sons, *Journal of Statistics Education*:10(1).

- Martin S., Andriantsitohain R., (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et D'angéiologie*, 51: 304-315.
- Makkar H.P.S., (2003).** Quantification of tannin in tree and shrub foliage. A laboratory manual. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 102.
- More D., White J., (2005).** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, 18 ; 797.
- Macheix J., Fleuriet A., Jay- Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes* : 192.
- Martens S., Mithofer A., (2005).** Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66 : 2399–2407.
- Mohammedi Z., (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen., Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155.
- Nacz M., Shahidi F.,(2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41(5) , 1523-1542.
- Oszmianski J., Wojdylo A., Lamer-Zarawska E., Swiader K., (2007).** Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100:579-583
- Poole S.K., Dean T.A., Oudsema J.W., Poole,C.F., (1990).** Sample preparation for chromatographic separations: an overview. *Analytica Chimica Acta* 236 (1), 3–42.
- Pietta P.G., (2000).** Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S.I., (2003) :** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard., *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36:679-684.
- Quezel P., Santa S., (1962).** Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Rrcherche Scientifique, 611.
- Ribéreau-Gayon P., (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*: 12-27.

Richter G., (1993). Métabolisme des végétaux. In « Physiologie et biochimie ». Ed: Presses polytechniques et universitaires Romandes : 318 - 338.

Vermerris V., Nicholson R., (2006). Phenolic compound biochemistry. Chapter I: Families of phenolic compounds and means of classification. *Edition Springer* :1-32.

Vaya J., Mahmood S., (2006). Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (*Ficus carica* L.), Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and Pistachio (*Pistacia lentiscus* L.), *Biofactors*.;28(3-4):169-75.

Wijesekera., (1991).The Medicinal Plant Industry, CRC Press Inc., Florida.

Yahia M., (1992). La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie, Ain Taya, p59.

Zimmer Z., Cordesse R., (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales*: 9(3) : 167-179.