



République Algérienne Démocratique et
Populaire



Ministère de l'enseignement 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 : Microbiologie

Thème

*Optimisation des conditions de
l'extraction des polyphénols à activité
antibactérienne de *Cytisus villosus**

Présenté par
MEKHACHEFA Samira
DHIB Leila

Encadré par
Mr. BOUSSAA Abdelhalim

Soutenu : 05-06-2016

Jury de soutenance

Président : M^{ème} BOUHALIT Samira MAA Université Abbes Laghrou –Khenchela

Rapporteur : Mr BOUSSAA Abdelhalim MAA Université Abbes Laghrou-Khenchela

Examineur : Mr RAHAL Khalid MAB Université Abbes Laghrou –Khenchela

Promotion : Juin -2016

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

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH tout puissant de m'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. BOUSSAA ABD-ALHALIM pour sa disponibilité, son aide et ses conseils qui ont été bénéfiques et rentables.

Nous remercions les membres de jury : Mr RAHAL KHALID maître d'assistant de l'université Abbes Laghrour Khenchela et M^{me} BOUHALIT SAMIRA maître d'assistant à l'université Abbes Laghrour Khenchela.

Tous les remerciements aux enseignants de notre université ABBES LAGHROUR -KHENCHELA- pour leur précieuse aide et surtout qui ont accepté 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.

SAMIRA+LEILA

Table de matière

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	

Synthèse Bibliographique

Chapitre I Généralités sur la plantes *Cytisus villosus*

I.1. Généralité sur la plante médicinale.....	03
I.2. La plante <i>Cytisus villosus</i>	03
I.2.1. Présentation de la famille des <i>Fabaceae</i>	03
I.2.1.1 Phylogénie.....	04
I.2.2.Présentation du genre <i>Cytisus</i>	04
I.2.3. L'espèce <i>Cytisus villosus</i>	05
I.2.4. Position systématique	06
I.2.5. Optimum écologique	07
I.2.6. Distribution géographique.....	08
I.2.7.Utilisation de la plante de <i>cytisus villosus</i>	08

Chapitre II Les métabolites secondaires

II. Généralité sur les métabolites secondaires.....	10
II.1. Définition les métabolites secondaires	10
II.1.1. Les polyphénols.....	11
II.1.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....	11
A .La voie de Shikimate	11
B. La voie d'acide acétique.....	11
C .La voie des phénylpropanoïdes	13
II.1.1.2. Activités antibactériennes des polyphénols	13
II.1.1.3.L'effet anti oxydant des polyphénols.....	15
II.1.1.4. Les principales classes des composés phénoliques	15
A. Flavonoïdes.....	16
A.1. Localisation et distribution	17
A.2.Activités des flavonoïdes	17
B. Les tanins.....	17
B.1.Classification.....	18
B.1.1.Tanins hydrolysables	18
B.1.2.Tanins condensés (proanthocyanidines).....	19
B.2.Rôle des tannins dans les plantes	20

B.3.Utilisation des tanins.....	20
C. Coumarines.....	20
C.1.Propriétés physico-chimiques des coumarines.....	21
C.2.Intérêt pharmacologique des coumarines.....	21
C.3.Toxicité des coumarines.....	21
D. Alcaloïdes.....	21
D.1.définition.....	21
D.2. Biosynthèse et classification des alcaloïdes.....	22
D.3. Localisation.....	23
D.4. Propriétés physico-chimiques	23
D.5.Propriétés biologiques des alcaloïdes.....	24

Chapitre III Les plans d'expériences

III.1. Généralité	25
III.2. Notions utilisées aux plans d'expériences.....	25
III.2.1.Espace expérimental.....	25
III.2.2. Surface de réponse.....	26
III.2.3. Notion de modélisation mathématique.....	26
III.2.3.1.Equation mathématique.....	26
III.2.3.2. Erreur.....	27
III.2.3.3.La p-valeur.....	27
III.2.3.4. Coefficient de détermination R^2	27
III.3. Types de plans d'expériences.....	27
III.3.1Les plans pour surface de réponse... ..	28
III.3.1.1 Le plan central composite.....	28

Étude Expérimentale

I Matériel et méthode

I. Matériel.....	30
1 .1. Matériel végétal.....	30
I.2. Souches bactériennes.....	30
II. Méthodes	30
II.1. Extraction.....	30
II.2. Dosage des polyphénols totaux..	30
II.3 Tests de l'activité antibactérienne.....	31
II.4. Activité antioxydante	32
II.5.Optimisation de la fermentation lactique par plan d'experience.....	33

II : Résultats et discussion

III. Résultats de l'optimisation par plan d'expérience	35
III. 1.Résultats de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux	35
III. 1.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	36
III.1.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	37
III.1.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs	37

III.1. 4. L'optimisation par surface de réponse du rendement d'extraction des PPT.....	38
III. 1. 5. Validation du modèle.....	39
III. 2. Résultats de l'optimisation de l'activité Anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	39
III. 2.1.L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	41
III.2.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	41
III.2.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs	41
III.2. 4.L'optimisation par surface de réponse de l'activité Anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	42
III.2.5. Validation du modèle.....	43
III. 3. Résultats de l'optimisation de l'activité Anti- <i>E.coli</i>	43
III. 3.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	45
III.3.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	45
III.3.3.L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs	45
III.3. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Anti- <i>S. aureus</i>	46
III.3.5. Validation du modèle.....	47
III. 4. Résultats de l'optimisation de l'activité Antioxydante.....	47
III. 4.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	48
III.4.2. L'analyse du manque d'ajustement.....	49
III.4.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs.....	49
III.4. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Antioxydante.....	50
III.4.5. Validation du modèle	51
IV. Discussion des résultats de l'optimisation par plan d'expérience.....	51
Conclusion.....	54
Références Bibliographiques.....	55
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

Symbole	Désignation
APGII	Angiosperms Phylogeny Group
ATCC	American type culture collection
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
FO	Folin–Ciocalteu
GAE	Acide Gallique
GN	Gélose nutritif
MeOH	Méthanol
MH	Mueller Hinton
NaCl	Chlorure de sodium
Na₂ CO₃	Carbonate de sodium
nm	Nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PPT	Polyphénol totaux
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unité formant cellule
µl, ml	Microlitre, milliliter

Liste des figures	Page
Figure 1 : Famille des <i>Fabacea</i>	04
Figure 2 : Différentes espèces de genre <i>Cytisus</i>	05
Figure 3 : <i>Cytisus villosus</i> avec ses différentes parties.....	06
Figure 4 : Les caractéristiques climatiques et caractéristiques du sol de <i>cytissus villosus</i>	08
Figure 5 : Formation d'une chalcone à partir d'acide acétique et l'acide p-coumarique.....	12
Figure 6 : Formation des différents flavonoïdes à partir des chalcones.....	12
Figure 7 : Structure de base générale des flavonoïdes.....	16
Figure 8 : Structures des majeures classes de Flavonoïde.....	17
Figure 9 : Des éléments des tanins.....	18
Figure 10 : Structure de tanins hydrolysables.....	19
Figure 11 : Structure des tanins condensés et leur monomère.....	19
Figure 12 : Structure des skytantines et les conines	22
Figure 13 : Structure des cathinone.....	22
Figure 14 : Domaine de variation d'un facteur.....	25
Figure 15 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse.....	26
Figure 16 : 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.....	29
Figure 17 : Aromatogramme sur boite de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné de l'extrait végétale.....	32
Figure 18 : Surface de réponse de l'influence des différents facteurs sur le rendement de l'extraction des polyphénols.....	38
Figure 19 : zones d'inhibition d'extrait appartenant à la plante <i>Cytisus villosus</i>	40
Figure 20 : Surface de réponse La variation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction des conditions d'extraction.....	42
Figure 21 : zones d'inhibition d'extrait appartenant à la plante <i>Cytisus villosus</i>	44
Figure 22 : Surface de réponse La variation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis <i>E.coli</i> en fonction des conditions d'extraction.....	46

Figure 22 : Surface de réponse La variation de l'activité oxydante vis-à-vis en fonction des conditions d'extraction.....	50
--	-----------

Liste des tableaux	Page
Tableau I : principaux composés phénoliques ayant une activité antibactérienne.....	13
Tableau II : principales classes des composés phénoliques.....	15
Tableau III : Principaux types de coumarines.....	20
Tableau IV : la solubilité des alcaloïdes.....	23
Tableau V : regroupe les facteurs utilisés ainsi que leurs niveaux.	34
Tableau VI : Matrice d'expérience pour les polyphénols totaux.....	35
Tableau VII : L'analyse de la variance pour le taux des polyphénols totaux (PTT).....	37
Tableau VIII : L'analyse de la variance pour le taux des polyphénols totaux (PTT).....	37
Tableau IX : Analyse de régression des résultats obtenus pour le taux des PPT.....	37
Tableau X : Conditions optimales de l'extraction des PTT.....	39
Tableau XI : Résultats de l'activité Anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Tableau XII : analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition.....	41
Tableau XIII : Manque d'ajustement du model CCD sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Tableau XIV : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité anti <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Tableau XV : Conditions optimales de l'extraction des PTT à activité anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Tableau XVI : Résultats de l'activité Anti- <i>E.coli</i>	44
Tableau XVII : Analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition d' <i>E.coli</i>	45

Tableau XVIII : Manque d'ajustement du model sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>E.coli</i>	45
Tableau XIX : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité anti <i>E.coli</i>	45
Tableau XX: Conditions optimales de l'extraction des PTT à activité <i>anti-E.coli</i>	47
Tableau XXI : Résultats de l'activité Anti- <i>E.coli</i>	48
Tableau XXII : Analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition d' <i>E.coli</i>	49
Tableau XXIII: Manque d'ajustement du model sur l'activité antioxydante.....	49
Tableau XXIV : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité antioxydante.....	49
Tableau XXV: Conditions optimales de l'extraction des PTT à activité antioxydante.....	51



Résumé

Résumé

L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols des parties aériennes de *Cytisus villosus* à activité antioxydante et antibactérienne. L'optimisation est réalisée en utilisant le plan central composite en prenant en considération quatre facteurs (Température, temps, rapport m/V, et la concentration du méthanol). Le taux des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), le pouvoir antioxydant, ainsi que l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *E.coli*, ont été évalués pour chaque extrait. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les quatre réponses ($p < 0,05$) et R^2 [0,89 - 0,96]. L'établissement des équations polynomiales quadratiques et les courbes de surface de réponses nous a permis d'étudier l'influence de chaque facteur sur l'extraction des polyphénols, 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, *Cytisus villosus*, Plan d'expérience, activité antioxydante, activité antimicrobienne, Plan central composite.



Abstract

المخلص :

الهدف ن عملنا هو تحسين استخراج مادة البوليفينول لأوراق نبات اللوز ذات النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للجراثيم. ويتحقق الأثر باستخدام النموذج المركزي المركب مع الأخذ بعين الاعتبار أربعة عوامل (درجة الحرارة، الوقت، تركيز الميثانول، النسبة كتلة/الحجم). تم تقييم معدل إجمالي البوليفينول، قوة ضادات الأكسدة والنشاط البكتيري مقارنة بالبكتيريا موجبة وسالبة الجرام، لكل عينة. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن النموذج متناسق مع الاستجابات الأربعة $R^2 = 0.96-0.89$ و $P < 0.05$. إثناء المعادلات متعددة الحدود من الدرجة الثانية ونحنيات استجابة السطوح سمح لنا بدراسة تأثير كل عامل على استخراج مادة البوليفينول، والتداخل بين العوامل المختلفة وفي النهاية كنا قادرين على التحقق من صحة هذا النموذج بتطبيق القيم المثلى لكل عامل. وجدت النتائج أنها كانت قريبة جداً من النتائج التي تنبأ بها نموذج.

الكلمات المفتاحية: ، *Cytisus villosus* (اللوز)، خطط التجربة، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروب المخطط المركزي المركب.

summary

Abstract

The aim of this is to optimize extraction of antioxidant and antibacterial polyphenols of aerial part of *Cytisus villosus*. Optimization is achieved using the central composite design taking into consideration four factors (temperature, time, the ratio m / V, and the concentration of the methanol). The rate of total polyphenols (using Folin-Ciocalteu reactive), the antioxidant and antimicrobial activity against *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, were evaluated for each sample. The results were shown that the model is adjusted properly to all responses with ($p < 0, 05$) and R^2 [0.89 -0.96]. The establishment of quadratic polynomial equations and response surface curves allowed us to study the influence of each factor on the extraction of polyphenols, 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, *Cytisus villosus*, design of experiment, antioxidant activity, antimicrobial activity, central composite plan.



*Introduction
Générale*

Introduction

Selon les estimations de l'OMS, (2002) (Organisation mondiale de la santé) plus de 80% de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. La toxicité des produits chimiques, le coût élevé des médicaments chimiques, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural qui limite une prise en charge véritable des problèmes de santé publique, tous ont favorisé le recours à cette pratique. L'Algérie ne fait pas exception et l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire. Les cas de toxicité à cause de l'utilisation de ces plantes reconnues médicinales ne cessent d'augmenter.

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 riches en polyphénols (**Mutlib et Abbott, 1992**). La solubilité des polyphénols est très influencée par leurs structures chimiques, qui peut être variée de petite molécule contenant différents groupements fonctionnels à des grosses molécules (tannins).

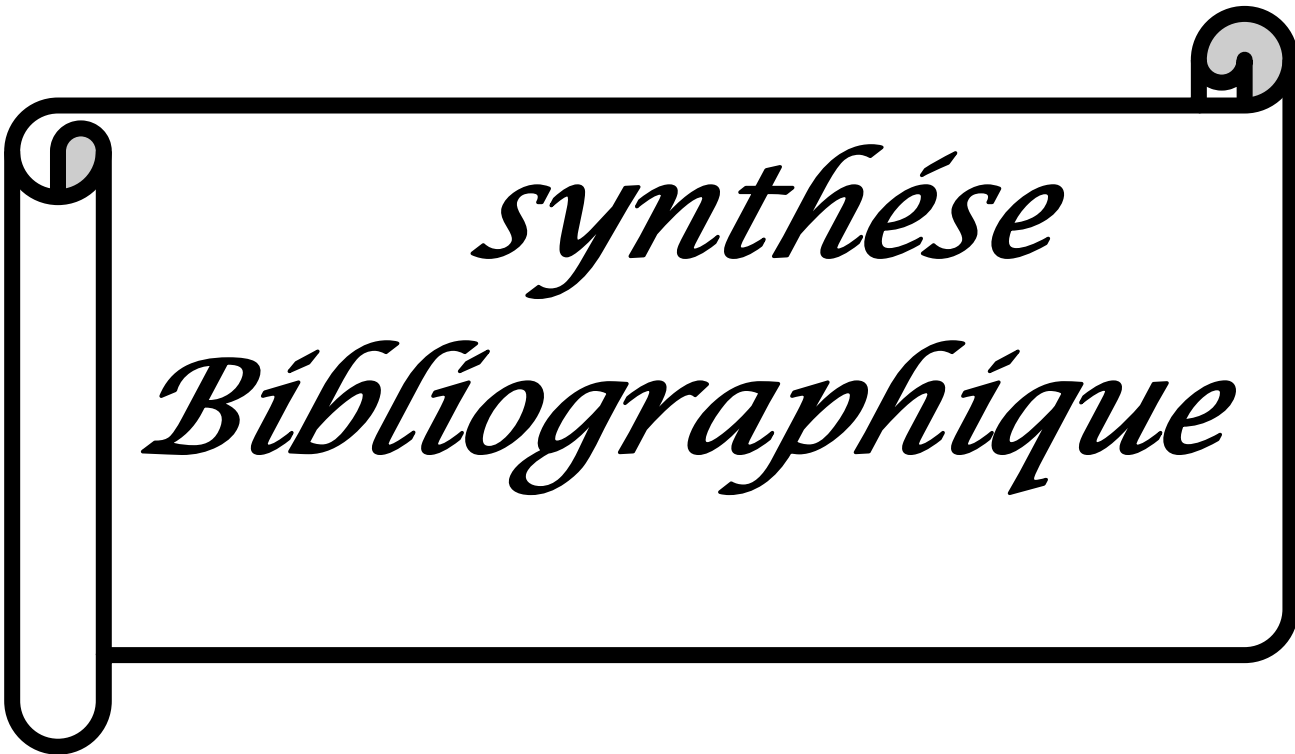
Prenant en considération une optimisation de l'extraction est plus que nécessaire pour l'extraction et la sélection des composés phénoliques à activité biologiques (**Nacz et Shahidi, 2006**).

Les techniques conventionnelles impliquent le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables; elles sont longues et inaptes à déterminer le point optimal dû aux interactions entre les différents facteurs (**Weuster-Botz, 2000**). Alors que, les techniques statistiques offrent plusieurs avantages, elles sont rapides, fiables et permettent de réduire le nombre des expériences. Ces techniques statistiques ont été utilisées dans l'optimisation de l'extraction des polyphénols à activité antioxydante (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005 ; Radojkovic et al., 2012 ; Kraujalis et al., 2015**). D'une autre part aucune étude n'a été menée sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols à activité antimicrobienne.

Le but de notre étude est d'optimiser l'extraction des polyphénols de *Cytisus villosus* à activité antimicrobienne et antioxydante en utilisant les méthodes statistique appelé Plans d'expérience.

Notre travail est subdivisé en deux parties : une partie théorique qui englobe et rassemble des données théoriques sur les plantes médicinales et leurs substances bioactives(les polyphénols), et des généralités sur les plans d'expérience.

La partie pratique est partagée en quatre parties : 1- une étude phytochimique des extraits d'espèce végétales : *Cytisus villosus* ; 2- mesure du potentiel antibactérienne, dans cette partie, nos essais ont été dirigé contre les bactéries : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; 3- une étude des activités antioxydante ; 4- en fin la discussion des résultats obtenus.



synthèse
Bibliographique



Chapitre I

I.1. Généralité sur la plante médicinale

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours et l'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, étudie les poisons et les remèdes naturels, ou par extension la plupart, des substances biologiquement actives (Mohammedi, 2013).

Une plante médicinale est définie par « la pharmacopée française note 1 » comme une « drogue végétale », dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (Mohammedi, 2013).

I.2. La plante *Cytisus villosus*

I.2.1. Présentation de la famille des *Fabaceae*

La famille des Fabacées se compose de plantes dicotylédones. Cette famille est aussi appelée couramment Légumineuses (*Leguminosae*) ou Papilionacées (*Papilionaceae*), mais ce ne sont pas de vrais synonymes. Chaque nom s'applique à un caractère particulier du fruit et de la fleur de ces familles de plantes. Schématiquement le terme « légumineuses » désigne des plantes dont le fruit est une gousse (1). Appelé gousse ou légume ; la gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines exalbuminées. Les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées (De Witt, 1963).

Fabacées c'est une grande famille constituée de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres. Cette famille se divise en plusieurs tribus dans lesquelles les genres sont groupés selon le port de la plante, la forme des feuilles et le degré de fusion des étamines (Bhattacharyya et Johri, 1998).

C'est le plus grand ensemble angiospermien, cosmopolite, prédominant en individus et en espèces dans de nombreux biomes, et surtout en régions tropicales (Spichiger *et al.*, 2004).



Figure 1 : Famille des *Fabacea* (2).

I.2.1.1 Phylogénie

Cette famille est monophylétique sur base d'études moléculaires et morphologiques. Elle est proche des Polygalaceae et Surianaceae. Trois sous-familles sont reconnues sur base d'analyses morphologiques : *Faboideae* (corolle papilionacée), *Caesalpinoideae* (corolle à symétrie radiaire) et *Mimosoideae* (corolle intermédiaire entre les 2 autres formes). Cependant, certaines analyses phylogénétiques basées sur la morphologie et des séquences ADN montrent que les *Caesalpinoideae* sont paraphylétiques à certains genres au sein des *Mimosoideae* et *Faboideae* (3).

I.2.2. Présentation du genre *Cytisus*

Relativement petites, à 3 folioles à peu près arrondies et terminées chacune par une toute petite pointe; les feuilles inférieures et celles des rameaux sans fleurs ont un court pétiole. Ces feuilles sont plus ou moins coriaces, sans poils, d'un vert pâle en dessous et ne noircissent pas lorsqu'elles se dessèchent, le calice est relativement court et sans poils. L'étendard, sans poils, est plus long que la carène courbée et qui se termine en une sorte de bec dressé.

Le fruit mûr est sans poils, assez aplati, de 25 à 35 millimètres de longueur sur 9 à 11 millimètres de largeur. C'est un arbrisseau à tiges brunes, dont les rameaux ont la surface verte, toute la plante est dépourvue de poils. Il peut se produire- des bourgeons adventifs sur les racines (4).



Figure 2 : Différentes espèces de genre *Cytisus* (2).

I.2.3. L'espèce *Cytisus villosus* : *Cytisus triflorus* L'Hérit, *Cytise à trois fleurs* [Synonymes : *Cylisus villosus*].C'est un arbrisseau de 1 à 2 m qui épanouit ses fleurs jaunes depuis le mois de février jusqu'au mois de juin dans les bois, parmi les buissons ou sur les coteaux de la région méditerranéenne.

Les fleurs sont en général disposées par trois à l'aisselle des feuilles supérieures, de façon que l'ensemble de la partie fleurie d'un rameau forme une sorte de grappe feuillée. Les feuilles sont pétiolées et à trois folioles dont la foliole médiane est plus grande que les autres. Vers la base de la partie fleurie, ces folioles sont plus longues que les fleurs. Le calice est relativement court et poilu, l'étendard se replie sur le dos et est alors plus court que la carène, il est sans poils, Lachelé et strié de brun rougeâtre vers la base et la carène est presque en forme de bec au sommet. D'autre part, le fruit à environ 3 centimètres de longueur est couvert de poils roux appliqués, il contient 6 à 8 graines jaunâtres (**figure 3**).

C'est un arbrisseau dont les jeunes rameaux et les feuilles sont revêtues de longs poils roussâtres, parfois blancs sur les jeunes feuilles, ces poils tombent facilement et les jeunes rameaux sont à 5 angles bien marqués (4).

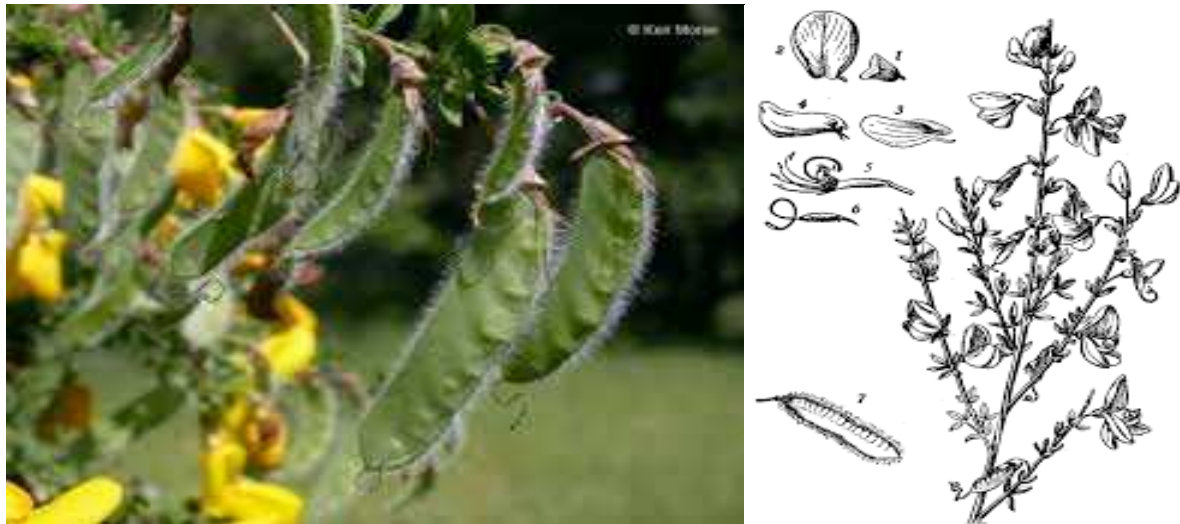


Figure 3 : *Cytisus villosus* avec ses différentes parties (2).

- **Écologie :** Bois et buissons du Midi : Alpes-Maritimes, Var, Hérault, Aude, Pyrénées-Orientales ; Corse.
- **Répartition:** Région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique (5).
- **Floraison :** de mai à juin.
- **Hauteur :** 1 à 3 m.
- **Fleur :** 12 à 14 mm.
- **Altitude :** 0 à 400 m. (6).

I.2.4. Position systématique : Selon les classifications, la composition de cette famille varie :

- Le nom Fabacées, au sens limité, est adopté en classification classique de Cronquist (1981). Ce groupe est nommé *Fabaceae* ou *Papilionaceae*. Cette famille comprend 12 000 espèces réparties en plus de 400 genres. (En classification phylogénétique, ce groupe des plantes serait la sous-famille *Faboideae*.)
- Le nom Fabacées, au sens large, est adopté en classification phylogénétique APG II(annexe N°6) (2003). Ce groupe est nommé *Fabaceae* ou *Leguminosae*. Cette famille comprend 18 000 espèces réparties dans trois sous-familles. (En classification classique,

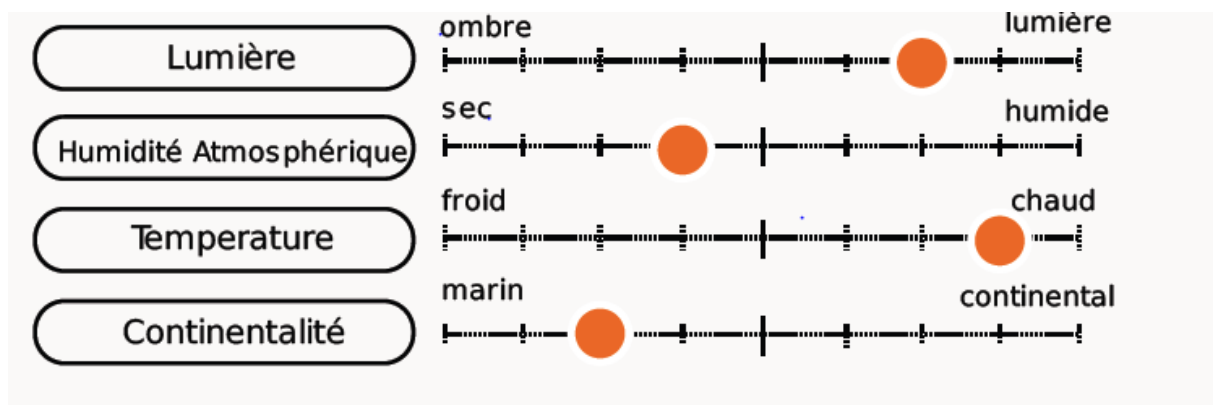
ce groupe des plantes serait l'ordre des *Fabales* avec trois familles.).

Les trois sous-familles :

- sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée.
- sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière.
- sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon (7).

Régne	<i>Plantae</i>
Sous-régne	<i>Tracheobionta</i>
Super-division	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Class	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-class	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Faboideae</i>
Genre	<i>Cytisus</i>
Espèce	<i>Cytisus villosus</i>

I.2.5. Optimum écologique : *Cytisus villosus* est une espèce endémique de la région méditerranéenne elle est commune entre 0-400m d'altitude qui a des caractéristiques climatiques et vit dans des conditions favorables de sol.



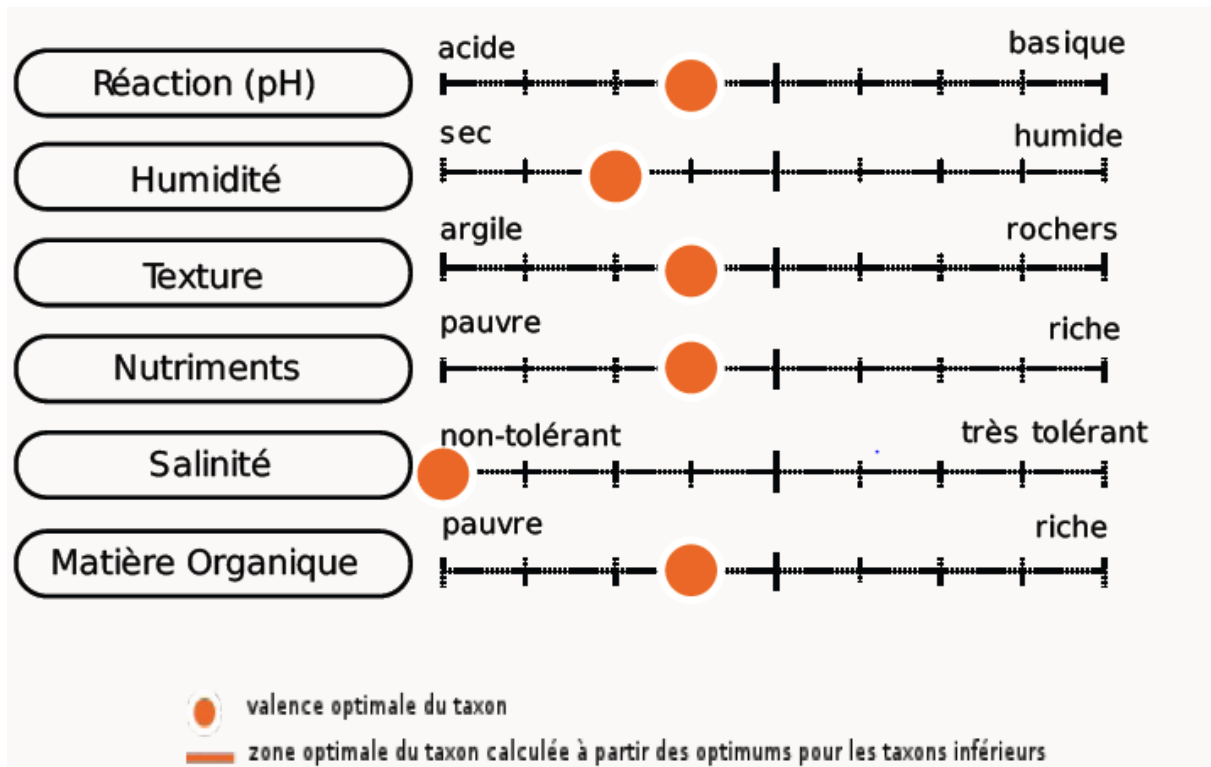


Figure 4 : Les caractéristiques climatiques et caractéristiques du sol de *cytisus villosus* (8).

I.2.6. Distribution géographique

Le genre *Cytisus* (famille des *Fabacées*) se compose d'environ 70 espèces confinées aux régions de climat doux du sud et du centre de l'Europe, l'Afrique du Nord et Asie de l'Ouest (Sundararajan *et al.*, 2006).

I.2.7. Utilisation de la plante de *cytisus villosus*

Les plantes sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle en raison de leurs activités bénéfiques. Le genre *Cytisus* (famille des *Fabacées*) se compose d'environ 70 espèces confinées aux régions de climat doux du sud et du centre de l'Europe, l'Afrique du Nord et Asie de l'Ouest (Sundararajan *et al.*, 2006). Études nombreux cité l'utilisation de plantes de ce genre à des fins médicinales comme hypotenseur, antidiabétiques, anti-inflammatoire, diurétique (Sundararajan *et al.*, 2014) (Pereira *et al.*, 2012) et des études pharmacologiques ont confirmé certaines des ethnomedicalinformations (González *et al.*, 2013) (Sundararajan *et al.*, 2006).

L'analyse a montré que les espèces végétales les plus couramment utilisés dans le traitement de la peau sont généralement utilisés comme un cataplasme. *Cytisus villosus*, est utilisé comme un cataplasme contre l'eczéma et les infections fongiques en raison de ses propriétés astringentes, antiseptiques et cicatrisation des plaies et blessures propriétés, ou en combinaison avec de l'huile d'olive pour guérir les brûlures. . Les espèces mentionnées ci-dessus sont utilisés dans le traitement de diverses blessures, la chirurgie, le gonflement et les brûlures. **(Hamdi Pasha *et al*; 2002).**



Chapitre II

II. Généralité sur les métabolites secondaires

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante.

Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes et stérols, les alcaloïdes, les polycétides, etc. Outre la très grande diversité chimique qu'ils représentent, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes dédiés. Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement (**Newman et Cragg , 2012**).

Sur le plan agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes), mais a été relativement peu exploité pour ce qui concerne le développement de variétés résistantes. D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale. Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tel que le Taxotère, ou la Vinorelbine utilisés dans le traitement de certains cancers (**Gobbi et Khebbaz , 2014**).

II.1. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires représentent une variété très large de composés organiques sans fonction directe dans la croissance et le développement des plantes (**Amlan , 2010**). Les métabolites secondaires constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon. Il s'agit majoritairement de molécule de taille et de masses faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Elles sont majoritairement à la source d'odeurs jouant les rôles à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement (**Sylvain, 2010**).

II.1.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal. Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (**Akroum, 2011**).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Boudjouref, 2011**). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Yakhlef, 2010**).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boudjouref, 2011**).

II.1.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques

A. La voie de Shikimate

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols: l'acide cinnamique (**Riberau, 1968**).

B. La voie d'acide acétique

Cette voie donne naissance aux Flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine:

- ✓ 3 molécules d'acétyl COA (cycle A)
- ✓ Une molécule de p-coumaryl COA (cycle B et l'hétérocycle C)

La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certains monomères de types flavanols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés. Les figures 6 et 7 représentent les différentes étapes de formation des flavonoïdes par voie d'acide acétique (**Riberau, 1968**).

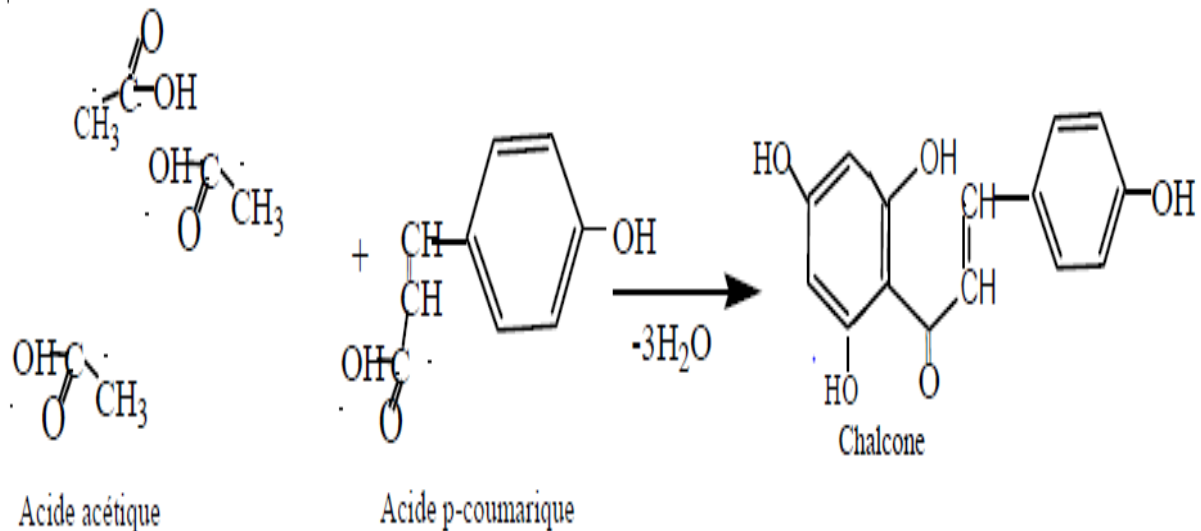


Figure 5: Formation d'une chalcone à partir d'acide acétique et l'acide p-coumarique (**Riberau, 1968**).

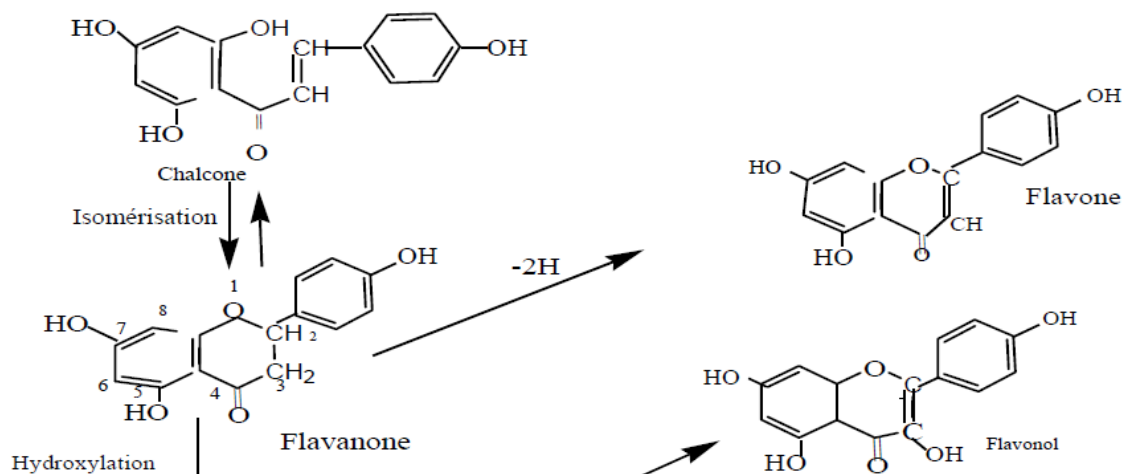


Figure 6 : Formation des différents flavonoïdes à partir des chalcones (**Riberau, 1968**).

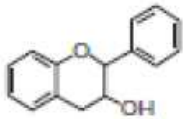
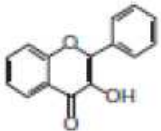
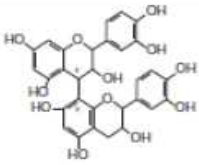
C. La voie des phénylpropanoïdes

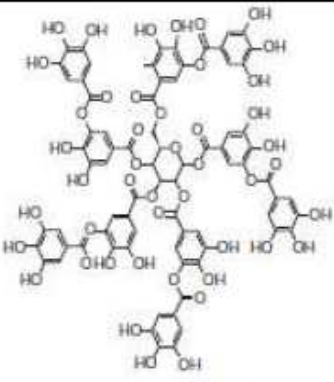
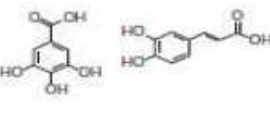
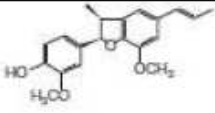
Cette séquence biosynthétique permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques : acide coumarique, caféique, férulique et sinapique qui se présentent généralement sous forme d'esters ou de glucosides (Riberau, 1968).

II.1.1.2. Activités antibactériennes des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antibactériennes importantes et diverses, probablement dues à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999); Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Tableau I: principaux composés phénoliques ayant une activité antibactérienne d'après (Daglia, 2011).

Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 Flavane-3-ol	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 Flavonole	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 Tanins condensés	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i>

 <p>Tanins hydrolysables</p>	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Lysteria</i> .
	Champignons	<i>Candida parapsilosis</i>
 <p>Acides phénoliques</p>	Bactéries	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> .
 <p>Néolignane</p>	Bactéries	Différentes souches de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement via la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines (**Mason et Wasserman, 1987**). L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (**Daglia, 2011**). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendre perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (**Daglia, 2011**).


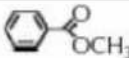

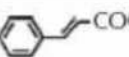
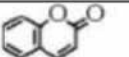
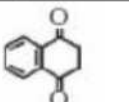
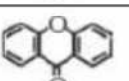
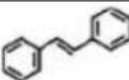
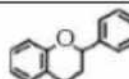
II.1.1.3.L'effet anti oxydant des polyphénols

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce Principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, et dernièrement dans celle de flavay (**Masquellier, 2006**). Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux, comme l'oxyde nitrique qui permet une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (**Florentin, 2004; Masquellier, 2006**). En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et cosmétiques.

II.1.1.4. Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Laraoui, 2007**); Les différentes classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau II.

Tableau II : principales classes des composés phénoliques. D'après (**Bruneton, 1999; Hennebelle, 2006**).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl-acétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculetine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

A. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de La plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes decarbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004).

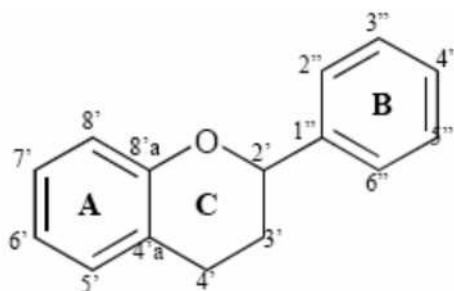


Figure 7 : Structure du 2-phényl chromane (Yakhlef, 2010).

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont :

- Flavones,
- Flavonols,
- Flavanones,
- Dihydroflavonols, Isoflavones,
- Isoflavon,
- Flavanes,
- Flavanols et anthocyanines.

De plus, le noyau pyranique central peut être ouvert (chalcones) et recyclisé en un noyau furanique (Boudjellal, 2009).

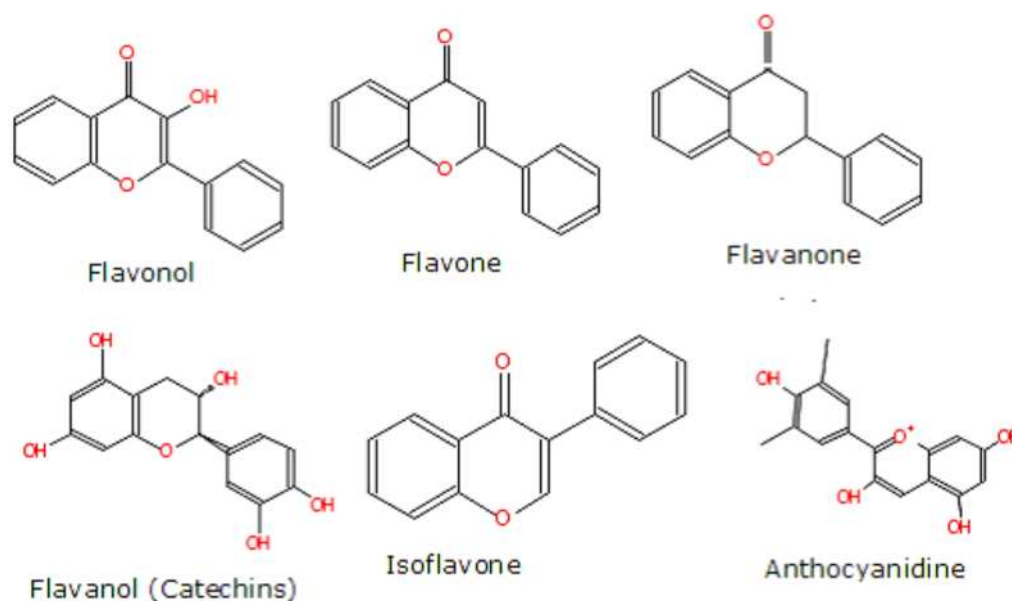


Figure 8 : Structures des majeures classes de Flavonoïde (Parul *et al.*, 2007).

A.1. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont amplement répandus dans le règne végétal (graines, fleurs, fruits, feuilles) (Dacosta, 2003). On les trouve aussi chez les Psylotales, les Fougères, Angiospermes, Asteraceae ...etc. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1999).

A.2. Activités des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités telles que : l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, oestrogénique, antiallergique, antioxydant, cytotoxique et anti tumorale. Ils jouent un rôle important dans la protection des systèmes biologiques contre les effets néfastes des processus oxydants sur des macromolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Atmani *et al.*, 2009 ; Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011). Il a été constaté que les flavonoïdes réduisent le taux des lipides et de glucose chez les êtres humains et encore améliorent l'immunité humaine (Atoui *et al.*, 2005).

B .Les tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé (Muanda, 2010). Les tannins sont des composés phénoliques très

abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables) (Akroum, 2006). Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da (Rira, 2006). Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (Akroum, 2006). Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives,

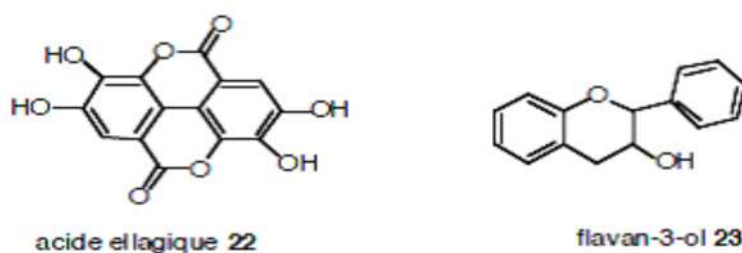


Figure 9 : Des éléments des tanins (Krief, 2004).

B.1. Classification

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes distincts. Les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Yezza et Bouchama, 2014).

B.1.1 Tanins hydrolysables

Ce sont des esters du glucose (ou de molécules apparentées) et d'acides phénols qui sont :

- Soit l'acide gallique, on parle alors de tanins galliques
- Soit l'acide ellagique, qui est un dimère de l'acide gallique, on parle alors de tanins ellagiques.

Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou plusieurs molécules d'acide ellagique (Ghestem *et al.*, 2001)



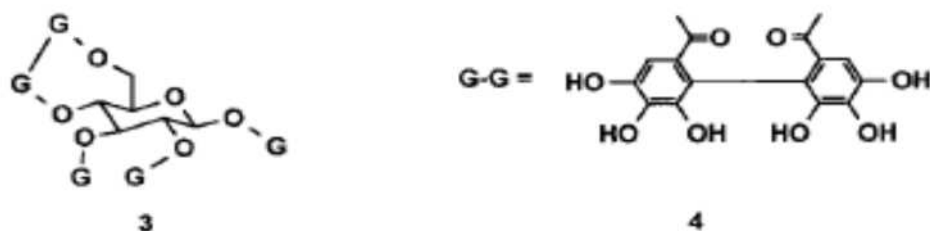


Figure 10 : Structure de tanins hydrolysables (Hartzfeld *et al.*, 2002)

B.1.2. Tanins condensés (proanthocyanidines)

De structure plus complexe, ils sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux plantes plus primitives, fougères et gymnospermes. Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux. Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses possibilités en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique (Okamura *et al.*, 1993 ; Aganga et Mosase, 2001 ; Peronny, 2005).

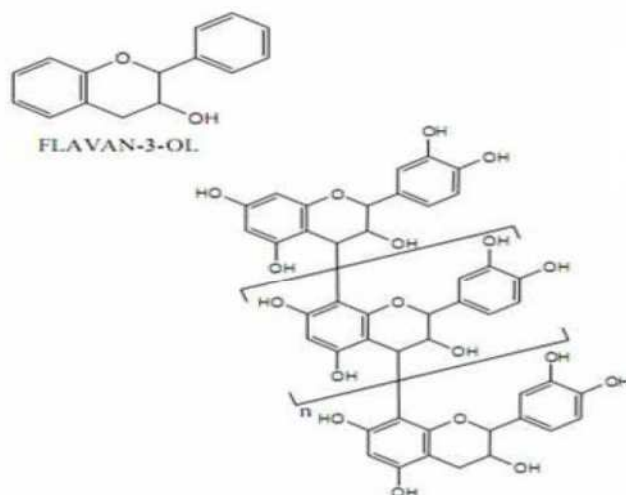


Figure 11: Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

B.2. Rôle des tannins dans les plantes

La synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tannins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui inhibe leur développement.

Les tannins sont aussi un moyen de défense contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores. La présence des tannins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation (**Boussaid , 2013**).

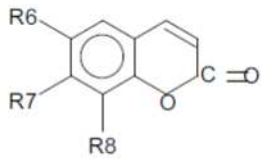
B.3. Utilisation des tanins

- ✓ **En pharmacie** : Grâce à leurs astringente les tanins sont utilisés comme anti-diarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes.
- ✓ **Dans l'industrie** : Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures (**Mourad , 2011**).

C. Coumarines

Les coumarines sont des composés dérivés des acides hydroxycinnamiques, sont des hétérocycles oxygénés, leur structure de base est benzo-2-pyrone (**Iwueke et al., 2008**). Les principaux types des coumarines sont dans le tableau III.

Tableau III : Principaux types de coumarines (**Macheix et al., 2005**).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

C.1. Propriétés physico-chimiques des coumarines

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin, examinées en lumière ultra-violette (**Hamimed, 2009**).

C.2. Intérêt pharmacologique des coumarines

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique. En 1957, O'Neal et son équipe ont montré l'efficacité des coumarines pour bloquer le cancer induit chimiquement par les radiations ultraviolettes. Ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes. Pour l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (**Yezza et Bouchama, 2014**).

C.3. Toxicité des coumarines

La coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi ; chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur de coagulation du sang (**Schorderet, 1992 ; Repcak et al., 2001 ; Khan et al., 2005**).

Chez l'homme la consommation des espèces végétales qui renferment des furanocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermatite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours après le contact, les zones touchées présentent une hyperpigmentation (**Bruneton, 1999**).

D. Alcaloïdes

D.1. Définition

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote, la plupart possèdent une activité

biologique marquée qui a suscité de longue date un intérêt thérapeutique. Leur dénomination – de l'arabe *al kali* (qui a donné « alcali ») (Poisson, 2015).

D.2. Biosynthèse et classification des alcaloïdes

Pour certains auteurs, les alcaloïdes sont bio synthétiquement formés à partir d'un acideaminé et l'azote est inclus dans un système hétérocyclique, ces éléments caractérisent les alcaloïdes vrais. Par ailleurs, d'autres auteurs distinguent :

- **Les pseudo-alcaloïdes** : présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas des terpénoïdes.



Figure 12 : structure des skytantines et les conines (Mezouar , 2012).

- **Les proto-alcaloïdes** : sont des aminés simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique : ils ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acide aminé. Diverses substances répondent à cette définition : des aminés simples comme la sérotonine, la mescaline du peyotl ou la cathinone du thé des Abyssins et aussi les bétaines (Bruneton, 1999).

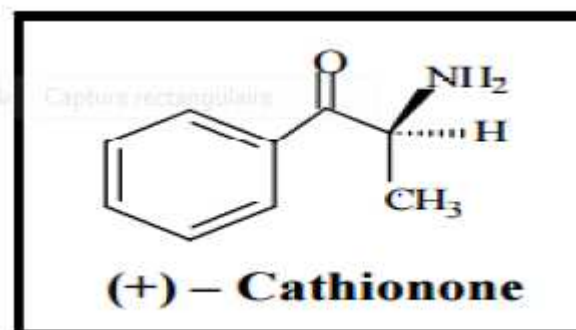


Figure 13: structure des cathinone (Bouhadjera , 2005).

D.3. Localisation

Les lieux d'élaboration des alcaloïdes dans les plantes sont variables suivant les espèces. Ce sont les tissus jeunes, en phase de croissance et les tissus périphériques – cellules épidermiques ou sous-épidermiques des feuilles, téguments des graines, partie corticale des racines – qui constituent les sites privilégiés de production. La mise en évidence d'alcaloïdes dans les tissus fait appel à des réactifs de précipitation ou de fluorescence. Ils y existent soit à l'état libre, soit le plus souvent combinés à des acides organiques banals (acide tartrique) ou des acides spécifiques de leur origine (acide méconique du pavot, acides tiglique et angélique des *Veratrum*). On a remarqué que, dans les cultures *in vitro*, il se formait des combinaisons insolubles avec des macromolécules cellulaires (Poisson, 2015).

D.4. Propriétés physico-chimiques

Des alcaloïdes en grande quantité sont capables de détruire les liaisons phosphodiester d'un organisme, par hydrolyse avec un groupe hydroxyle (OH) libre. Ces phosphodiester étant chargés de la dégradation des lipides et glucides dans le corps, leur stockage est perturbé. Une application pratique de cet effet est observée chez les fumeurs (la nicotine étant un alcaloïde d'origine végétale), qui ont tendance à prendre du poids lorsqu'ils arrêtent de fumer. Les nucléotides composant l'ADN et l'ARN sont elles aussi liées par des liaisons phosphodiester. Si elles sont détruites, cela risque d'entraîner des erreurs de copie de l'information génomique, et donc altérer le codage des acides aminés formant les protéines du corps. Si l'altération est suffisante pour aboutir à une protéine totalement différente, le fonctionnement de l'organisme peut s'en trouver changé. Et comme la réparation de l'ADN passe également par les liaisons phosphodiester, si celles-ci sont détruites, l'erreur génétique va persister et peut aboutir à des cancers. On remarque d'ailleurs le taux élevé de cancer du poumon chez les plus gros consommateurs de nicotine (Guignard, 2000).

Tableau IV : la solubilité des alcaloïdes (Ghestem *et al.*, 2001)

pH alcalin	pH acide
Insoluble dans H ₂ O	Soluble dans H ₂ O et les alcools (M ₂ OH, Et OH)
Soluble dans les solvants organiques apolaires Et les alcools (MeOH, Et OH)	Soluble dans les solvants organiques apolaires
(non ionisé)	(ionisé)

D.5. Propriétés biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (**Bruneton, 1999**). Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en « ine ». D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs (**Bruneton, 1999**).



Chapitre III

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 14). 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.

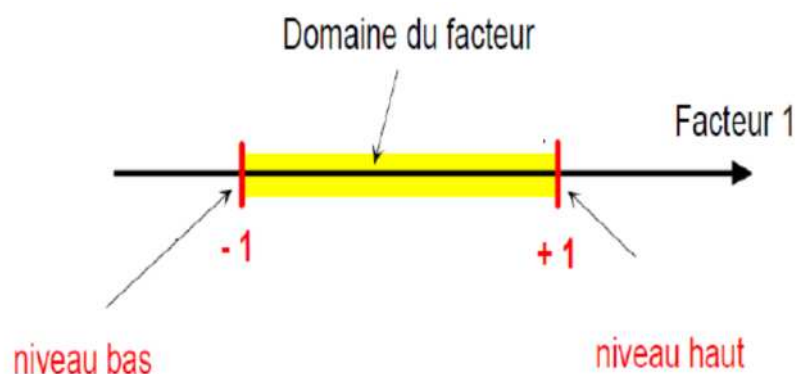


Figure 14 : Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

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 15).

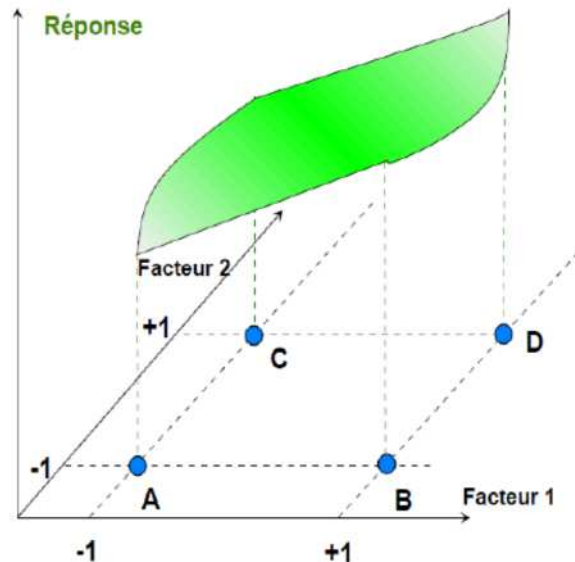


Figure 15 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

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 ».

- $a_0, a_i, a_{ij}, a_{iii}$ 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. Le plan centrale composites

Les plans composites se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet ou fractionnaire complété par des points au centre pour vérifier la validité du modèle. Si les tests de validation sont positifs (la réponse mesurée au centre du domaine est statistiquement égale à la réponse calculée au même point), l'étude s'achève le plus souvent, mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré (Goupy et Creighton, 2006).

Les essais supplémentaires sont représentés par des points d'expériences situés sur les axes de coordonnées et par de nouveaux points centraux. Les points situés sur les axes de coordonnées sont appelés les *points en étoile*. Les plans composites présentent donc trois parties (Figure 16) :

Le nombre total n d'essais à réaliser est la somme des essais du plan factoriel (nf), des essais du plan en étoile (na) et des essais au centre ($n0$). Le nombre n des essais d'un plan composite est donné par la relation :

$$n = nf + na + n0$$

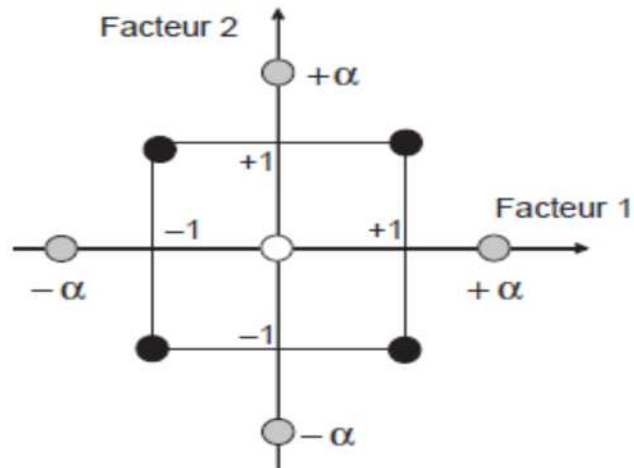


Figure 16: Plan composite pour l'étude de deux facteurs. Les points factoriels sont en noirs, les points en étoile sont en gris clair, les points centraux sont en blanc.

Le nombre de niveaux est 5 pour chacun des facteurs et seulement 3 lorsque l'on a un plan composite à faces centrées (**Goupy et Creighton, 2006**).



*Etude
Expérimentale*



*Matériel et
Méthodes*

I. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal comprend la partie aérienne (tiges et feuilles) de l'espèce *Cytisus villosus* récoltée de la région El-Millia, Wilaya de Jijel au mois de février 2016 au stade pleine floraison. La partie aérienne est nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante, stockée à l'abri de la lumière puis broyée à l'aide d'un mixeur pour avoir une poudre à partir de laquelle les extraits ont été réalisés.

1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont: les bactéries à Gram⁻ (*Escherichia coli* ATCC 25922) et les bactéries à Gram⁺ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et sont conservées à 4°C dans des tubes à essais contenant le milieu solide incliné GN jusqu'à l'utilisation.

II. Méthodes

II.1. Extraction

Les extraits méthanoïques ont été préparés selon la technique décrite par **Isbilir et al., (2012)** avec quelques modifications ; une prise d'essai de 1g de poudre est mise à macérer dans un volume différent de méthanol (10, 15, 20 ml) avec différentes concentrations de méthanol (70%, 85%, 100%) puis incubé dans l'étuve pendant (30, 75, 120 min) à température variée (20, 30, 40 °C) selon 26 expériences. L'extrait a ensuite été centrifugé, après filtré sur un papier filtre N°1 et conservé dans le réfrigérateur 4°C, à l'abri de la lumière.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

- **Dilution :** Un volume de 200 µl pour chaque extrait avec 800 µl de méthanol à différentes concentrations (70%, 85%, 100%).

- **Dosage :**

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait qui est dilué est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante

pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions, sauf l'extrait changé par l'eau distillé.

L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

II.3 Tests de l'activité antibactérienne

➤ Inoculum

Les bactéries à tester sontensemencées sur des boites de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boites, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 9ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (ce qui correspond à environ 108 UFC/ml) (**Mohammedi, 2006**). L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum

➤ Ensemencement

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne, puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface, de haut en bas sur un milieu MH., en stries serrées. L'opération est répétée trois fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et en le passant sur la périphérie de la gélose.

➤ Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N°1, avec un diamètre de 6mm. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

➤ Application des disques d'antibiotiques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier

Wattman №1 (4 disques/boîte) sont déposés sur un milieu Muller Hinton. Précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis posé 20µl de chaque extrait sur les disques par une micropipette.

➤ **Incubation**

Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

➤ **Expression des résultats**

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide règle (y compris le diamètre de disque de 6mm). La sensibilité des différentes souches vis-à-vis de différents extraits étudiés est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères suivants:

- **Non sensible (-)** ou résistante : diamètre < 8 mm.
- **Sensible (+)** : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- **Extrêmement sensible (+++)** diamètre > 20 mm (**Ponce *et al.* 2003**).



Figure 17: Aromatoگرامme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné de l'extrait végétale.

II.4. 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 2,5 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après

incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique (16mg avec 10ml d'éthanol et diluée 10 fois) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

Où :

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Ac : absorbance du contrôle

At : absorbance du test effectué

Calcul des IC50 : L' IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH• . Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

II.5. Optimisation de l'extraction par plan d'expérience

Dans notre étude le plan centrale composite (CCD) à été utilisé pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols de *Cytisus villosus* en utilisant quatre réponses, à savoir : le taux des polyphénols totaux (**Réponse Y1**). L'activité Anti-*Staphylococcus aureus* (**Réponse Y2**). L'activité Anti-*Escherichia coli* (**Réponse Y3**). L'activité Antioxydante en utilisant le DPPH (**Réponse Y2**).

Après l'identification des facteurs qui affectent la production d'acide lactique, le plan central (CCD) composite est appliqué afin d'optimiser les principales variables. Ces facteurs sont représentés en trois niveaux codés par -1, 0 et +1 pour le minimum, moyenne et le maximum respectivement.

Le Tableau V : regroupe les facteurs utilisés ainsi que leurs niveaux.

Variables	Code du variable	-1	0	1+
Température (°C)	X ₁	20	30	40
Temps (min)	X ₂	30	75	120
Rapport m/V (g/ml)	X ₃	10	15	30
Concentration du Me-OH (°)	X ₄	70	85	100

Pour les quatre réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir la Température (X₁), temps de macération (X₂), le rapport matière végétale/volume du solvant (X₃), et la concentration du solvant (X₄). La construction de la matrice des expériences nous a donné 26 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 (PPT, Activité anti-*Staphylococcus aureus*, activité anti-E.coli, et l'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 ;

β_0 : 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 R^2 qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés par et les courbes de la surface de réponse (3D). Cette analyse est réalisée par le logiciel JMP 7 Discovery.



*Résultats et
Discussion*

III. Résultats de l'optimisation par plan d'expérience

L'optimisation par plans d'expérience est moins coûteuse et consomme moins du 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 centrale composite (CCD) a été utilisé pour l'optimisation de :

- Rendement d'extraction des polyphénols totaux (Réponse Y_1).
- L'activité Anti-*Staphylococcus aureus* (Réponse Y_2).
- L'activité Anti-*Escherichia coli* (Réponse Y_3).
- L'activité Antioxydante en utilisant le DPPH (Réponse Y_4).

Pour les quatre réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir la Température (X_1), temps de macération (X_2), le rapport matière végétale/volume du solvant (X_3), et la concentration du solvant (X_4). La construction de la matrice des expériences nous a donné 26 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 v7.0.1 (USA).

III. 1. Résultats de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu, le montre les conditions expérimentales, les résultats trouvés ainsi que les valeurs prévues (en mg Eq Ac. Gallique/g matières végétales) sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI: Matrice d'expérience pour les polyphénols totaux.

Essai	Variables indépendants				Taux des polyphénols	
	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (ml)	X_4 (°)	Mesuré	Prévu
1	20	120	10	70	2,3	1,379246
2	40	30	20	70	41,2	43,5068651
3	40	120	10	100	49	37,8763095
4	40	120	20	100	92	88,9735317
5	40	120	20	70	25,2	21,2318651
6	30	75	15	70	69,3	60,3895238
7	20	120	20	100	112,3	101,259643

8	20	30	10	70	33,7	32,895754
9	40	30	10	100	60	48,5513095
10	20	120	10	100	57	50,8624206
11	20	120	20	70	5,4	-0,9820238
12	30	120	15	85	93,4	92,0728571
13	30	75	10	85	120,2	107,811746
14	20	75	15	85	120,1	36,7784127
15	20	30	20	100	133,2	123,834643
16	30	75	20	85	145,6	133,533968
17	20	30	10	100	81	73,4874206
18	40	75	15	85	100,5	35,4173016
19	20	30	20	70	30,2	33,2429762
20	40	30	10	70	49	42,4596429
21	40	120	10	70	19,8	20,1346429
22	30	75	15	85	100,3	98,8564286
23	30	75	15	100	90	114,55619
24	40	30	20	100	96	99,5985317
25	30	30	15	85	109,8	114,522857
26	30	75	15	85	98,1	98,8564286

En analysant les résultats du tableau VI, il ressort que les taux des polyphénols obtenues variées de 2,3 à 145,6 mg Eq Ac. Gallique/g. La plus faible concentration a été observée avec les valeurs 20°C, 120min, 10 ml et 70° pour les variables **X₁**, **X₂**, **X₃**, et **X₄** successivement. D'autre part, la valeur de 145,6 mg Eq Ac. Gallique/g a été obtenue avec une macération à température de 30°C et un temps de 75min, et en utilisant 20 ml du solvant à 85°. Les valeurs mesurées sont très proches de valeurs prévues ce qui nous indique sur le bon fonctionnement du model.

III. 1.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

L'analyse du model par le test ANOVA été très hautement significatif ($p < 0.001$). D'une autre part la valeur du coefficient de détermination (R^2) été de l'ordre de 0,96 montrant la bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression. Autrement dit le modèle de réponse a pu expliquer 96% des variations totales, et par conséquent, il reste 04% des variations qui ne sont pas expliqués par ce modèle. Mes résultats de l'analyse de variance et de la régression sont résumé dans le tableau VII.

Tableau VII : L'analyse de la variance pour le taux PPT.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	38989,353	2784,95	18,5528
Résidus	11	1651,206	150,11	Prob. > F
Total	25	40640,558		<,0001

III.1.2. L'analyse du manque d'ajustement

Le manque d'ajustement est un paramètre très important pour la validité du modèle. Un manque d'ajustement significatif montre que le modèle est non ajusté au phénomène étudié, dans ce cas le changement du modèle et la réalisation d'une nouvelle optimisation est nécessaire. Le tableau VIII montre les résultats du manque d'ajustement du modèle CCD pour l'optimisation des polyphénols totaux.

Tableau VIII: L'analyse de la variance pour le taux des PPT.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	10	1648,7855	164,879	68,1316
Erreur pure	1	2,4200	2,420	Prob. > F
Erreur totale	11	1651,2055		0,0940

Selon le tableau il ressort que le manque d'ajustement est non significatif avec $p > 0.05$ ce qui confirme les résultats de l'analyse de la variance et le modèle est bien ajusté à nos expériences.

III.1.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs

Cette analyse est réalisée en utilisant le test ANOVA pour les facteurs linéaires, de synergie et quadratiques. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le tableau IX.

Tableau IX : Analyse de régression des résultats obtenus pour le taux des PPT.

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	115,51857	4,856815	23,78	<,0001
Température(20,40)	-2,361111	2,887806	-0,82	0,4309
Temps(30,120)	-9,872222	2,887806	-3,42	0,0057
Rapport m/V(10,20)	11,616667	2,887806	4,02	0,0020
Méthanol %(70,100)	27,466667	2,887806	9,51	<,0001
Température*Temps	2,55625	3,062981	0,83	0,4217
Température*Rapport m/V	-1,90625	3,062981	-0,62	0,5464
Temps*Rapport m/V	1,86875	3,062981	0,61	0,5542
Température*Méthanol %	-9,38125	3,062981	-3,06	0,0108

Variable	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Temps*Méthanol %	2,59375	3,062981	0,85	0,4151
Rapport m/V*Méthanol %	11,83125	3,062981	3,86	0,0026
Température*Température	-10,6581	7,655993	-1,39	0,1914
Temps*Temps	-19,3581	7,655993	-2,53	0,0280
Rapport m/V*Rapport m/V	11,941905	7,655993	1,56	0,1471
Méthanol %*Méthanol %	-41,3081	7,655993	-5,40	0,0002

Les résultats du tableau IX montrent que les facteurs linéaires (Temps, Rapport m/V, et la concentration du méthanol) ont une influence hautement significative ($p < 0.01$) sur le rendement d'extraction des polyphénols.

De même pour les facteurs de synergie (Température*Concentration du méthanol, et Rapport m/V* Concentration du méthanol), et les facteurs quadratiques (Temps*Temps, et Concentration du méthanol* Concentration du méthanol). D'une autre part on observe que la température n'aucune influence significative sur le rendement d'extraction des polyphénols ($p < 0.05$).

III.1. 4. L'optimisation par surface de réponse du rendement d'extraction des PPT

Le modèle de régression développé peut être représenté par les surfaces de réponse et le contour plot pour comprendre l'interaction des quatre variables et pour déterminer le niveau optimal de chaque variable pour optimiser la réponse. Les surfaces de réponse montrent l'interaction de deux variables indépendantes quand une autre variable est fixée à zéro. Les figures 18 représentent les surfaces de réponse établies pour la concentration des PPT.

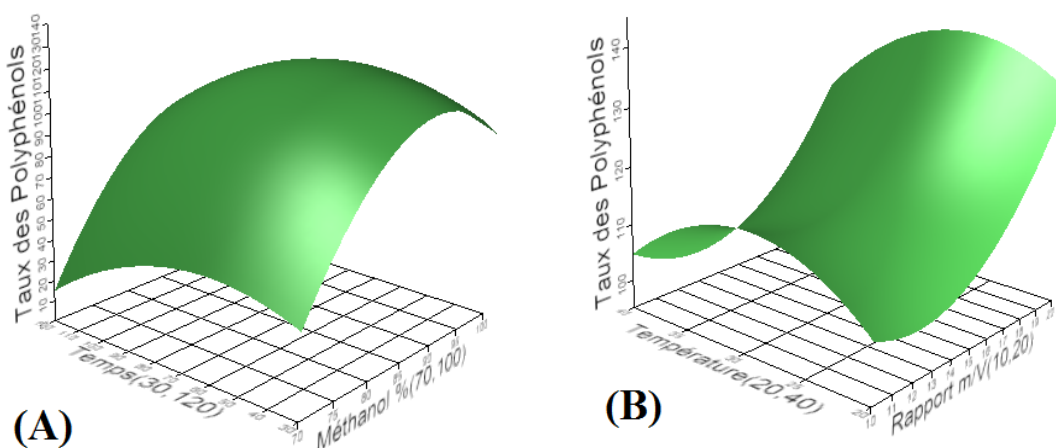


Figure 18 : Surface de réponse de l'influence des différents facteurs sur le rendement de l'extraction des polyphénols. **(A):** Influence du temps de macération avec la concentration du méthanol, **(B) :** Influence de la température de macération et le volume du solvant.

Selon la figure 18 (A°) on observe l'augmentation du taux des polyphénols en augmentant la concentration du méthanol et le temps d'extraction jusqu'à un maximum avec

83° du méthanol et un temps de 70min. de même pour la température et le rapport m/V avec un maximum à 30°C et 20 ml du solvant. Une équation de second ordre a été utilisée pour corrélérer les variables du processus avec les réponses. Les coefficients du second ordre polynomiaux ont été déterminés en utilisant la régression multiple.

$$Y_1 = 115,51 - 2,36X_1 - 9,87 X_2 + 11,66X_3 + 27,46X_4 + 2,5X_1X_2 - 1,9X_2X_3 + 1,8X_2X_3 - 9,38X_1X_4 + 2,59X_2X_4 + 11,83X_3X_4 - 10,65X_1^2 - 19,35 X_2^2 + 11,94 X_3^3 - 41,30 X_4^2.$$

Les valeurs optimales des différents facteurs ont été obtenues après la résolution de l'équation. Les conditions optimales de l'extraction des polyphénols estimées par l'équation du modèle sont groupées dans le tableau X.

Tableau X: Conditions optimales de l'extraction des PPT.

Variable	Valeur critique
Température(20,40)	27,958467
Temps(30,120)	62,377992
Rapport m/V(10,20)	11,953416
Méthanol %(70,100)	88,893677

Valeur prévue de la solution : 117,16 mg Eq Ac. Gallique/g.

III. 1. 5. Validation du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. La concentration des polyphénols obtenue sous ces conditions est de 110 mg Eq Ac. Gallique/g, c'est approximativement 94% de la valeur prévue. Ces résultats obtenus confirment la validité du modèle de CCD et montrent aussi que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

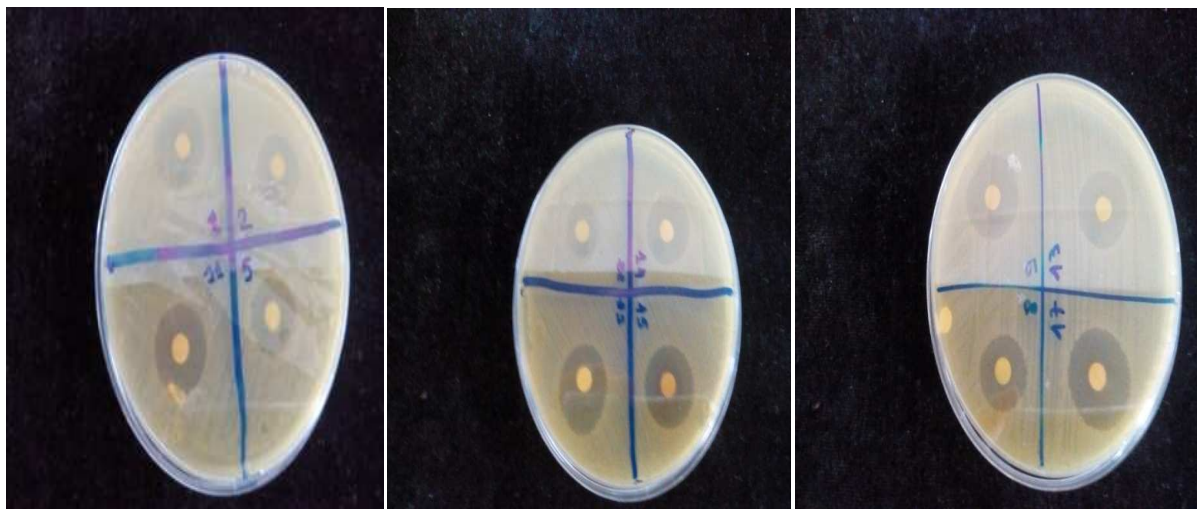
III. 2. Résultats de l'optimisation de l'activité *Anti-Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne vis-à-vis totale *Staphylococcus aureus* a été testée pour chaque extrait par la méthode de diffusion sur disque. Les diamètres de zones d'inhibition trouvés et prévus sont résumés dans le tableau XI.

Tableau XI: Résultats de l'activité Anti-*Staphylococcus aureus*.

Essai	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		Essai	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	
	Mesuré	Prévu		Mesuré	Prévu
1	19	17,69	14	17	18,03
2	17	15,94	15	13	12,55
3	17	16,85	16	14	14,14
4	15	14,05	17	20	19,35
5	21	21,91	18	19	17,81
6	20	18,47	19	17	17,41
7	15	14,02	20	18	19,24
8	19	19,71	21	20	20,21
9	18	17,38	22	17	16,72
10	15	15,82	23	13	14,36
11	20	20,38	24	8	9,57
12	17	18,03	25	18	16,81
13	17	16,70	26	16	16,72

Selon les résultats du tableau XI, il apparaît les diamètres de zones d'inhibition mesurées sont proches à la valeur prévues par le model. La variance des valeurs autour de la moyenne est petite avec un écart type de 2,84 mm. L'activité la plus forte a été observée pour la combinaison d'une température de 40°C avec un temps de 120min, et en utilisant 10 ml du méthanol à 70°.

Figure 19 : Zones d'inhibition d'extrait appartenant à la plante *Cytisus villosus*

III. 2.1. L'analyse du model par ANOVXA et régression linéaire

L'analyse de variance nous renseigne sur la signification des variations des valeurs de zone d'inhibition en modifiant les différents facteurs d'extraction. Les résultats sont montrés dans le tableau XII.

Tableau XII : analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	179,83266	12,8452	6,4187
Résidus	11	22,01349	2,0012	Prob. > F
Total	25	201,84615		0,0019

Comme montré dans le tableau, le test d'ANOVA est hautement significatif ($p < 0.01$), ce qui signifie le changement des diamètres de zone d'inhibition selon la matrice des expériences. La régression linéaire nous a donné une idée sur la bonne corrélation des valeurs observé avec la valeur prévues avec $R^2 = 0.89$.

III.2.2. L'analyse du manque d'ajustement

Les résultats du manque d'ajustement du model CCD pour l'optimisation de l'activité Anti-*Staphylococcus aureus* sont montré dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Manque d'ajustement du model CCD sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	10	21,513492	2,15135	4,3027
Erreur pure	1	0,500000	0,50000	Prob. > F
Erreur totale	11	22,013492		0,3599

D'après le tableau, le model CCD est ajusté à l'activité anti- *Staphylococcus aureus*, avec $p > 0.05$.

III.2.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs

L'analyse de l'influence des variables indépendants donne une idée sur les facteurs significatifs et non significatifs, et donc de connaître les variables à changer pour modifier la réponse tableau XIV.

Pour l'activité anti staphylococcique, que la concentration et le volume du méthanol utilisé pour la macération ont un effet significatif sur l'extraction ($p < 0.05$). L'influence de la

température et le temps de macération est non significative. D'une autre part les Temps*Rapport m/V et Rapport m/V*Méthanol % on un effet significatif Tableau XIV.

Tableau XIV : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité anti *Staphylococcus aureus*.

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	16,72	0,56	29,83	<,0001
Température(20,40)	-0,11	0,33	-0,33	0,7452
Temps(30,120)	0,611	0,33	1,83	0,0940
Rapport m/V(10,20)	-1,27	0,33	-3,83	0,0028
Méthanol %(70,100)	-2,05	0,33	-6,16	<,0001
Température*Temps	0,75	0,35	2,12	0,0575
Température*Rapport m/V	-0,25	0,35	-0,71	0,4943
Temps*Rapport m/V	1,25	0,35	3,53	0,0047
Température*Méthanol %	-0,37	0,35	-1,06	0,3117
Temps*Méthanol %	-0,37	0,35	-1,06	0,3117
Rapport m/V*Méthanol %	-1,12	0,35	-3,18	0,0087
Température*Température	1,19	0,88	1,35	0,2035
Temps*Temps	0,69	0,88	0,79	0,4482
Rapport m/V*Rapport m/V	-1,30	0,88	-1,48	0,1680
Méthanol %*Méthanol %	-0,30	0,88	-0,34	0,7368

III.2. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Anti-*Staphylococcus aureus*

La représentation des variation des diamètres de zones d'inhibition en fonction du changement des paramètres de l'extraction en surfaces de réponse nous permet de déceler les valeurs optimale pour chaque variable et donc valider le model figure 20.

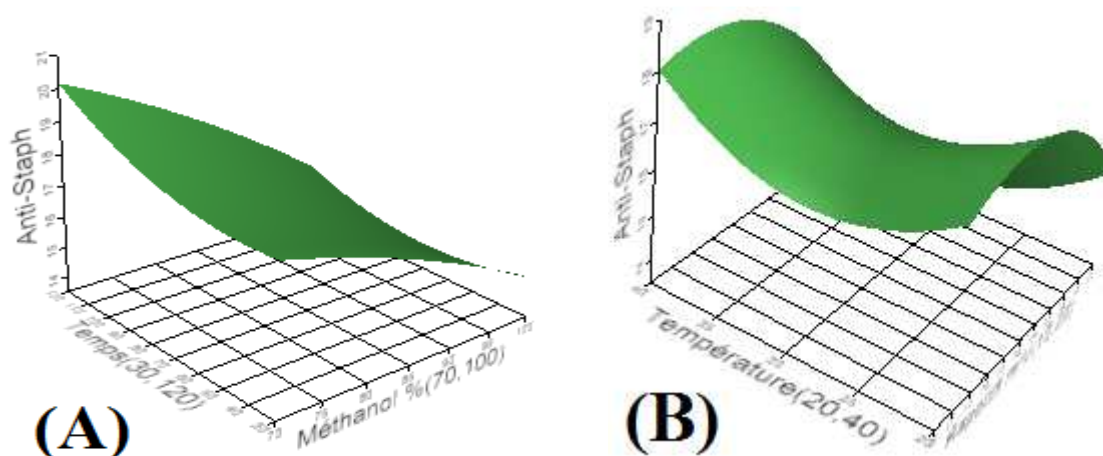


Figure 20 : Surface de réponse La variation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus* en fonction des conditions d'extraction. (A): temps de macération avec la concentration du méthanol, (B) : la température de macération et le volume du solvant.

La figure 20 (A) montre que les diamètres des zones d'inhibition est corrélé négativement avec le temps d'extraction et la concentration du méthanol. Dans l'autre main l'activité anti bactérienne s'évolue progressivement avec l'augmentation volume du solvant jusqu'au atteint le maximum avec un rapport de 1/15(m/V). Une équation de corrélation entre les variables et les réponses s'écrit :

$$Y_1 = 16,72 - 0,11X_1 + 0,611X_2 - 1,27X_3 - 2,05X_4 + 0,75X_1X_2 - 0,25X_2X_3 + 1,25X_2X_3 - 0,37X_1X_4 - 0,37X_2X_4 - 1,12X_3X_4 + 1,19X_1^2 + 0,69X_2^2 - 1,30X_3^3 - 0,30X_4^2.$$

Les valeurs optimales des différents facteurs obtenues par la résolution de l'équation sont montrées dans le tableau XV.

Tableau XV: Conditions optimales de l'extraction des PPT à activité anti-*Staphylococcus aureus*.

Variable	Valeur critique
Température(20,40)	30,22
Temps(30,120)	17,55
Rapport m/V(10,20)	15,44
Méthanol %(70,100)	43,54

Valeur prévue à la solution : 19,12mm.

III.2.5. Validation du modèle

Après avoir extraire les polyphénols totaux en appliquant les conditions optimiser par le model CCD. Un test de l'activité antibactérienne été réalisé. Le diamètre de zone d'inhibition été de 20mm, cette valeur est très proche de la valeur prévue par le logiciel. Ce qui indique le bonne fonctionnement du model.

III. 3. Résultats de l'optimisation de l'activité Anti-*E.coli*

E.coli a été choisie comme souche de test pour optimiser l'extraction des polyphénols à activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XVI .

Tableau XVI: Résultats de l'activité Anti-*E.coli*

Essai	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		Essai	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	
	Mesuré	Prévu		Mesuré	Prévu
1	0	0	14	5	3,97
2	0	0	15	14	13,10
3	11	9,01	16	13	11,52
4	8	8,54	17	11	10,57
5	0	0,01	18	0	2,30
6	0	0,74	19	0	1,57
7	10	10,96	20	0	0
8	0	0	21	0	0,98
9	7	7,15	22	11	8,08
10	9	9,93	23	10	10,52
11	0	0	24	8	8,18
12	10	9,19	25	7	9,08
13	8	10,74	26	9	8,08

Les résultats du tableau XVI, montre une corrélation élevée entre les valeurs des zones d'inhibition mesurées et les valeurs prévues par le model. L'écart entre les valeurs observées et les valeurs prévues ne dépasse pas 2mm. La plus grande zone d'inhibition a été trouvée par la macération d'un gramme de matière végétale dans 20ml du méthanol 100° à température 20°C pendant 30minutes

Figure 21 : zones d'inhibition d'extrait appartenant à la plante *Cytisus villosus*

III. 3.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

En analysant nos résultats par ANOVA et par la régression entre les valeurs trouvées et prévue. On a pu montrer que la variation des diamètres des zones d'inhibition d'*E.coli* est significativement corrélée avec le changement des combinaisons entre les niveaux des différents variables indépendantes avec ($p < 0.001$) tableau XVII.

Tableau XVII: Analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition d'*E.coli*

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	583,10037	41,6500	10,1951
Résidus	11	44,93810	4,0853	Prob. > F
Total	25	628,03846		0,0002

La régression a montré une haute corrélation des valeurs observées avec les valeurs prévues ($R^2=0.93$), ce qui indique que 93% des valeurs des diamètres de zones d'inhibition peut être prévues par le model.

III.3.2. L'analyse du manque d'ajustement

Le manque d'ajustement du model a été analyse en comparant l'erreur totale et l'erreur pure, le manque d'ajustement et le résultat de la soustraction de l'erreur pure de l'erreur total. Les résultats sont résumés dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII: Manque d'ajustement du model sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de *E.coli*.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	10	42,938095	4,29381	2,1469
Erreur pure	1	2,000000	2,00000	Prob. > F
Erreur totale	11	44,938095		0,4896

Le teste de manque d'ajustement est no significatif indique le bon ajustement du model à l'activité antimicrobienne ($P=0,48$).

III.3.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs

Les résultats de l'analyse de l'interaction des facteurs et leur effet sur l'extraction des polyphénols à activité anti-*E.coli* sont montrés dans le tableau XIX

Tableau XIX : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité anti *E.coli*

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	8,0857143	0,801232	10,09	<,0001
Température(20,40)	-0,833333	0,476403	-1,75	0,1081

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Temps(30,120)	0,0555556	0,476403	0,12	0,9093
Rapport m/V(10,20)	0,3888889	0,476403	0,82	0,4317
Méthanol %(70,100)	4,8888889	0,476403	10,26	<,0001
Température*Temps	0,625	0,505302	1,24	0,2419
Température*Rapport m/V	-0,375	0,505302	-0,74	0,4736
Temps*Rapport m/V	-0,375	0,505302	-0,74	0,4736
Température*Méthanol %	-0,625	0,505302	-1,24	0,2419
Temps*Méthanol %	-0,125	0,505302	-0,25	0,8092
Rapport m/V*Méthanol %	0,125	0,505302	0,25	0,8092
Température*Température	-4,947619	1,263014	-3,92	0,0024
Temps*Temps	1,052381	1,263014	0,83	0,4224
Rapport m/V*Rapport m/V	3,052381	1,263014	2,42	0,0342
Méthanol %*Méthanol %	-2,447619	1,263014	-1,94	0,0787

Il est clair du tableau XIX Que l'activité anti *E.coli*, que la concentration est influencée significativement que par la concentration du méthanol pour les variables linéaires ($p < 0,001$), et par deux variable quadratique à savoir température*température et Rapport m/V *Rapport .

III.3. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Anti-*E .coli*

La surface de réponse activité anti *E.coli* en fonction des variable indépendantes est un espace tétra dimensionnel, la représentation des l'interactions entre les facteurs et leur influence sur la réponse se fait deux par deux dans un espace tridimensionnel (figure 22).

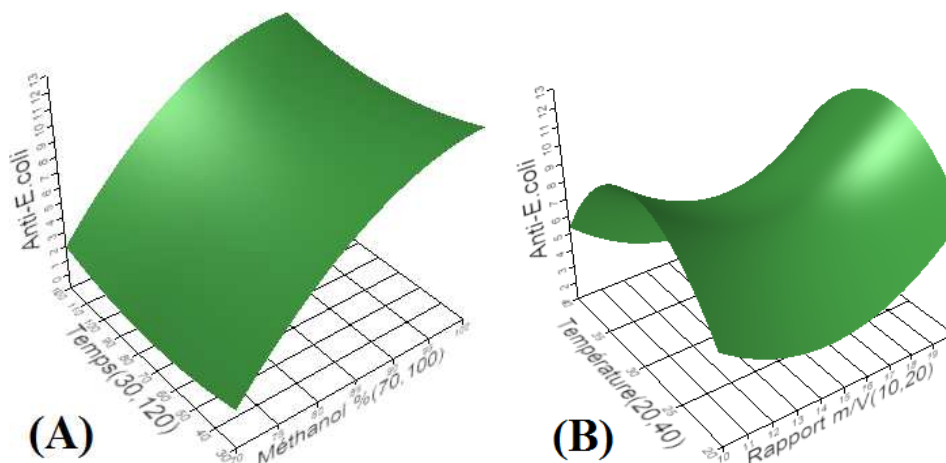


Figure 22: Surface de réponse La variation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis *E.coli* en fonction des conditions d'extraction. (A): temps de macération avec la concentration du méthanol, (B) : la température de macération et le volume du solvant.

Selon la figure 22 (A) on observe une hausse des diamètres des zones d'inhibition avec l'augmentation de la concentration du méthanol tandis que l'augmentation du temps n'a aucune

influence sur l'extraction. D'une autre l'activité anti bactérienne augmente avec la température (corrélation positive) jusqu'à un maximum à température 30°C. La transformation des surfaces de réponse en chiffre nous a donné équation suivante :

$$Y_1 = 8,08 - 0,83X_1 + 0,05X_2 + 0,38X_3 + 4,88X_4 + 0,62X_1X_2 - 0,37X_2X_3 - 0,37X_2X_3 - 0,62X_1X_4 - 0,12X_2X_4 + 0,12X_3X_4 - 4,94X_1^2 + 1,05X_2^2 + 3,05X_3^3 - 2,44X_4^2.$$

La résolution de l'équation a donné la solution montrée dans le tableau XX.

Tableau XX: Conditions optimales de l'extraction des PPT à activité anti-*E.coli*.

Variable	Valeur critique
Température(20,40)	28,58
Temps(30,120)	77,68
Rapport m/V(10,20)	14,55
Méthanol %(70,100)	100

Valeur prévue à la solution : 10,60mm

III.3.5. Validation du modèle

L'application d'une extraction en respectant les niveaux des variables donnés par le model. Nous a permit d'avoir un extrait avec une zone d'inhibition de 12mm. Cette valeur est supérieure à de la valeur prévue par le logiciel mais reste dans l'intervalle de l'écart entre les valeurs prévues et observé, donc le model est validé et l'équation est satisfaisante.

III. 4. Résultats de l'optimisation de l'activité Antioxydante

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

Tableau XXI: Résultats de l'activité Antioxydant

Essai	Activité anti radicalaire (%)		Essai	Activité anti radicalaire (%)	
	Mesuré	Prévu		Mesuré	Prévu
1	83,24	81,95	14	83,51	86,75
2	86,17	85,86	15	82,24	80,76
3	80,31	80,62	16	91,22	91,90
4	84,04	84,66	17	72,07	74,03
5	86,96	85,27	18	88,82	87,82
6	85,37	86,75	19	86,96	86,93
7	80,31	79,88	20	81,38	82,08
8	81,64	80,67	21	80,58	81,71
9	84,3	82,93	22	89,09	88,10
10	73,4	73,36	23	84,3	83,12
11	86,96	87,98	24	85,63	87,19
12	85,37	85,69	25	86,43	86,32
13	87,23	86,75	26	87,76	88,10

D'après tableau XXI, on observe que les résultats trouvés sont proche des résultats prévus ce qui indique une bonne corrélation entre eux du au bon fonctionnement du model. Les résultats de l'activité antioxydante sont compris entre 73,36 et 91,90%. Dont la meilleure activité a été enregistrée avec les niveaux 30 °C, 75 min, 20 ml, et 85° pour les variables température, temps, volume et concentration du solvant, successivement.

III. 4.1. L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire

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

Tableau XXII : Analyse de la variance pour les diamètres de zone d'inhibition d'*E.coli*

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	14	452,19346	32,2995	13,1417
Résidus	11	27,03564	2,4578	Prob. > F
Total	25	479,22910		<,0001

La valeur du R^2 été à l'ordre de 0,94, ce qui reflète une corrélation forte entre les valeurs prévues et les valeurs observées. Donc notre model peut expliquer et prédire 94% de nos résultats.

III.4.2. L'analyse du manque d'ajustement

Les résultats d'analyse du manque d'ajustement sont résumés dans le **Tableau XXIII**.

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

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	10	26,151189	2,61512	2,9568
Erreur pure	1	0,884450	0,88445	Prob. > F
Erreur totale	11	27,035639		0,4263

Les résultats du manque d'ajustement ont été non significatifs ($P=0,42$), en accord avec les résultats de l'analyse par ANOVA ce qui confirme le bon ajustement du model à nos résultats.

III.4.3. L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs

Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et l'influence de cette dernières sur l'activité antioxydante sont représentés dans le tableau XXIV

Tableau XXIV : Analyse de régression des résultats obtenus L'activité antioxydante.

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	88,102286	0,621469	141,76	<,0001
Température(20,40)	1,5477778	0,369518	4,19	0,0015
Temps(30,120)	-0,313889	0,369518	-0,85	0,4137
Rapport m/V(10,20)	2,5744444	0,369518	6,97	<,0001
Méthanol %(70,100)	-1,814444	0,369518	-4,91	0,0005
Température*Temps	-0,411875	0,391933	-1,05	0,3159
Température*Rapport m/V	-0,618125	0,391933	-1,58	0,1431
Temps*Rapport m/V	-0,054375	0,391933	-0,14	0,8922
Température*Méthanol %	1,873125	0,391933	4,78	0,0006
Temps*Méthanol %	-0,485625	0,391933	-1,24	0,2411
Rapport m/V*Méthanol %	0,120625	0,391933	0,31	0,7640
Température*Température	-1,829714	0,979646	-1,87	0,0887
Temps*Temps	-2,094714	0,979646	-2,14	0,0558
Rapport m/V*Rapport m/V	1,2302857	0,979646	1,26	0,2352
Méthanol %*Méthanol %	-3,159714	0,979646	-3,23	0,0081

Selon le tableau XXIV, On observe un effet hautement significatif des variable linéaires : Température, Rapport m/V, et la concentration du Méthanol on une influence hautement significative sur l'activité antioxydante ($p < 0,01$). De plus cette dernière est influencée significativement par une variable de synergie (Température*Méthanol), et une variable quadratique (Méthanol %*Méthanol %).

I.4. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité Antioxydante

L'interaction entre le différent facteur étudié est représentée sous forme des surfaces de réponse dans la figure 23.

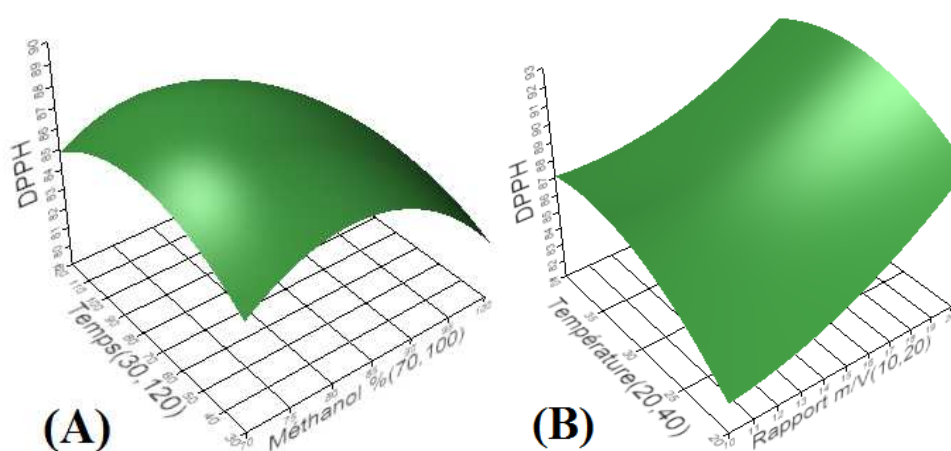


Figure 23 : Surface de réponse La variation de l'activité oxydante vis-à-vis en fonction des conditions d'extraction. (A): temps de macération avec la concentration du méthanol, (B) : la température de macération et le volume du solvant.

Selon la figure 23 (A) on observe l'activité antioxydante s'augmente avec le temps et la concentration du méthanol jusque un maximum à 80min et 85° de méthanol. D'une autre part l'activité antioxydante ayant une corrélation positive avec le volume du solvant et une autre négative avec la température. L'équation du second degré du model quadratique polynomial, résume les différents effets des variables indépendantes sur l'activité antioxydante :

$$Y_1 = 88,10 + 1,54X_1 - 0,31X_2 + 2,57X_3 - 1,81X_4 - 0,41X_1X_2 - 0,61X_2X_3 - 0,05X_2X_4 + 1,87X_1X_4 - 0,48X_2X_4 + 0,12X_3X_4 - 1,829X_1^2 - 2,09X_2^2 + 1,23X_3^3 - 3,15X_4^2.$$

Après résolution de l'équation on obtenues valeurs optimale pour chaque variable indépendante tableau XXV.

Tableau XXV: Conditions optimales de l'extraction des PPT à activité antioxydante

Variable	Valeur critique
Température(20,40)	35,13
Temps(30,120)	70,64
Rapport m/V(10,20)	10,43
Méthanol %(70,100)	82,82

Valeur prévue à la solution : 87,47%

III.2.5. Validation du modèle

Pour valider le modèle, une extraction des polyphénols a été réalisée en utilisant les valeurs obtenues par la résolution de l'équation. Après le test de l'activité antioxydante on obtient une valeur proche de celle prévue par le modèle, à savoir 87,01%. Ce qui confirme le bon ajustement du modèle et la reproductibilité de l'optimisation.

IV. Discussion des résultats de l'optimisation par plan d'expérience

Dans notre étude on a optimisé l'extraction des polyphénols à activité antimicrobienne et antioxydante en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Le plan central composite (CCD) a été utilisé pour l'analyse de l'influence et les interactions entre les variables indépendantes. Les valeurs optimales des conditions d'extraction ont été déterminées en utilisant la régression linéaire via l'établissement d'une équation polynomiale de second degré.

Les résultats de l'analyse de la variance du modèle ont été hautement significatifs pour les quatre réponses ($p < 0.01$), et les valeurs de coefficient de rétention ont été proches de 1. Pour chaque paramètre du modèle, un coefficient de corrélation élevé et des p-valeurs petites, indiquent un effet hautement significatif sur les variables de la réponse (**Quanhong et Caili, 2005**). Les valeurs de R^2 pour toutes les réponses indiquent une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et ceux prédits par le modèle (**Milutinovic, 2015**).

Les résultats de manque d'ajustement confirment l'analyse par ANOVA et la régression linéaire, indiquant le bon ajustement du modèle avec toutes les réponses. En effet la vérification que le modèle montre un bon ajustement avec les résultats expérimentaux est nécessaire pour éviter les résultats non fiables ou trompeurs.

L'analyse de l'influence et les interactions entre variables indépendantes, a montré que seule la température n'a pas un effet significatif sur l'extraction des polyphénols. En effet les variables de synergie dépendantes de la température (T^* Méthanol%, et T^* Temps), ayant un effet hautement significatif.

Selon (**Daneshvar et al.,2012**) il est impérative de connaitre que même avec $p > 0,05$ avec les variables linéaires, et à cause des loi hiérarchiques, dans les quelles $p < 0,05$ pour les variable d'ordre plus grand. Pour ce la l'effet des variable linéaire doit être considéré dans le model.

D'une autre part, l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* est influencée par les Rapport m/V et la concentration du méthanol. Pour l'activé anti-E.coli, la concentration du solvant été le seul facteur à effet significatif. En général l'augmentation du volume du solvant minimise la saturation du solvant par d'autres composés permettant la solubilisation de plus de polyphénols (**Radojkovic et al., 2012**)

Plusieurs étude ont été réalisées sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols en pérennant l'activité antioxydante comme réponse. Dans l'autre main, aucune étude n'a considéré l'utilisation de l'activité antibactérienne comme réponse.

Dans notre étude les résultats montrent que la concentration du méthanol ayant un effet négatif sur l'activité anti-staphylococcique. Il est montré que l'amélioration de l'extraction des polyphénols est réalisée en ajoutant de l'eau dans le solvant d'extraction (**Rostango et al ., 2004**). Contrairement, les meilleurs résultats de l'activité anti-E.coli ont été trouvés avec les moindres concentrations de l'eau, ceci peut être explique per le fait que les molécules apolaire s diffusent plus facilement à travers la paroi des Gram négative qui est constituée de deux membranes phospholipidiques.

En fin l'activité antioxydante a été mesurée en utilisant le radical DPPH, les résultats ont été influencés significativement par la température le rapport m/V et la concentration du méthanol.

Les propriété antioxydante d'une plant sont associées avec le pouvoir donneur d'hydrogene des composés phénolique à un radical (**Kraujalis et al., 2015**) .

Le pouvoir de réduction du DPPH est attribué a ces propriété donatrices des hydrogènes (**Liu et al., 2013**) , et cette méthode souvent utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des composés naturels (**She et al.,2010**).

L'augmentation de taux des polyphénols et de l'activité antioxydante avec la température due à l'augmentation du pouvoir solvant du méthanol à haute température (**Kamali et al.,2010**).Les différences dans l'activité antimicrobienne peut être attribuer à la différences dans le taux des polyphénols et les flavonoïdes (**Singh et al.,2007**)

La température et le paramètre majeur influençant les propriétés physicochimiques du méthanol et les composés à extraire. Et elle a une grande influence sur le taux, l'efficacité et la sélectivité (**Kraujalis et al., 2015**).

L'extraction des polyphénols à partir d'une matière naturelle en utilisant les solvant est une étape importante pour caractérisés les systèmes naturels riche en polyphénols (**Mutlib et Abbott, 1992**). La solubilité des polyphénols est très influencée par sont structures chimique, qui peut être variée de petite molécule contenant différents groupements fonctionnels à des grosses molécules (tannins). (**Naczk et Shahidi, 2006 ; Jung et al., 2000**). De plus, les polyphénols peuvent interférent avec d'autres substances comme les protéines et les sucres (**Hagerman et Butler, 1978 ; Kang et al., 2004 ; Jung et al., 2000**).

Prenant ca en considération une optimisation de l'extraction est pus que nécessaire pour l'extraction et la sélection des composés phénoliques à activité biologiques (**Naczk et Shahidi, 2006**).

Autant qu'un outil mathématique et statistique puissant, la méthodologie des surfaces de réponse a un grand avantage par rapport aux méthodes classiques d'optimisation. Car elle permet l'évaluation de l'effet de multiple variables et leurs interactions sur les réponses, avec un nombre minimisé d'expériences (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005**).

A graphic of a scroll with a black outline and a grey shadow on the left side. The scroll is unrolled, and the word "Conclusion" is written in a black, cursive font across its center.

Conclusion

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 qui ne sont pas toujours reproductibles. Dans mes dernières années les méthodes statistiques sont de plus en plus utilisées vu 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 surface de réponse. Le plan central composite (CCD) a été utilisé pour l'analyse de l'influence et les interactions entre les variables indépendantes.

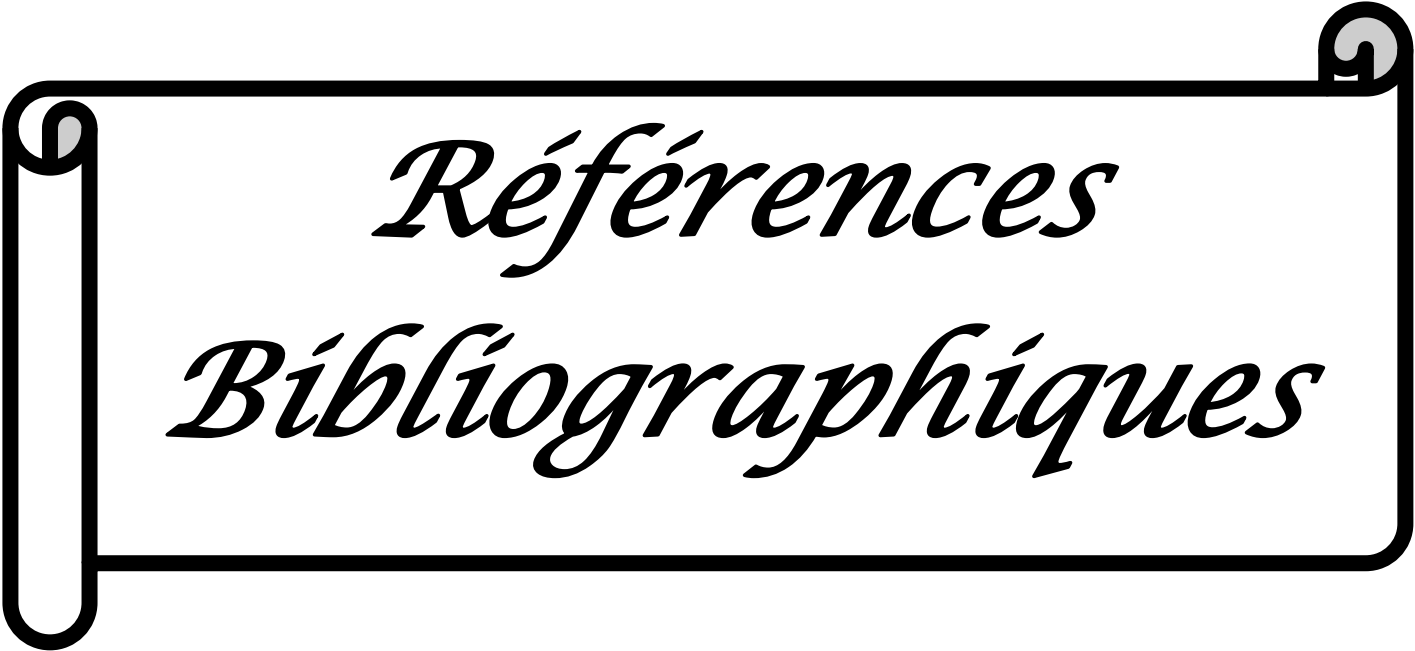
Les résultats ont montré que le modèle utilisé est ajusté à nos réponses (taux des polyphénols, l'activité antibactérienne, et l'activité antioxydante). De plus l'influence et les interactions entre les différents facteurs ont été étudiées en utilisant le test ANOVA.

La représentation graphique de l'équation polynomiale nous a permis de déterminer les niveaux optimaux pour chaque facteur.

Afin de tester la validité du modèle appliqué, nous avons réalisé une expérience en respectant les valeurs données par le logiciel pour chaque facteur, le résultat de cette expérience a confirmé la validité du modèle avec un bon rendement en polyphénols, une bonne activité antimicrobienne et antioxydante.

Dans ce travail, l'activité antimicrobienne (représentée par les zones d'inhibition) a été utilisée pour la première fois comme réponse pour l'optimisation par les plans d'expérience. Ainsi que pour l'optimisation du rendement d'extraction des polyphénols de *Cytisus villosus*.

A partir des résultats trouvés, on a montré l'efficacité, l'économie (temps et matériels), la reproductibilité et la précision de la méthode de surface 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 fournis aux chercheurs le maximum d'information avec le minimum d'expériences.



*Références
Bibliographiques*



Aganga A.A., Mosase K.W., (2001): Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus*

lancea seeds. *Animal Feed Science and Technology*, **91**:107-113.

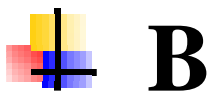
Akroum S., (2006) : Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister., *Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de Rosmarinus officinalis et Vicia faba L*, **91** p :8-21.

Akroum S., (2011) :Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Doctorat en sciences ., *Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels*,**112** p :6-23.

Amlan K., Patra JS.,(2010): A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen.*Pytocheistry*,**71**p:1198-1222.

Atmani D ., Nassima C ., Dina A ., Meriem B ., Nadjet D ., Hania B ., (2009) : Flavonoids in Human Health., From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science*; **5**: 225-237.

Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P., (2005) : Tea and herbal infusions., their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* **89**: 27-36.



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.

Benzeggouta N., (2005) :Thèse Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie ., *Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliment .*,**110** p :95-98.

Bhattacharyya B., Johri BM., (1998): Flowering plants, taxonomy and phylogeny. Ed Springer-Verlag, Berlin : 253-256.

Boudjellal K., (2009) :Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister., *Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'Elaeagnus angustifolia L*,**51** p :10-20.

Boudjouref M., (2011) : Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister ., *Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L.*, **64** p :23-33.52, 53.

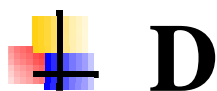
Bouhadjera K.,(2005) : contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens L.*, thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 143p.

Boussaid M.,(2013) : étude phytochimique et activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de l'extrait de tannins de *Pituranthos chloranthus* (Ghezzeb)., mémoire de master, Université de Tlemcen-Abou-Bekr Belkaïd, **52**p.

Bruneton J., (1999) : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales., 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, **575**p.



Cowan M., (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents., *Clin. Microbiol Re*, **12** (4): 564- 582.



Dacosta Y., (2003) :Les phytonutriments bioactifs.,Yves Dacosta (Ed).Paris.**317** p

Daglia M., (2011) : Polyphenols as antimicrobial agents., *Current Opinion in Biotechnology*, **23**:1-8.

Daneshvar M., Kamali H., Masoomi M., Ghaziaskar HS., (2012): Supercritical carbondioxide grafting of glycidyl methacrylate onto medium density polyethyleneand purification of residual monomer and initiator, *J. Supercrit. Fluid.* **70**:119–125.

De Witt H., (1963) : Les plantes du monde. Ed Hachette, Paris : 308-323.



Edenharder R., Grünhage D., (2003): Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102., *Muta, Res*, **540**: 1–18.



Florentin E (Relu), (2004) : fruits et légumes., polyphénols et santé.



Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N., (2011) :Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human.*Journal of Medicinal Plants Research.*, **5** (31):6697-6703.

Ghestem A., Seguin E., Paris, M.; Orecchioni, A-M., (2001) : Le préparateur en Pharmacie., (dossier 2). Paris : Editions médicales internationales, éditions Tec &Doe Lavoisier.; 153-190 ; 273p.

Gobbi R., Khebbaz W.,(2014) :Traçabilité de l'identification des métabolites secondaires Végétaux., Projet de Fin d'Etudes En vue de l'obtention du diplôme de Licence . Université Kasdi Merbah . OUARGLA,**34**p.

González N ., Ribeiro D., Fernandes E., Nogueira DR., Conde E., Moure A., Vinardell MP., Mitjans M., Dominguez H., Photoche J., Photobiol B., (2013): Biol, **125**: 83-89.

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

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

Goupy J. et Creighton L., (2006) : Introduction aux plans d'expériences. *Dunod*, Paris, France. P : 179-180.

Guignard, J-L., Cosson, L. ; Henry M .,(2000) : Abrégé en phytochimie., Paris: éditions Masson. 121-129 ; **224**p.



Hagerman A E., Butler,L G.,(1978): Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **26(4):** 809-812.

Hamdi Pasha Y., Bekhiri A., Benazzouz M., Benhamza L., Bensegni L.,(2002):Evaluation of the 1-healing activity after experimental burns some Algerian plants. *Rev. Med. Pharm. Afr:*1-8-16. Hanlidou, E., Kokkini, S., Bosalalidis, AM, Bessiére, JM., 1991. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Calamintha m.* *Plants Systematics and Evolution* 177 (1991):17-26.

Hamimed S.,(2009) : Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum L.*, mémoire de magister. Université de Mentouri, Constantine.**138**p

Hartzfeld PW., Forkner R., Hunter M D., Hagerman A E.,(2002):Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate., *J.Agric. Food Chem*,**50**: 1785-1790.

Hennebelle T., (2006) : Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. , Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota Pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. France.

Havsteen B.H., (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids., *Pharmacol. Therapeut*, **96**: 67– 202



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.

Iwueke A.V. and Nwodo O. F.C. (2008) : Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes., *Biokemistry*. **20**: 63 – 70.



Jung DM., de Ropp J S., Ebeler S E.,(2000): Study of interactions between food phenolics and aromatic flavors using one-and two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(2): 407-412.



Kamali H., Ghaziaskar HS., (2010) : Pressurized hot water extraction of benzoic acid and phthalic anhydride from petrochemical wastes using a modified supercritical fluid extractor and a central composite design for optimization, *J.Supercrit. Fluid*. **54**:16–21.

Kamali H., Khodaverdi E., Hadizadeh F., Ghaziaskar S.H., (2016): Optimization of phenolic and flavonoid content and antioxidant capacity of pressurized liquid extraction from *Dracocephalum kotschyvia* circumscribed central composite. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107 307–314.

Kang J., Liu Y., Xie M X., Li S., Jiang M., Wang Y D.,(2004): Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1674(2):**205-214.

Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., (2005): Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **15:** 3584-3587.

Kraujalis P., Rimantas Venskutonis P., Ibáñez E, Herrero M.,(2015): Optimization of rutin isolation from *Amaranthus paniculatus* leaves by high pressure extraction and fractionation techniques, *J. Supercrit. Fluid*. **104** :234–242.

Krief S., (2004) : Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur., Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, **343p** :23, 24, 201-205.



Laraoui H., (2007) : Docteur de l'université Louis Pasteur "Etude Phytochimique L'extrait Chloroformique de *Bupleurum Atlanticum*".

Liu J., Jia L., Kan J., (2013) : Jin CH., In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*), *Food Chem. Toxicol.* **51:**310–316.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using surface response methodology. *Food Chemistry*. **93** : 47–56.



Macheix J.J., Fleuriet A. et Allemant J.C. (2005) : Les composés phénoliques des végétaux., un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, P : 4-5.

Mason T L., Wasserman B P., (1987) : Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, **26** :2197-2202.

Masquelier J., (2006): Flavay., for a healthy mind body: (site). More from 50 years of Research Reveals the Health benefits of Flavay.

Références bibliographiques

Mezouar D.,(2012) : recherche d'activités biologiques de berberis vulgari., mémoire de magister Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 121p.

Milutinovic M., Radovanovic N., ´Corovic M., Marinkovi´c S.Š.,´c-Stojanovi´c M. R., et ´c-Brankovi´c S. D. (2015): Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, **77** : 333–341.

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, **155p**.

Mohammedi Z., (2013) : Thèse de doctorats Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, **20-22**.

Montgomery D C., (2001): Design and analysis of experiments New York: John Wiley & Sons, Inc. (5th ed., pp. 435e460).

Mourad B., (2011) : étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L, mémoire de magister, Université Ferhat Abbes, Sétif, **64p**.

Muanda F., (2010) : Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur ., Identification de polyphénol. évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques,**239** p :15, 16,71-74.

Mukohata Y., Nakabayashi S., Higashida M.,(1978): Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation., *FEBS Lett*, **85**: 215– 218.

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 N-formylmethamphetamine by FAB/MS, LC/MS/MS, and NMR. *Drug Metabolism and Disposition*. **20(3)**: 451-460.



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.

Newman DJ., Cragg GM., (2012): natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **75** : 311-335.



Okamura H., Mimura A., Yakou Y., (1993): Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in Eucalyptus rostarta. *Phytochem*, **33**:557-561.



Parul L., Deepak K R., (2007) : Quercetin., A Versatile Flavonoid., *Internet Journal of Medical Update*, Vol. 2, No. 2, Jul-Dec 2007. **16** p :2.

Pereira OR., Silva AMS., Domingues MRM., Cardoso SM., (2012): *Food Chem*, **131**: 652-659.

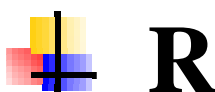
Peronny S., (2005) : La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).,Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .**151**p.

POISSONJ.,(2015) :Alcaloïde ,*Encyclopaedia.Universalis* .Url :<http://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloides> .

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**p:679-684.



Quanhong, L., Caili, F., (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*. **92**: 701–706.



Radojković M., Zeković Z., Jokić S., Vidović S., Lepojević Ž., Milošević, S.(2012): Optimization of Solid-Liquid Extraction of Antioxidants from Black Mulberry Leaves by Response Surface Methodology. *Food Technology & Biotechnology.*, **50**(2).

Repcak M., Imrich J., Fanekova M.,(2001): Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. *Plant Physiol*, **158**: 1085: 1087.

Ribereau- Gayon P ., (1968) : Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dumond, Paris.

Rira M., (2006) : Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister ., *Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins*.**80** p :14-25.

Rostagno M A., Palma M., Barroso C G.,(2004): Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta.* , **522(2)**, 169-177.



Sado G.M. et Sado C.,(2000). Les plans d'expériences, AFNOR.p25.

Scalbert A., (1991) : Antimicrobial properties of tannins., *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883.

Schorderet M.,(1992) : Pharmacologie., Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.OPU, Alger, **918**.

She GM, Xu C., Liu B., Shi RB., (2010) : Polyphenolic acids from Mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity, *J. Food Sci.* **75**:359–362.

Singh R., Singh S., Kumar S., Arora S., (2007): Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A Cunn, *Food Chem.Toxicol.* **45** :1216–1223.

Singleton, V. L., Rossi, J. R., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, **16** :144–15

Spichiger R-E., Savolainen V-V., Figeat M., Jeanmonod D.,(2004) : Botanique systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, : 202-203

Sundararajan R., Haja NA., Kumar V., Mukherjee K., Saha BP., Bandyopadhyay A., Mukherjee PK.,(2006): *BMC Complementary and Alternative Med*, **6(8)**:1-7.

Sundararajan R., Koduru R., (2014): *Indo American J. Pharmacol. Res*, **4(4)** : 2151-2169.

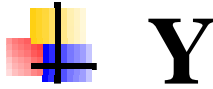
Sylvain S.,(2010) : Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. *Chimie. Université de Corse, Français*.



Tsimogiannins D., Oreopoulou V., (2006): The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency., A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* **7**: 140-146.



Weuster-Botz D.,(2000): Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**: 473-483.



Yakhlef G., (2010): Thèse présentée pour l'obtention d'un diplôme de Magister., *Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de Thymus vulgaris L. et Laurus nobilis L.*,**69** p :5-43.

Yao L.H., Jiang,Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S., (2004): Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum., Nutr.* **59** : 113-122.

Yeza S. et Bouchama S.,(2014): index des métabolites secondaires végétaux., projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de licence. Université Kasdi Merbah, Ouargla. **47p.**

Les sites web :

Anonyme1 : Définitions lexicographiques [archive] et étymologiques [archive] de« légumineuse » du Trésor de la langue française informatisé, sur le site du Centre national de ressources textuelles et lexicales ;

Anonyme2 :https://www.google.com/search?q=cytisus&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjLgODgleHLAhXFthoKHd19A_wQ_AUIBygB&biw=1366&bih=634.

Anonyme 3 : Lien vers APGIII <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.

Anonyme 4 : Livre PAP ILION ÂGÉES : CYTISUS.

Anonyme 5 : Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica – 2011.

Anonyme 6 : Canope.ac-besancon.fr/flore/FABACEAE/especes/cytisus_villosus.htm.

Anonyme 7: National Center for Biotechnology Information (NCBI) : Fabaceae (en) lato sensu.

Anonyme 8: Julve, Ph., 2015 ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 16 février 2015. <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>.



Annexes

ANNEXES

Annexe N °1 : Composition des milieux

EMB

Gélose EMB		
Peptone	10	g
Lactose	10	g
Phosphate bipotassique	2	g
Eosine	0.4	g
Bleu de méthylène	0.065	g
Gélose	15	g
PH	7	

GN

Gélose nutritif		
L'extrait de viande	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Eau distillé	1000	ml
PH	7.4	

MH

Gélose Mueller Hinton		
Infusion de viande de boeuf	300	ml
Hydrolysat de caséine	17,5	g
Amidon	1,5	g
Agar	17	g
pH	7.4	

Annexe N °2 : Produits chimiques utilisé

Solutions :

- Eau physiologique.
- Méthanol.
- Ethanol.
- L'eau distillée.
- Réactif de Folin-Ciocalteu: dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.
- Solution de DPPH (0,1mM): préparée dans l'éthanol.
- Carbonate de sodium Na₂ CO₃ (7,5 %) : préparé dans l'eau distillée.

ANNEXES

-Acide ascorbique.

- Acide gallique (200 µg/ml): préparé dans l'eau distillée.

Annexe N °3 :préparation des solutions

carbonate de sodium : 7.5g de NaCO₃+100ml d'eau distillé

solution DPPH : 25mg+100ml de méthanol

solution d'acide ascorbique :Introduire 16mg d'acide ascorbique+ 10ml d'éthanol

McFarland : 1g de BaCL₂+100ml d'eau distillé

1ml H₂SO₄+100ml d'eau distillé

0.5ml de BaCL₂ dilué+99.5ml H₂SO₄ dilué

Préparation de solution d'acide gallique : 200µg+100ml d'eau distillé

Annexe N°4 : Matériel

Balance, Entonnoir en verre, papier filtre, Agitateur, Barrou magnétique, Papier film, Papier Wattman N°1, Flacon stérile, pipettes graduées, bain marée, les tubes a essai, boite de pétri, les étuve, vortex, éprouvette, bécher, micro pipette, Bec Bunsen, l'anse de platine, Spatule, écouvillon. Micro pipette, Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, Autoclave, Centrifugeuse.

Annexe N °5 : Absorbances des polyphénols

Tube	L'absorption	Tube	L'absorption
1	0.081	14	0.111
2	0.570	15	0.337
3	0.206	16	0.360
4	0.728	17	0.069
5	0.237	18	0.541
6	0.146	19	0.618
7	0.490	20	0.460
8	0.460	21	0.398
9	0.241	22	0.666
10	0.732	23	0.027
11	0.136	24	0.462
12	0.831	25	0.023
13	0.490	26	0.480

ANNEXES

Annexe N °6: Piégeage du radical libre DPPH (2,2diphényl-1-picrylhydrazyl).

Tube	L'absorption
01	0,105
02	0,100
03	0,052
04	0,033
05	0,074
06	0,073
07	0,070
08	0,060
09	0,042
10	0,051
11	0,062
12	0,041
13	0,074

Tube	L'absorption
14	0,049
15	0,069
16	0,059
17	0,049
18	0,055
19	0,048
20	0,059
21	0,046
22	0,063
23	0,049
24	0,055
25	0,063
26	0,054

Annexe N °7 : Les diamètres de zone d' inhibition.

TUBE	La zone d'inhibition		TUBE	La zone d'inhibition	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
01	11mm	20mm	14	00mm	17mm
02	9mm	15mm	15	00mm	19mm
03	00mm	17mm	16	10mm	13mm
04	13mm	14mm	17	00mm	21mm
05	10mm	15mm	18	10mm	17mm
06	00mm	20mm	19	8mm	17mm
07	00mm	18mm	20	7mm	18mm
08	8mm	15mm	21	9mm	14mm
09	00mm	19mm	22	14mm	13mm
10	7mm	18mm	23	00mm	20mm
11	5mm	17mm	24	00mm	20mm
12	11mm	17mm	25	00mm	19mm
13	11mm	17mm	26	8mm	8mm

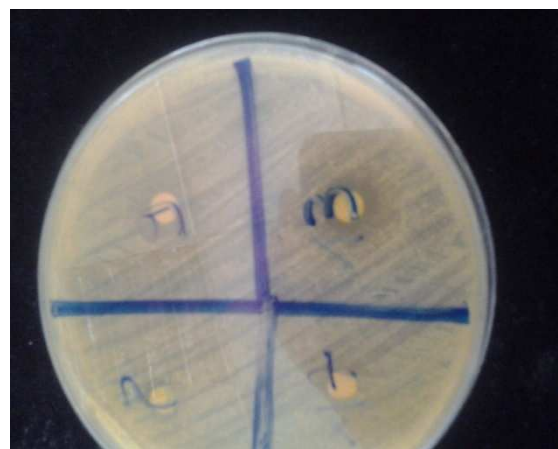
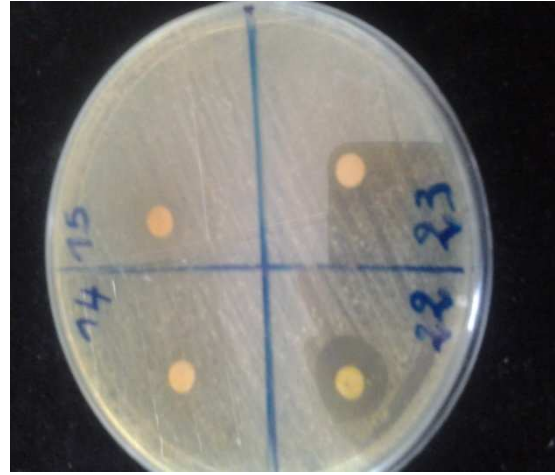
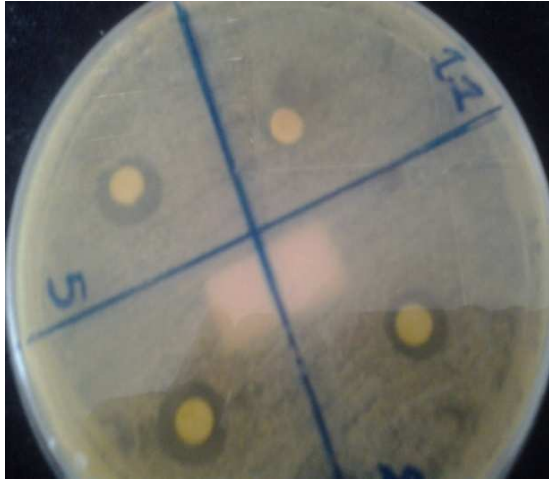
Annexe N °8: Définition APGII

La classification **APG II** (2003), ou classification phylogénétique, est une classification travaux de l'*Angiosperms Phylogeny Group*

ANNEXES

Annexe N°9 : Résultat des zones d'inhibitions :

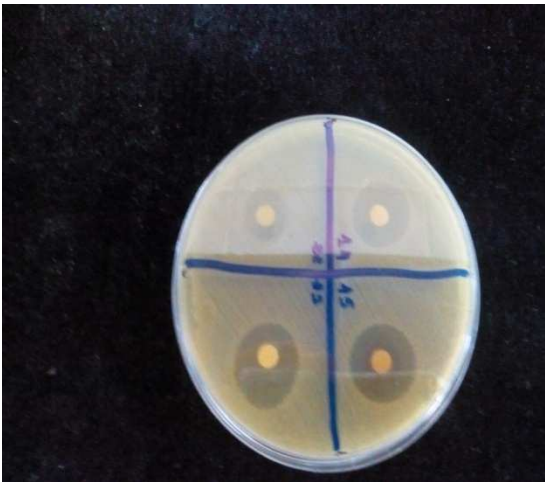
Escherichia coli



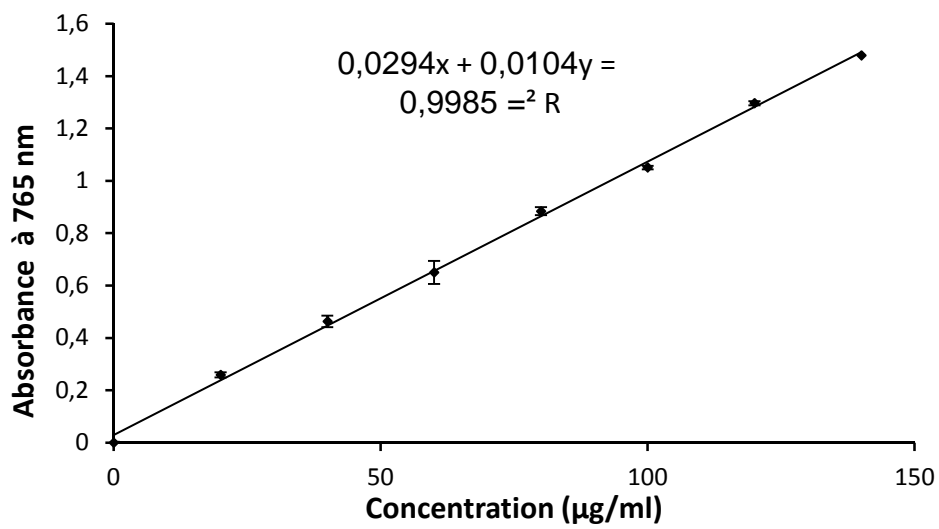
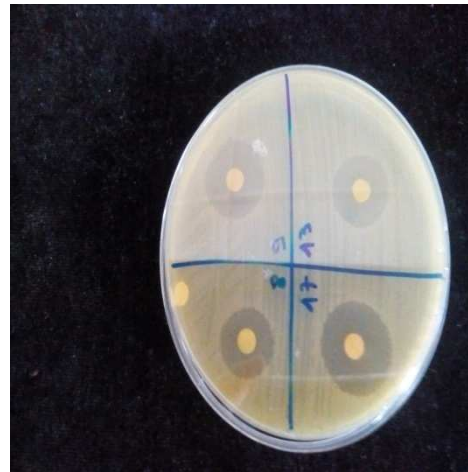
ANNEXES



Staphylococcus aureus



ANNEXES



**Annexe
N°9 : Courbe
étalonnage.**

Courbe étalonnage

Nom: MEKHACHEFA, DHIB

Prénom: Samira, Leila

Diplôme : Master

Option: Microbiologie

Thème: Optimisation des conditions de l'extraction des polyphénols à activité antibactérienne de *Cytisus villosus*

Résumé

But : L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols des parties aériennes de *Cytisus villosus* à activité antioxydante et antibactérienne. L'optimisation est réalisée en utilisant le plan central composite en prenant en considération quatre facteurs (Température, temps, rapport m/V, et la concentration du méthanol). Le taux des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), le pouvoir antioxydant, ainsi que l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *E.coli*, ont été évalués pour chaque extrait. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les quatre réponses ($p < 0,05$) et R^2 [0,89 - 0,96]. L'établissement des équations polynomiales quadratiques et les courbes de surface de réponses nous a permis d'étudier l'influence de chaque facteur sur l'extraction des polyphénols, 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, *Cytisus villosus*, Plan d'expérience, activité antioxydante, activité antimicrobienne, Plan central composite.

**Encadreur : Mr BOUSSAA Abd-elhalim MAA Université Abbes Laghrour
–Khenchela
Soutenu le:05-06-2016**
