



République Algérienne Démocratique
Et Populaire.



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

UNIVERSITÉ 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 : Biologie.

OPTION : Biochimie appliquée.

Thème

**Optimisation de l'extraction des polyphénols
et leur activité biologique
à partir des feuilles (*Juniperus thurifera.L*).**

Présentées par:

Gati wafa

Lakehal zineb.

Encadré par:

Dr. ZERAIB Azzedine

Soutenu le: 22/06/2017.

Jury de soutenance:

Président: Mr. BOUSSAA Abdelhalim (M.A.A) Université Abbes Laghrour-Khenchela.

Rapporteur: Dr. ZERAIB Azzedine (M.A.A) Université Abbes Laghrou –Khenchela.

Examinatrice: M^{me}. Douaouya Lilia (M.A.A) Université.Abbès Laghrou-Khenchela.

Promotion: 2017.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH qui m'a donné la force afin de l'accomplir.

Ce travail a été effectué au laboratoire de la faculté des SNV de l'université Abbès Laghrour - Khenchela-sous la direction de Dr: Zeraïb Azzeddine à l'université d'Abbès Laghrour - Khenchela- .

A nos chers parents, de leur affection, sacrifice et de tous les efforts, j'espère que ce travail soit l'expression de nos pleines gratitude et de nos profonds respects. Nous ne savons pas comment vous remercier.

Mes vifs remerciements Dr: Zeraïb Azzeddine (MAA Université Abbas Laghrour, Khenchela) pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique. Sa compétence et la qualité de ses conseils, le soutien et ses aides durant toute la période du travail.

Nous tenons à remercier Mr. BOUSSAA Abdhalim , pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce Jury.

Mes vifs remerciements vont également à Madame Douaouya.Lilia de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Ainsi que tous les enseignants du département de biologie pour leur contribution à notre formation et leur disponibilité à nous orienter.

Nous remercions également les personnes du laboratoire de la faculté des SNV qui nous ont facilité la tâche, surtout: souad.B.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Zineb et wafa

MERCI

DEDICACE

*A mes chers parents (Salíha et Boulanouar)
pour leur amour, leurs sacrifices et leurs
encouragements qui ont fait de moi ce que je
suis aujourd'hui.*

*Sans oublié ma grand-mère et grand-père, que
dieu leur procure bonne santé
et longue vie.*

Mon oncle wahid, mon oncle hicham

*A mes frères: Amin , Badri, Syfaddin, Kanza, la
joie de la maison Arwaet aussi sajad , mon
fiancé Bassem,.*

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux
moments au cours de mon étude à l'université.*

*A pour leur aide et leurs en
couragements: amel, zineb, sara. Masaouda.*

A mes tontes, mes cousins, et toute ma famille.

*A toutes mes collègues et amies de la
promotion de 2^{ème} année Master Biochimie
2017, Qui j'ai passé mes meilleurs moments Qui
resteront un bon souvenir pour toujours.*

Wafa.



DEDICACE

À mes chers parents (Bachir et Yamina) pour leur amour, leurs sacrifices et leurs encouragements qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À mes frères : Lamine, Mohamed

Pour leur soutien et leur amour.

Sans oublier ma grand-mère et grand-père.

À mes tantes surtout: Hayet et mes cousins surtout: Mounira.

Et toute ma famille: Lakehal.

À mes chères amies : Zahwa, Wafa, Wiwi.

À toutes mes collègues et amies de la promotion de 2^{ème} année Master Biochimie 2017, qui j'ai passé mes meilleurs moments qui resteront un bon souvenir pour toujours.

Zineb.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à activité antioxydants à partir des feuilles de *Juniperus thurifera*. L'optimisation est réalisée en utilisant le plan factoriel complet (PFC) en prenant en considération quatre facteurs quantitatifs ; température, temps, rapport solide/liquide, et rapport méthanol/eau, et un facteur qualitatif : le sexe de l'arbre. Le taux des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), la teneur en flavonoïdes (AlCl_3), ainsi que le pouvoir anti-radicalaire (DPPH) ont été évalués pour chaque extrait. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les trois réponses ($p > 0,05$) et R^2 [0.70-0,93]. 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. Les résultats trouvés ont été très proches des résultats prévus par le modèle.

Mots-Clés: Optimisation, *Juniperus thurifera*, Extraction, Plan d'expérience, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité anti-radicalaire.

Abstract:

The objective of our work is to optimize the extraction of polyphenols and flavonoids with antioxidant activity from the leaves of *Juniperus thurifera*. The optimization is carried out using the full factor design (FFD) taking into consideration four quantitative factors; Temperature, time, solid / liquid ratio, methanol / water ratio, and one qualitative factor: the sex of the tree. The total polyphenol content (by the Folin-Ciocalteu method), flavonoid content (AlCl₃), and anti-free radical (DPPH) were evaluated for each extract. The results showed that the model is well adjusted with the three responses ($p > 0,05$) and R^2 [0.70-0,93]. The establishment of the quadratic polynomial equations and the response surface curves allowed us to study the influence of each factor on the extraction of polyphenols, as well as the interaction between the various factors. The results obtained were very close to the results predicted by the model.

Keywords: Optimization, *Juniperus thurifera*, Extraction, Experimental design, Polyphenols, Flavonoids, Anti-free radical activity.

المخلص:

الهدف من عملنا هو تحسين استخراج مادة البوليفينول ومركبات الفلافونويد ذات النشاط المضاد للأكسدة من أوراق *Juniperus thurifera* ، مع الأخذ بعين الاعتبار العوامل الأربعة (الكمية، درجة الحرارة، الوقت، نسبه الصلب/السائل، نسبه الميثانول /الماء، والعامل النوعي: جنس النبتة).تم تقييم معدل إجمالي ا لفلافونويدات ومتعدد الفينول لكل عينة .وقد أظهرت النتائج أن النموذج يناسب بشكل جيد مع ثلاثة استجابات ($R^2 = 0.93-0.70$) و $p>0,05$. إنشاء المعادلات متعددة الحدود من الدرجة الثانية و منحنيات استجابة السطوح سمح لنا بدراسة تأثير كل عامل على استخراج مادة البولي فينول . والتداخل بين هذه العوامل المختلفة تم العثور على نتائج قريبة جدا من النتائج التي تنبأ بها النموذج.

الكلمات الدالة :تحسين، *Juniperus thurifera* ،استخلاص،التصميم التجريبي،البولي فينول، مركبات الفلافونويد،نشاط مضاد للأكسدة.

TABLE DES MATIERES

	page
Sommaire.....	I
Abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux.....	VI

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

PREMIER CHAPITRE: Synthèse bibliographique

I- Aspects Botaniques.....	3
I-1- Généralités sur la famille des <i>Cupressaceae</i>	3
I-2- Généralités sur les genévriers	3
I-3- L'espèce <i>Juniperus thurifera</i>	4
I-3-1- Notes taxonomiques	4
I-3-2- Description morphologique de l'espèce <i>J. thurifera</i>	5
I-3-3- Répartition.....	6
II- Les Polyphénols.....	7
II-1- La distribution des composés phénoliques.....	8
II-2- Classification.....	8
II-2-1- Les acides phénoliques	9
a- Les acides hydrobenoïque.....	9
b- Les acides hydroxycinnamique	10
c-Coumarines	11
II-2-2- Les flavonoïdes	11
II-2-3- Les tanins	13
a- Les tanins hydrolysables	14
b- Les tanin condensés	15
II-3- Biosynthèse des composés phénoliques	15
II-3-1- La voie de l'acide shikimique	15
II-3-2- La voie de l'acide malonique	16
II-4- Extraction de biomolécules à partir de sources végétale.....	17

II-4-1- Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide.....	17
II-4-2- Paramètres influençant l'extraction solide-liquide.....	18
Temps d'extraction	18
Température	18
Rapport solvant-solide	18
PH d'extraction	18
Taille des particules	18
Agitation.....	19
II-5- Activité biologiques des polyphénols	19
II-5-1- L'activité antioxydante.....	19
II-5-2- L'Activité antibactérienne	19

DEUXIEME CHAPITRE: Matériel et Méthodes

I- MATERIEL	21
I-1- Matériel végétal.....	21
I-2- Les souches bactériennes testées.....	22
I-3- Réactifs chimique et instrumentations	22
II- METHODES	22
II-1- Optimisation de l'extraction par plan d'expérience.....	22
II-2- Dosage des polyphénols totaux	23
II-3- Dosage des flavonoïdes	24
II-4- L'évaluation de l'effet antioxydant.....	25
II-5- Analyse des résultats	25

TROISIEME CHAPITRE: Résultats et discussion

I- Résultats de l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux (PPT)	27
I-1- L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire.....	29
I-2- L'analyse du manque d'ajustement	30
I-3- L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs.....	30
I-4- L'optimisation par surface de réponse du rendement d'extraction des PPT ...	31
II- Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes	33
II-1- L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire	35
II-2- L'analyse du manque d'ajustement	35
II-3 L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs	35

II-4- L'optimisation par surface de réponse de la teneur en flavonoïdes	37
III- Résultats de l'optimisation de l'activité anti-radicalaire (AAR).....	38
II-1- L'analyse du model par ANOVA et régression linéaire	40
II-2- L'analyse du manque d'ajustement	40
II-3 L'analyse de l'influence et l'interaction des facteurs	41
II-4- L'optimisation par surface de réponse de l'activité anti-radicalaire	42
Conclusion	44
Références Bibliographiques	46

ABREVIATIONS

DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli.</i>
FO	Folin–Ciocalteu.
GAE	Acide Gallique.
MeOH	Méthanol.
MH	Mueller Hinton
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium.
nm	Nanomètre.
PPT	Polyphénol totaux.
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus.
μl, ml	Microlitre, milliliter.
PFC	le plan factoriel complet.
F	femelle.
M	Male.
Q	quercétine.
Ms	matière sèche.

LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau 01: La position systématique de <i>Juniperus thurifera</i> L.....	5
Tableau 02: Principales classes des composés phénoliques.....	9
Tableau 03: Principaux types de coumarines.....	11
Tableau 04: Valeurs des variables réelles et codées des facteurs étudiés.....	22
Tableau 05: Matrice d'expérience pour les polyphénols totaux.....	26-27
Tableau 06 : L'analyse de la variance pour le taux PPT.....	28
Tableau 07: L'analyse du manque d'ajustement pour le taux des PPT.....	29
Tableau 08 : Analyse de régression des résultats obtenus pour le taux des PPT.....	29
Tableau 09: Résultats du dosage des flavonoïdes.....	32-33
Tableau 10: Analyse de la variance pour la teneur en flavonoïdes.....	33
Tableau 11: Résultats du manque d'ajustement du model pour la teneur en flavonoïdes.....	34
Tableau 12 : Analyse de régression des résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes.....	35
Tableau 13: Résultats de l'activité anti-radicalaire.....	37-38
Tableau 14: Analyse de la variance pour l'activité anti-radicalaire.....	38
Tableau 15 : Résultats du manque d'ajustement du model pour l'activité anti radicalaire.....	39
Tableau 16 : Analyse de régression des résultats obtenus anti-radicalaire.....	40

LISTE DES FIGURES

Page

Figure 01: Galbules de <i>Genévrier thurifère</i>	06
Figure 02: Les fleurs mâles de <i>Genévrier thurifère</i>	06
Figure 3: Répartition de <i>J. thurifera</i> en Algérie.....	07
Figure 04: Structure du noyau phénol.....	08
Figure 05: les formes de base des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés.....	10
Figure 6: Structures chimiques de base des acides hydroxycinnamiques et enzymes impliquées dans leur synthèse.....	10
Figure 7: Structure générale des flavonoïdes.....	12
Figure 08: les principales classes de flavonoïdes.....	13
Figure 9: structure des deux types de tanins.....	14
Figure 10: Structure générale de tanins hydrolysables.....	14
Figure 11: Structure générale de tanins condensés.....	15
Figure 12: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.....	16
Figure 13: l'espèce <i>Juniperus thurifera</i> L dans son milieu naturel.....	21
Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	24
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	24
Figure 16: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le taux des PPt.....	29
Figure 17: Surface de réponse de l'influence des différents facteurs sur le rendement de l'extraction des polyphénols. A: Influence de la température avec le sexe, B : Influence du rapport solvant/ eau avec le temps d'extraction, C: Influence du sexe avec le temps, D: Influence du rapport solide/liquide avec le rapport solvant/eau.....	31
Figure 18: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de la teneur en flavonoides.....	35
Figure 19 : Surface de réponse de la variation de la teneur en flavonoides en fonction des conditions d'extraction. (A): le sexe avec le temps, (B) : le rapport solvant/eau avec la	

température, **C**: le temps d'extraction avec le rapport Ms/Solvant, **D**: le sexe avec le rapport Ms/Solvant.....37

Figure20 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de l'activité anti radicalaire.....40

Figure21 : Surface de réponse de la variation de l'activité antioxydante en fonction des conditions d'extraction. (**A**): le sexe et la température, (**B**) : le rapport Mv/Solvant et le temps, **C**: la température de l'extraction et le rapport solide/liquide, **D**: le temps de l'extraction et le rapport solide/liquide.....42

Introduction générale

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

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

Le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les acides phénoliques les coumarines, les alcaloïdes, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

L'extraction des polyphénols à partir d'une matière naturelle en utilisant les solvants est une étape importante pour caractériser les systèmes naturels riche en polyphénols (**Mutlib et Abbott, 1992**). Actuellement, il y a une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques.

La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain. Notre travail porte sur une espèce dioïque, *Juniperus thurifera* L, une des plantes médicinales, moins fréquemment employée dans notre pays à cause de l'ignorance de sa valeur médicinale d'une part et de la rareté de cette espèce d'autre part. Il a pour objectif d'optimiser l'extraction des polyphénols extraites à partir des feuilles de cette espèce et l'évaluation de leurs activités biologiques en étudiant l'influence de cinq facteurs à savoir: la température, le temps d'extraction, le rapport méthanol/eau et le rapport solide/liquide et le sexe de la plante par la méthode des plans d'expérience.

Nous présentons notre travail en 3 chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique, dans laquelle sont mises en revue les notions indispensables à la compréhension de notre travail (les polyphénols, leur structure, la méthode de leur extraction, description de l'espèce étudiée et les travaux antérieurs). Un deuxième chapitre qui va concerner le matériel et la méthodologie adoptée.

Et enfin un troisième chapitre consacrée aux résultats et à leur discussion. Ce manuscrit sera clôturé par une conclusion.

I- Aspect botanique

I-1- Généralités sur la famille des Cupressacées (*Cupressaceae*):

Le *Genévrier thurifère* (*Juniperus thurifera*) est un arbre ou arbuste de la famille des *Cupressacées*, qui compte 135 espèces réparties en 29 genres (**Dorling, 2006**).

Les *Cupressaceae* présentent trois types de feuilles ; le type *cupressoïde*, *thuyoïde* et le type *oxycedroïde*, les deux premiers ne s'observant plus ou moins tardivement à la maturité de l'individu, le dernier type étant une forme juvénile. Quelquefois présente chez les formes adultes de certaines espèces (*Juniperus oxycedrus* L., *J. communis* L.) (**Maire, 1967**).

Le type *cupressoïde* : les feuilles sont opposées et squami formes et, dans les paires successives, elles sont toutes semblables; les rameaux sont cylindriques ou plus ou moins tétragones. La plupart des *Cupressus* ont à l'état adulte des feuilles de ce type, mais on les trouve aussi chez certains *Juniperus*, comme le *Juniperus sabina*.

Le type *thuyoïde* : les feuilles de la plante adulte sont encore opposées et squami formes, mais de forme différente d'une paire à l'autre : on rencontre alternativement deux feuilles aplaties dans le plan de leur limbe, puis deux feuilles pliées chacune suivant la nervure médiane, celle-ci forme la tranche du rameau feuillé, qui apparaît comme aplati. C'est notamment le cas des *Thuja* et des *Chamaecyparis*.

Le type *oxycedroïde* : les feuilles sont aciculaires et pseudo-verticillées. Des glandes résinifères sont fréquemment présentes à la surface ab-axiale de ces feuilles (**Quezel et Santa, 1963**).

I-2- Généralités sur les genévriers:

Le genre *Juniperus* L. comprend plus de 67 espèces dispersées dans l'hémisphère nord (**Adams et Demeke, 1993; Adams, 2008**). En Algérie, il est essentiellement présent sur les hautes montagnes: Moyen Atlas, Haut Atlas, Aurès où il peut apparaître dès 1700-1800 m. et s'élève théoriquement au moins jusque vers 2700-2900 m. C'est lui qui forme la limite supérieure des arbres sur le Haut Atlas sauf dans sa portion la plus occidentale où il fait défaut en raison du climat trop océanique (**Quézel et Gast, 1998**).

Le genre *Juniperus* se divise en trois sections; *Caryocedrus* (une espèce, *J. drupacea* Labill.); *Oxycedrus*, (9 ou 10 espèces) et *Sabina* (regroupe approximativement 50 espèces) (Adams, 2008). La flore de l'Algérie compte deux sections et cinq espèces; Sect. *Oxycedrus* (*J. communis* L., *J. oxycedrus* L.), et la section *Sabina* (*J. thurifera* L., *J. phonicea* L., *J. sabina* L.) (Adams et Demeke, 1993; Adams, 2008).

Le genre *Juniperus* est caractérisé par des cônes très particuliers, appelés «galbules», comportant des écailles plus ou moins complètement soudées entre elles. Beaucoup d'espèces sont dioïques, au printemps, les pieds mâles portent des petits cônes à l'aisselle des feuilles de l'année précédente. Les trois ovules, à l'aisselle des écailles supérieures du rameau, émettent une goutte micropylaire captant le pollen (Rameau et al., 2008).

I-3- L'espèce *Juniperus thurifera* L:

I-3-1- Notes taxonomiques:

L'espèce *Juniperus thurifera* est sectionnée en deux sous espèces: *Juniperus thurifera* subsp. *africana* (Maire) (Gauquelin et al., 1988) pour les populations Nord-africaines et *Juniperus thurifera* subsp. *Thurifera* pour les populations européennes. Cette dernière sous espèce est elle-même scindée en trois chimiovariétés: *thurifera* pour l'Espagne et les Pyrénées, *gallica* De Coincy, pour les Alpes, et *corsicana* (Gauquelin et al., 1988) pour la Corse.

Les populations Algériennes très peu étudiées, ont le plus souvent été assimilées de manière péremptoire à la subsp. *africana* en leur appliquant ainsi sans vérification les conclusions taxonomiques et biogéographiques s'y rapportant (Vela et Schäfer, 2013). Les études menées par Terrab et al. (2008), Vela et Schäfer. (2013), et Zeraib et al. (2014a) ont montré la distinction de ces populations, comme intermédiaires entre subsp. *Africana* et subsp. *thurifera*.

Par conséquent Vela et Schäfer. (2013); Zeraib et al. (2014a) ont proposé d'appeler la population algérienne par *Juniperus thurifera* var. *Aurasiaca* Vela & P.Schaf, dans l'érang variétale, ce qui nous permettra de la considérer désormais comme appartenant à la partie européenne (subsp. *thurifera*) ou au sous ensemble marocain (subsp. *Africana*) (tab. 1)

Tableau 01: La position systématique de *Juniperus thurifera* L., d'après (Mao *et al.*, 2010) avec des modifications (variété).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous- règne	<i>Pracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Division	<i>Pinophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Cupressaceae</i> (cupressaceae)
Sous-famille	<i>Cupressoideae</i>
Genre	<i>Juniperus</i> L
Section	<i>Sabina</i>
Groupe	IV
Espèce	<i>Juniperusthurifera</i> L.
Variété	<i>Aurasiaca</i> Vela&P.Schaf (2013)
Nom vernaculaire	Aywal, Tazenzena (Noms berbère)

I-3-2- Description morphologique de l'espèce *J. thurifera*:

Le *génévrier thurifère* (*Juniperus thurifera* L.) (Nom commun "berbère": Aywel; Thazenzena), est un arbre ou arbuste dioïque, de port très variable, à feuilles en écailles et à galbules noirs bleuâtres à maturité (Nicolas, 2007) (fig.1). A l'état juvénile, les feuilles ne sont pas sous forme d'écailles mais de petites feuilles en alènes (formes de jeunesse), semblables à celles du *génévrier oxycèdre* ou commun, espèces qui appartiennent au même genre (Badri, 2003). Les cônes femelles (galbules) sont charnus, sub globuleux, de couleur noir bleuâtre, et contiennent 2 à 4 graines suivant la variété (Gauquelin *et al.*, 1988). Les fleurs mâles sont réunies en chatons terminaux sub-globuleux d'une taille moyenne de 5 mm, situées sur des courts ramules dressés. Leur floraison se déroule de février au mois d'avril (Badri, 2003) (fig.2).



Figure 01: Galbules de *Genévrier thurifère*.



Figure 02: Les fleurs mâles de *Genévrier thurifère*.

I-3-3- Répartition:

Le *Genévrier thurifère* est une espèce dont l'aire de répartition est limitée à la partie occidentale du bassin méditerranéen. Présent en Italie, en France, en Espagne, au Maroc et en Algérie (Montès, 1999).

En Algérie, *J. thurifera* se rencontre dans le massif de l'Aurès, sous forme de peuplements très ouverts, dégradés et paraissant relictuels (Tamagoult, 1988).

La *thurifère* dans les Aurès est distribuée en 3 blocs d'inégale importance: le premier est situé dans la région de T'kout, le second, dans la vallée de l'Ouled Abdi alors que le troisième est localisé dans le lieu dit Tibhirine (**fig. 3**). Les deux autres endroits où se situe le *Genévrier thurifère* sont dominés par d'autres essences forestières. Il n'arrive pas à individualiser des formations distinctes. Il s'agit de la cédraie de S'gag et de Chelia (**Beghami, 2013**).

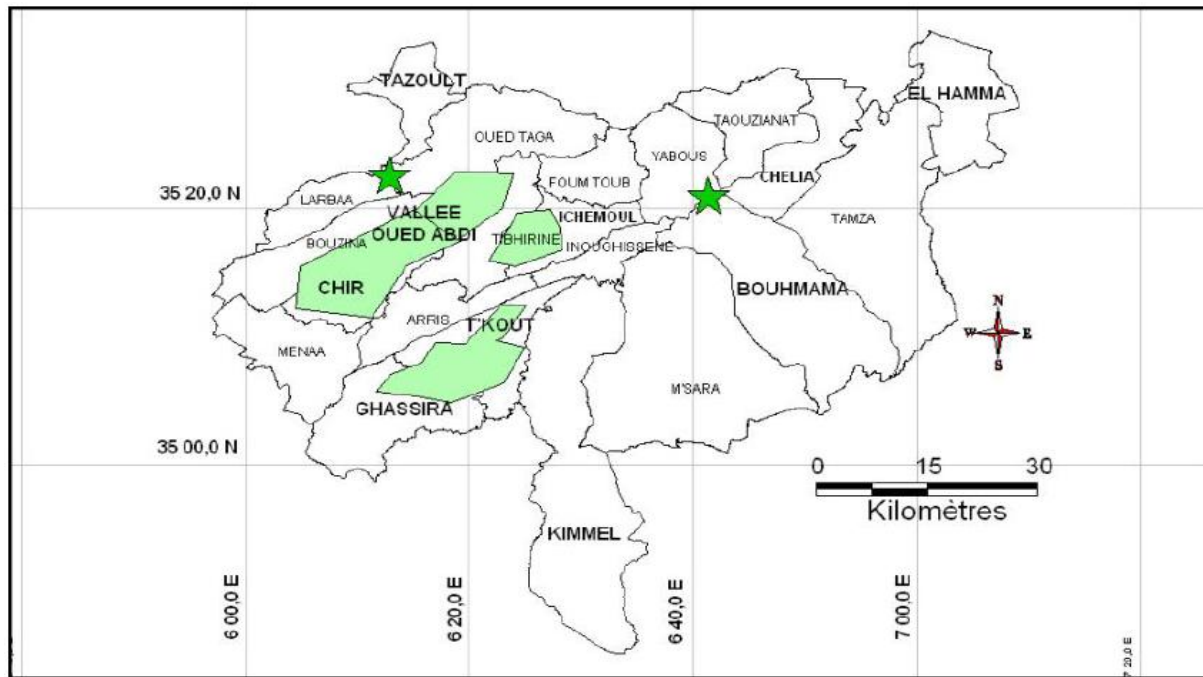


Figure 3: Répartition de *J. thurifera* en Algérie (**Beghami, 2013**).

II- Les polyphénols:

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Marouf et Reynaud, 2007**).

Le terme «polyphénols» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques pour désigner l'ensemble de composés phénoliques des végétaux (**Macheix et al., 2005**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique (**fig. 4**), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, comme les tannins. (**Dai et Mumper, 2010**).

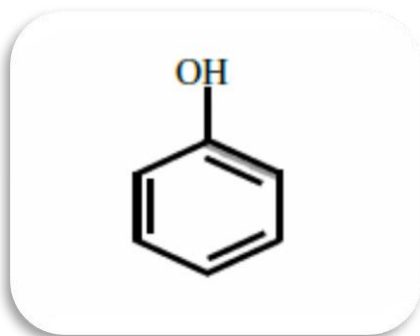


Figure 04: Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado *et* Cheynier, 2006).

II-1- La distribution des composés phénoliques:

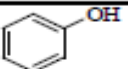
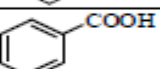
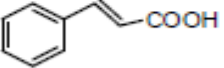
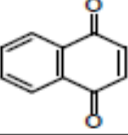
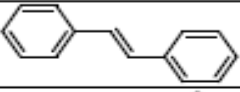
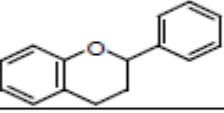
Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits (Peronny, 2005).

Généralement, les composés phénoliques et les métabolites spécialisés possèdent une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales (Innocenti *et al.*, 2005), mais aussi pour une même espèce en fonction de la variété. ces variations sont également très fortes selon l'organe végétal (Peronny, 2005), la nature du tissu végétal (Tugwell *et* Branck, 1989) et de la cellule (Wink *et al.*, 1997; Beckman, 2000).

II-2- Classification:

Les polyphénols, sont divisés en plusieurs classes en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (Aref *et* Heded ,2015). Les trois principales et grandes catégories sont: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, ils ne se rencontrent pas dans la nature à l'état libre mais sous forme d'esters ou plus généralement sous forme d'hétérosides (Destaine *et al.*, 2010).

Tableau 02:Principales classes des composés phénoliques.(Bravo, 1998).

Squelette carboné	Classe	Structures de base
C ₆	Phénols simples	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique coumarines	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	

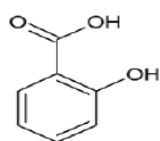
II-2-1- Les acides phénoliques:

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts: les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) et les acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃).

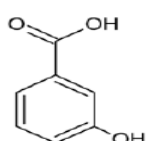
a- Les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁):

Dérivés d'acide benzoïque, la teneur en acides hydroxybenzoïques dans les plantes est très faible (Shahidi *et* Nacz, 2004). Substituée par un groupement carboxyle et un groupement hydroxyle, il existe sous la forme de trois isomères selon la position respective de ces deux groupes de substitution (Legrand, 2015).

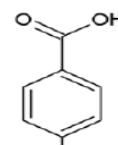
acide hydroxybenzoïque : 3 isomères



acide
2-hydroxybenzoïque
(acide salicylique)

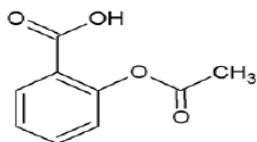


acide
3-hydroxybenzoïque

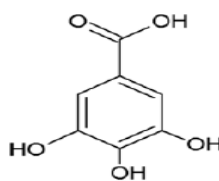


acide
4-hydroxybenzoïque

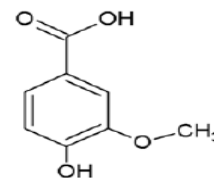
Quelques dérivés :



acide
acétylsalicylique



acide
gallique



acide
vanillique

Figure 05: les formes de base des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés
(Legrand, 2015)

b- Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3):

Dérivés d'acide cinnamique, Les acides hydroxycinnamiques sont les plus fréquents (Shahidi *et* Naczki, 2004). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et éventuelle modification par des réactions secondaires sont des éléments importants qui conditionnent la réactivité chimique de ces molécules. (Legrand, 2015).

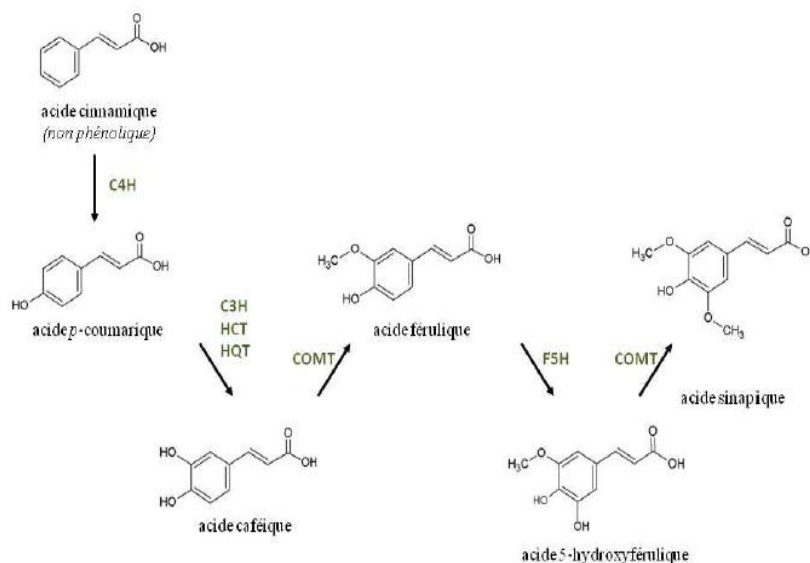
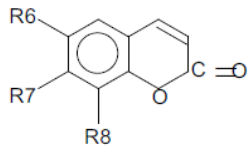


Figure6: Structures chimiques de base des acides hydroxycinnamiques et enzymes impliquées dans leur synthèse (Legrand, 2015).

c- Coumarines:

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. (Macheix *et al.*, 2005). Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles, la majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Selon la nature des substituant sur leurs structures, On peut classer les coumarines en cinq catégories : coumarines simples, Furanocoumarines, Pyranocoumarines Dicoumarines et Tricoumarines (tab.3) (Ford *et al.*, 2001).

Tableau03: 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	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

II-2-2- Les flavonoïdes:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaaliet *al.*, 2004 ; Malešev *et Kuntić*, 2007). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder *et Grünhage*, 2003). 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). Ils sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Agati *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Erdman *et al.*,

2007). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (Emerenciano *et al.*, 2007).

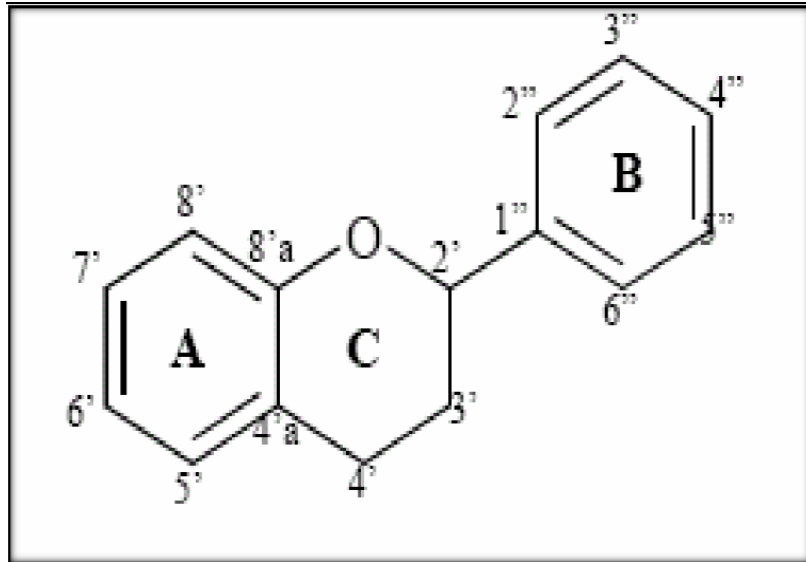


Figure7: Structure générale des flavonoïdes. (Kebbab, 2014).

Les flavonoïdes sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisées. Ce sont les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, les flavanols et les isoflavones (fig. 8)(Heim *et al.*, 2002).

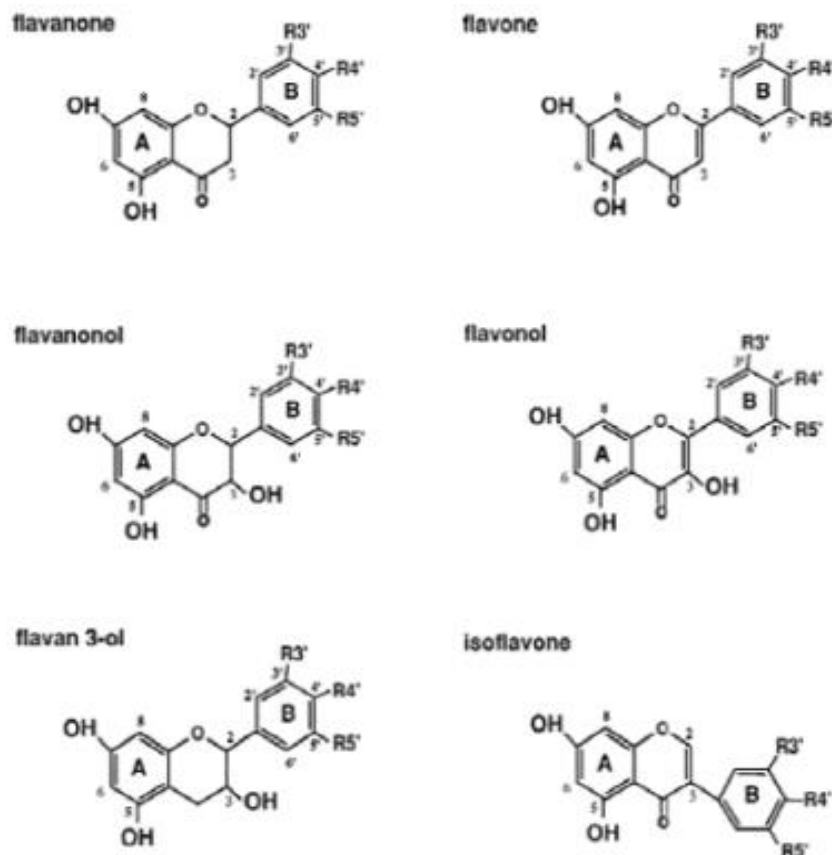


Figure 08: les principales classes de flavonoïdes.(Crozier, 2003).

II-2-3- Les tanins:

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (Kamra *et al.*, 2006). Ils se rencontrent dans de nombreux organes végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...) (Pouss *et*, 1989).

La structure des tannins est complexe, formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation. On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins, basés sur des différences structurales: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables ou tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines (Ghestem, 2001). Ils sont solubles dans l'eau et caractérisés par leur astringence (Peronny, 2005).

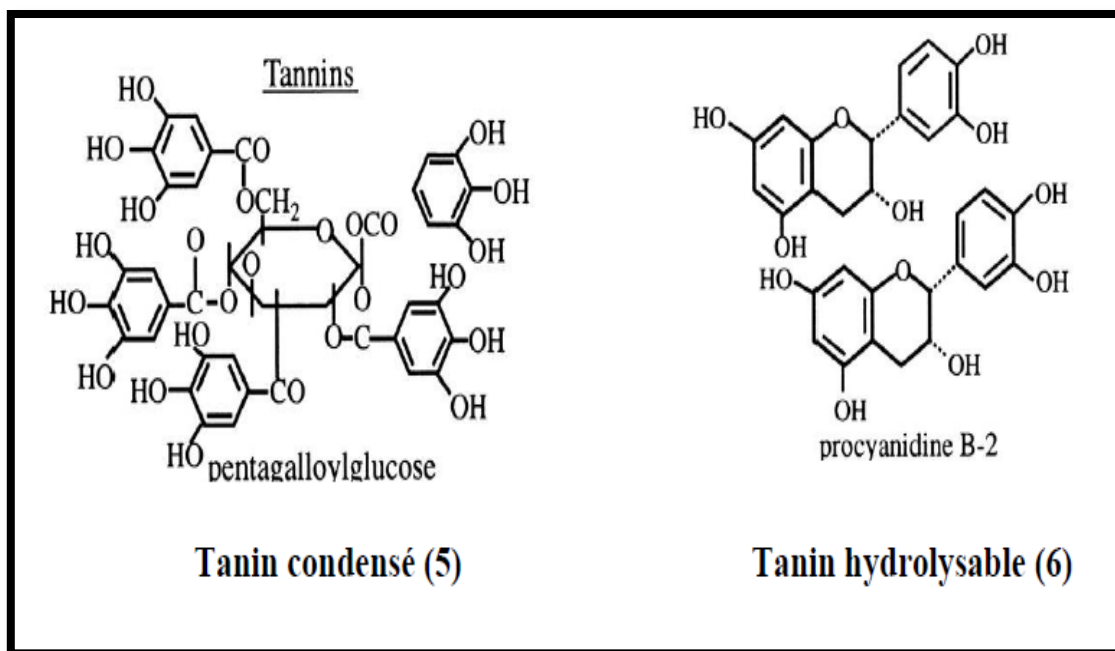


Figure 9: structure des deux types de tanins. (Ghestem, 2001).

a-Tanins hydrolysables:

Sont des hétéro polymères possédant un noyau central constitué d'un polyol, il s'agit souvent d'un D-glucose; comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques (Leinmuller *et al.*, 1991).

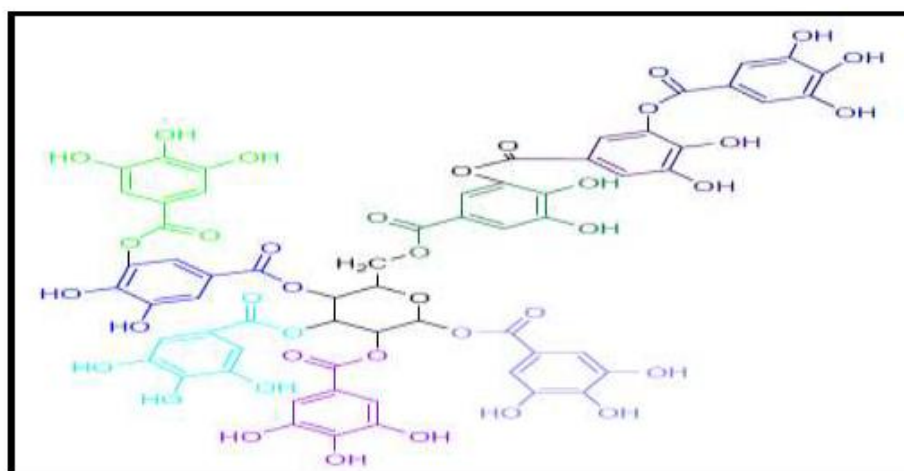


Figure 10: Structure générale de tanins hydrolysables. (Gilbert *et Norris*, 1968).

b- Tanins condensés:

Ce sont des composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (**Manchado et Cheynier, 2006**). Ce sont des tanins non hydrolysables ils sont plus complexes que les tanins galliques, ils possèdent un squelette phényl-2-chromane de flavonoïdes (**Alilou, 2012**). ces tanins sont constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4- diols), on peut les qualifier encore de tanins flavaniques (**Richter, 1993**).

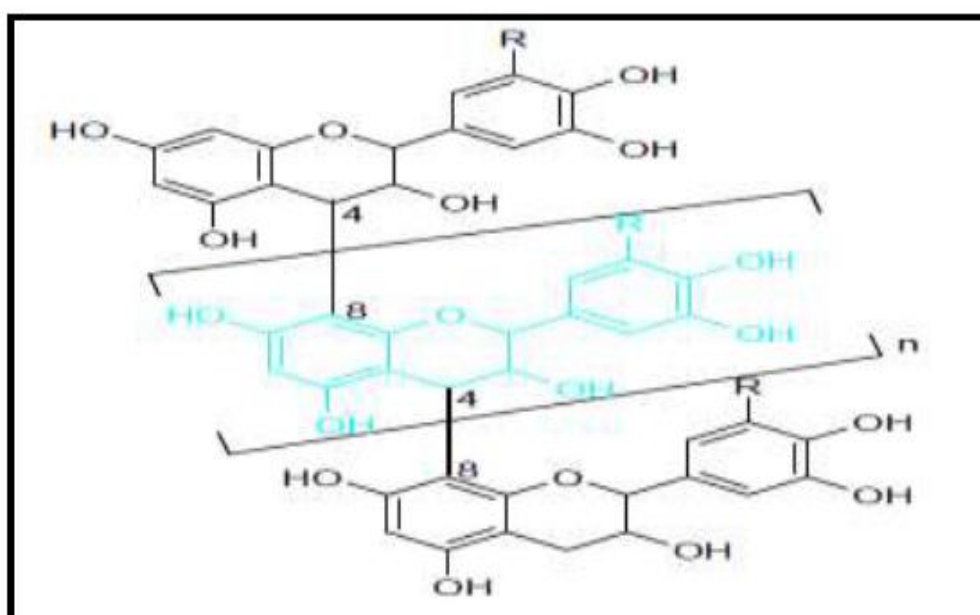


Figure11: Structure générale de tanins condensés. (**Gilbert et Norris, 1968**).

II-3 Biosynthèse des composés phénoliques:

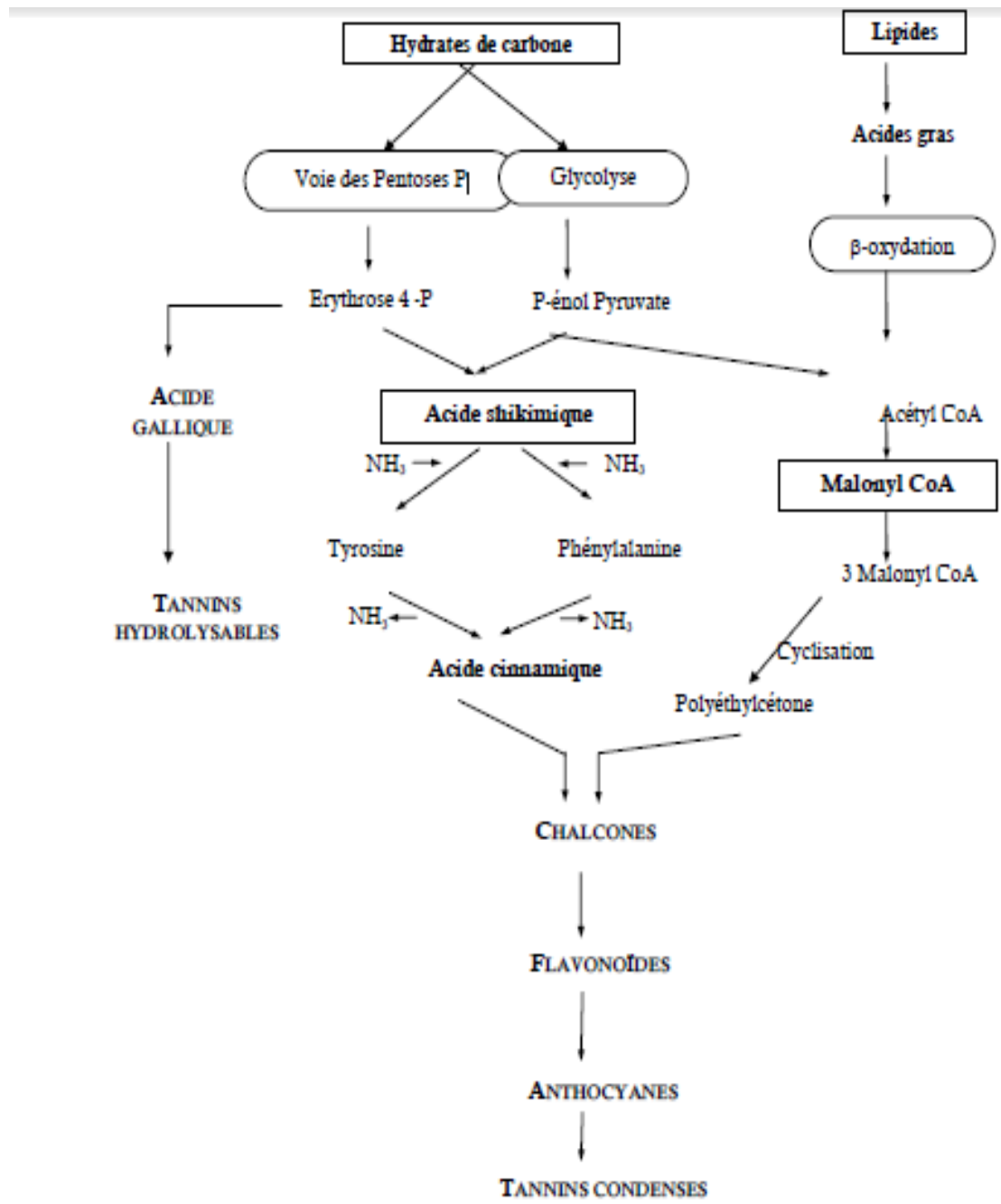
Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques; la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique.

II-3-1 La voie de l'acide shikimique:

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement (**Akroum, 2010**). C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde. (**Yao et al., 1995**).

II-3-2 La voie de l'acide malonique:

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase. (Akroum, 2010).



Figures12: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols. (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II-4 Extraction de biomolécules à partir de sources végétales:

En raison de son efficacité et de sa facilité de mise en œuvre, l'extraction solide-liquide est la technique la plus utilisée pour la récupération de molécules bioactives à partir de sources végétales.

II-4-1 Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide:

L'extraction solide –liquide est une opération physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (**Leybros et Frémeaux, 1990**). Suite au contact entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide dans la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs teneurs (fractions) dans la phase solide diminuent et leurs concentrations dans la phase liquide augmentent. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (**Dibert, 1989**).

Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires, généralement les solvants les plus utilisés sont l'éthanol, méthanol ou même l'eau pour l'extraction des composés polaires et le dichlorométhane pour l'extraction des composés non polaires (**Wang et Weller, 2006**).

Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contact entre les phases. Le séchage, le broyage et le morcellement sont souvent utilisés comme opérations de prétraitement. Parfois, des prétraitements enzymatiques sont également utilisés pour faciliter la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant. La rupture des parois cellulaires sous l'action de pectinases et cellulases favorise l'extraction des polyphénols. (**Bonilla et al., 1999**).

II-4-2 Paramètres influençant l'extraction solide-liquide:

Temps d'extraction: Le temps de contact entre les deux phases est aussi un des paramètres très importants à maîtriser. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au-delà. Ainsi des économies d'énergie et de main d'œuvre seront réalisées.

Température: L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction aussi car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Cependant cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction.

Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire. Des températures élevées au cours de l'extraction ou du séchage affectent la stabilité de certains composés phénoliques en raison de réactions impliquant des dégradations chimique et enzymatique, ou une décomposition thermique. **Larrauri *et al.* (1997)** ont constaté que la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols. Les hautes températures peuvent avoir aussi un effet bénéfique sur l'activité antioxydante (**Wang *et Ho*, 2009; Niéiforovié *et Abramovié*, 2014**).

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

PH d'extraction: La polarité de beaucoup de composés varie avec le pH du solvant. Par conséquent, leur solubilité dépend aussi de l'acidité/basicité du solvant (**Sheabar *et Neeman*, 1988**).

Taille des particules: La source est souvent préalablement découpée ou broyée pour faciliter l'extraction. La réduction de la taille des particules augmente la surface d'échange et ainsi la vitesse d'extraction (**Bucic-Kojic *et al.*, 2007**). La diffusion interne est aussi plus rapide dans

le cas de particules fines. Les particules très fines sont également plus difficiles à séparer de l'extrait liquide après la fin de l'extraction.

Agitation: L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Elle a un effet toujours favorable sur l'opération car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide et d'augmenter le coefficient de transfert. Si l'agitation est très intense et/ou maintenue durant une longue période, elle peut favoriser des chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (**Dibert et Cros, 1989; Leybros et Frémeaux, 1990**).

II-5- Activités biologiques des polyphénols:

II-5-1- Activité antioxydante:

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation possèdent une activité antioxydante significative. (**Kabbab, 2014**).

La présence de plusieurs unités de type acide phénolique peut concourir à renforcer l'activité antioxydante (**Macheix et al., 2006**). L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et super oxydes ($\text{O}_2\cdot$) (**Cristina Popovici et al., 2009**).

II-5-2: Activité antibactérienne:

L'activité antimicrobienne des polyphénols se produisant dans les aliments végétaux et les plantes médicinales a été largement étudiée contre un large éventail de microorganismes. Parmi les polyphénols, les flavan-3-ol, les flavonols, et les tanins ont reçu la plus grande attention en raison de leur large spectre et activité antimicrobienne plus élevée en comparaison avec d'autres polyphénols. (**Daglia, 2011**).

Les polyphénols sont doués d'activité antibactérienne importante, 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, en effet, le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**).

I. Matériel

1.1 Matériel végétal:

Le matériel végétal comprend la partie aérienne de l'espèce *Juniperus thurifera* L. Var. *aurasiaca* des deux sexes (mâle et femelle) récoltées de la région de T'kout, Wilaya de Batna au mois de septembre 2016.

L'identification botanique a été effectuée à l'aide de la flore locale (Quezel *et* Santa, 1963) et confirmée par Dr. ZERAIB Azzeddine (maître de conférences à l'université Abbes Laghrour- Khenchela).



Figure 13: l'espèce *Juniperus thurifera* L dans son milieu naturel.

Après séchage pendant 2 semaines, le matériel végétal a été broyé à l'aide d'un mortier traditionnel pour obtenir une poudre grossière, puis réduite en poudre fine à l'aide d'un moulin à café, puis tamisée avec un tamis dont le diamètre des pores est inférieur à 0,4 mm pour rendre la poudre plus homogène.

I.2 Souches bactériennes:

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont: la bactérie à Gram- *Escherichia coli* ATCC 25922 et la bactérie à Gram+ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

I.3 Réactifs chimiques et instrumentations:

Réactifs: Mueller Hinton (MH) (40mg/ml), $AlCl_3$ (2%) quercitine, méthanol, radical 1,1-diphenyl -2-picryl hydrazyl radical (DPPH'), Folincio-calteu, carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$ à 7,5%), l'acide gallique.

Appareillage utilisé: Spectrophotomètre UV-VIS à double faisceau (JENWAY 6305), Bain Marie (MEMMERT) Etuve, Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), Vortex (VELP) et Balance électrique (OHAUS), Boîtes de Pétri, Pipettes Pasteur, Micropipettes, Disques de papier wattman N°3 (6mm de diamètre), Ecouvillons stériles, Pince stérilisée, anse de platine, Bec Bunsen, Autoclave.

II. Méthodes:

II.1. Optimisation de l'extraction par plan d'expérience:

Dans notre étude le plan factoriel complet(PFC) a été utilisé pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols de *Juniperus thurifera* en utilisant cinq réponses, à savoir : le taux des polyphénols totaux (**Réponse Y1**), et les flavonoïdes (**Réponse Y2**), l'activité Antioxydante en utilisant le DPPH (**Réponse Y3**), l'activité Anti-*Escherichia coli* (**Réponse Y4**) et l'activité Anti-*Staphylococcus aureus* (**Réponse Y5**).

Afin d'évaluer les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols de l'espèce *Juniperu sthurifera*, cinq facteurs ont été étudiés dont un est qualitatif: le sexe de la plante (F/M) et quatre facteurs quantitatifs : la température ($^{\circ}C$) (30, 70), le temps d'extraction (h) (1, 2), le rapport solvant /eau (70/30, 30/70) et le rapport solide/liquide (g/10ml) (0.5, 1). Ces facteurs sont représentés en deux niveaux codés par -1 et +1 pour le minimum et le maximum respectivement. On a ajouté quatre essais situés au centre du domaine d'étude pour avoir une estimation de l'erreur expérimentale.

Les niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser ont été fixés en s'inspirant des travaux antérieurs (Telli *et al.*, 2010; Saikia *et al.*, 2015; Kamali *et al.*, 2016). Le (tab 04) réunit les valeurs des variables réelles et codées des quatre variables. La construction de la matrice des expériences nous a donné 36 essais.

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

Variable	Code du variable	-1	+1
Sexe	X1	F	M
Température (c°)	X2	30	70
Temps (h)	X3	1	2
Méthanol/Eau	X4	30	70
Solide/liquide	X5	0.5	1

La poudre obtenue (1g) a été mise à macérer dans un volume (10ml, 20ml) de méthanol (30%, 70%) sous agitation pendant (1, 2h) à différentes températures (30, 70 c°). L'extrait a été filtré sous vide, les solides ont été éliminés afin d'éviter les pertes pendant le processus de filtration qui pourrait brouiller les résultats; le filtrat a été porté à un volume initial avec le solvant d'extraction.

II-2-Dosage des phénols Totaux:

500µl de réactif de Folincio-calteu (10 fois dilué) et 1000µl d'eau sont ajoutés à 100µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables. Après 2 min, 1500µl d'une solution de carbonate de sodium (20 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/g d'extrait) (fig. 14).

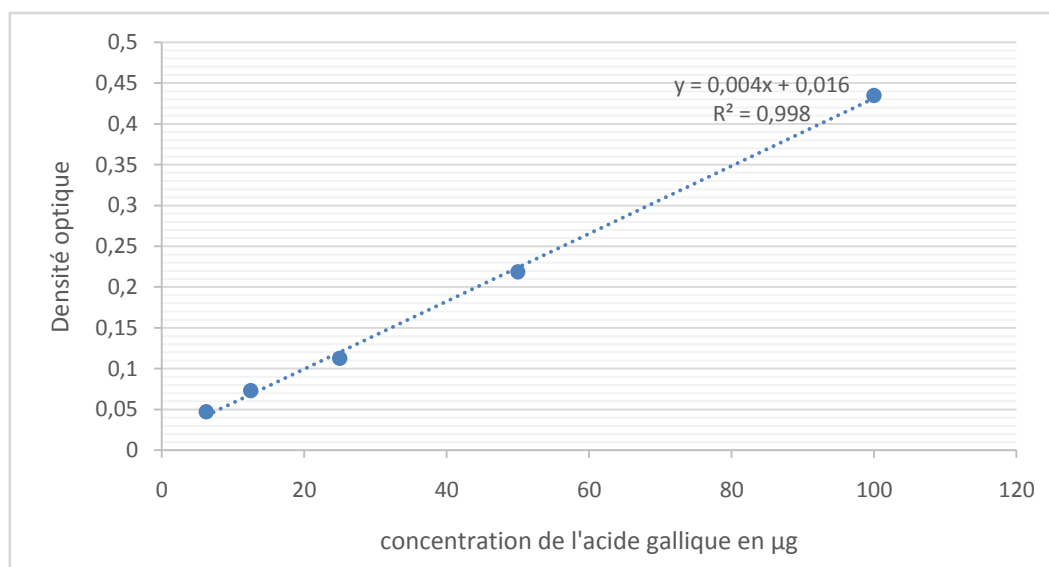


Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II-3- Dosage des flavonoïdes:

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium; ($AlCl_3$) (Vanhaelen *et al.*, 1980) à 1ml de chaque extrait (préparé avec des dilutions convenables dans le méthanol ou l'eau distillée) est ajouté 1ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40µg/ml) (Fig. 15) et elle est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (µg EQ/g Ms).

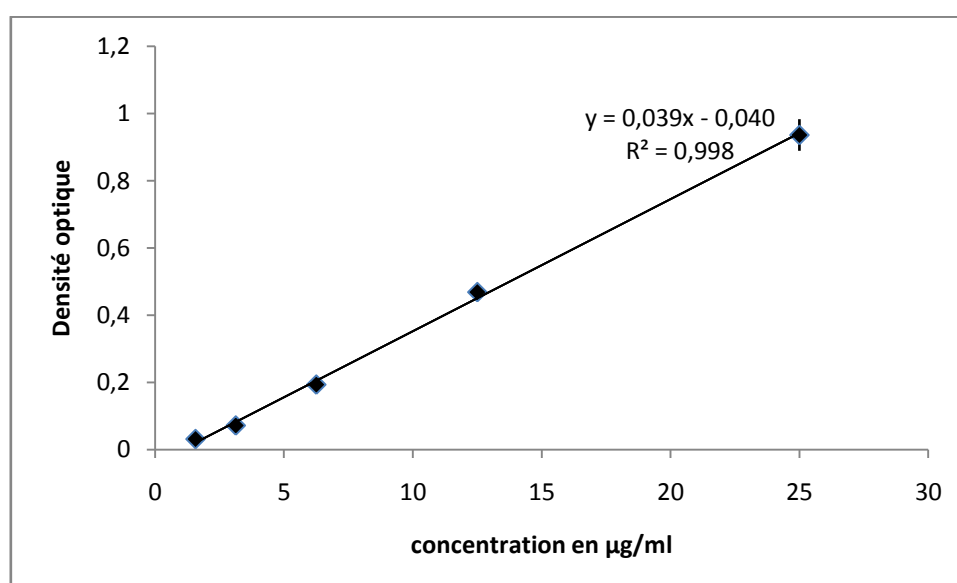


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

II-4 Evaluation de l'effet antioxydant:

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Le radical le plus fréquemment utilisé est le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benariba *et al.*, 2013) avec quelques modifications. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

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

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

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

II. 5 Analyse des résultats:

Pour les trois réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir : le sexe (**X1**), la température (**X2**), temps de macération (**X3**), la concentration du solvant (**X4**) et le rapport matière végétale/volume du solvant (**X5**) sont étudiées. La construction de la matrice des expériences nous a donné 36 essais.

Afin de prédire le point optimal, une fonction polynomiale de second ordre a été élaborée. Elle permet d'étudier la relation entre les variables indépendantes et les réponses (teneur en PPT, teneur en flavonoïdes 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 et les courbes de la surface de réponse (3D). Cette analyse est réalisée par le logiciel JMP 7 Discovery.

Résultats et discussion:

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

- Rendement d'extraction des polyphénols totaux (**Réponse Y1**).
- La teneur en flavonoïdes (**Réponse Y2**).
- L'activité antioxydante (**Réponse Y3**).

Pour les trois réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants à savoir : le sexe (**X1**), la température (**X2**), temps de macération (**X3**), la concentration du solvant (**X4**) et le rapport matière végétale/volume du solvant (**X5**) sont étudiées. La construction de la matrice des expériences nous a donné 36 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 Discovery7 (USA).

I. 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. Les conditions expérimentales, les résultats mesurés ainsi que les valeurs prévues (en mg Eq Ag. /g matières sèche) sont représentés dans le (**tab 05**).

Tableau 5: Matrice d'expérience pour les polyphénols totaux:

Essai	Variables indépendants					Taux des polyphénols	
	X1	X2	X3	X4	X5	Mesuré	Prévu
1	F	30	1	70	0.5	18.56	16.4125
2	F	30	2	70	0.5	15.87	15.555625
3	M	70	2	30	0.5	22.17	18.947625
4	M	30	2	30	1	8	11.427625
5	M	70	1	70	1	19.28	23.93825
6	F	70	1	70	0.5	17.19	13.223125
7	M	50	1.5	50	0.75	19.22	17.6645
8	F	70	1	30	1	19.43	16.198125
9	F	70	1	70	1	18.78	21.5725
10	M	30	1	30	0.5	15.74	15.790125
11	M	30	2	70	1	9.46	15.54575
12	M	70	2	70	0.5	20.35	19.52575
13	F	30	2	30	0.5	16.87	15.625
14	M	70	2	70	1	19.4	23.257625
15	F	30	1	70	1	23	24.768125
16	M	30	1	30	1	20.96	18.52575
17	M	50	1.5	30	0.75	16.04	17.6645
18	F	30	1	30	1	19.87	19.4175
19	F	70	2	30	1	21.2	22.91
20	M	30	1	70	0.5	17.23	18.20075
21	M	50	1.5	50	0.75	19.18	17.6645
22	M	30	2	30	0.5	9.41	11.25325
23	M	70	1	70	0.5	18.45	17.645125
24	F	70	1	30	0.5	13.69	11.4125
25	M	70	2	30	1	20.6	19.11575
26	F	70	2	70	0.5	19.88	20.64
27	F	30	1	30	0.5	13.11	14.625625
28	F	30	2	70	1	19.78	21.35
29	F	70	2	30	0.5	19.01	20.685625
30	F	70	2	70	1	38.89	26.428125
31	M	70	1	30	0.5	17.54	15.21075
32	F	30	2	30	1	19.55	17.855625
33	M	30	1	70	1	23.76	24.500125
34	M	30	2	70	0.5	16.47	11.807625
35	M	50	1.5	50	0.75	19.26	17.6645
36	M	70	1	30	1	12.77	17.940125

En analysant les résultats du (tab 05), il ressort que les taux des polyphénols obtenus varient de 8 à 38,89 mg Eq Ag /g Ms. La plus faible concentration a été observée avec le sexe mâle et les valeurs 30°C, 180 min, 30% et 1g/10ml pour les variables **X2, X3, X4 et X5**, successivement. D'autre part, la valeur de 38,89 mg Eq Ag /g Ms a été obtenue avec le sexe femelle et une macération à 70°C pendant 180 min, et en utilisant un rapport solide/liquide de 1g/10ml et 70% du méthanol.

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

L'analyse du model par le test ANOVA été hautement significatif ($p=0.0099$). D'autre part la valeur du coefficient de détermination (R^2) était de l'ordre de 0.70 montrant la bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression. Autrement dit le modèle de réponse a pu expliquer 70% des variations totales, et par conséquent, il reste 30% des variations qui ne sont pas expliquées par ce modèle. Les résultats de l'analyse de la variance et de la régression sont résumés dans le (tab.06).

Tableau 06 : L'analyse de la variance pour le taux PPT.

R	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	15	628,24597	41,8831	3,0910
Résidus	20	271,0005	13,5500	Prob. > F
Total	35	899,24648	55.4331	0.0099

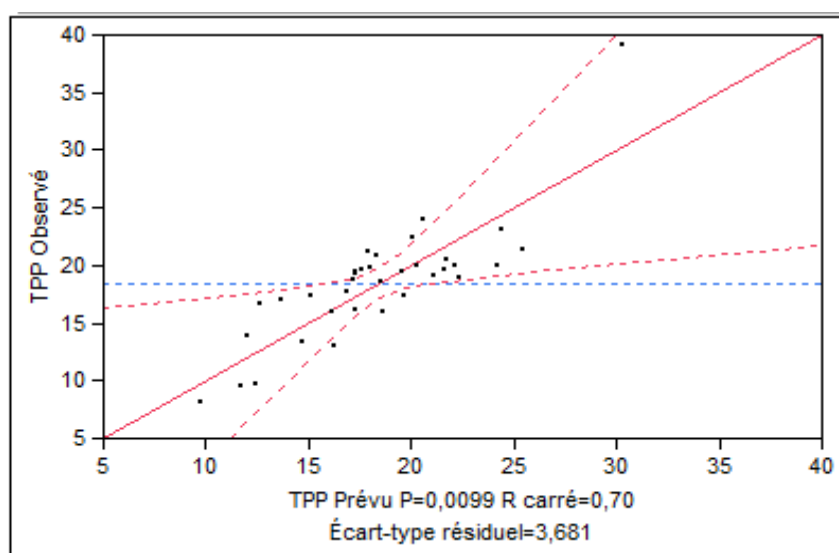


Figure16: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le taux des PPT.

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

Le manque d'ajustement est un paramètre très important pour la validité du model. Un manque d'ajustement significatif montre que le model est non ajusté au phénomène étudié, dans ce cas le changement du model et la réalisation d'une nouvelle optimisation est nécessaire. Les résultats du manque d'ajustement du model pour l'optimisation des polyphénols totaux sont récapitulés dans le (tab.07).

Tableau 07: L'analyse du manque d'ajustement pour le taux des PPt.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	17	263,41300	15,4949	6,1265
Erreur pure	3	7,58750	2,5292	Prob. > F
Erreur totale	20	271,0005	18.0541	0,9916

Selon le (tab.07) 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 que le model est bien ajusté à nos expériences.

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

Cette analyse est réalisée en utilisant le test ANOVA pour les facteurs étudiés. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le (tab.08).

A la lecture du (tab.08), il ressort que le rendement d'extraction des PPt est significativement influencé par les variables linéaires : température, rapport solvant/eau et le sexe de la plante ($p < 0.01$). Les facteurs de synergie : sexe*temps, température*temps et sexe*Ms/solvant s'avèrent posséder une influence significative sur ce paramètre.

Tableau 08 : Analyse de régression des résultats obtenus pour le taux des PPt.

Variable	Estimation	Ecart type	Rapport t	Prob.> t
Constante	18.466	0.617328	29.91	<,0.001*
Sexe [M]	-1.2015	0.617328	-1.95	0.0658
Température(30,70)	1.5934375	0.650721	2.45	0.0237*
Temps(1,2)	0.2359375	0.650721	0.36	0.7207
Solvant/eau(30,70)	1.4509375	0.650721	2.23	0.0374*
MS/Solvant (0.5, 1)	1.3496875	0.650721	2.07	0.0512
Sexe [M]*température	0.2521875	0.650721	0.39	0.7024
Sexe [M]*temps	-1.477813	0.650721	-2.27	0.0343*
Température*temps	2.5371875	0.650721	3.90	0.0009*
Sexe [M] *solvant/eau	-0.375312	0.650721	-0.58	0.5705
Température*solvant/eau	0.1621875	0.650721	0.25	0.8057
Temps* solvant/eau	0.0046875	0.650721	0.01	0.9943
Sexe [M] * MS/Solvant	-1.545312	0.650721	-2.37	0.0277*
Température* MS/Solvant	0.0296875	0.650721	0.05	0.9641
Temps* MS/Solvant	-0.296563	0.650721	-0.46	0.6535
solvant/eau* MS/Solvant	0.4221875	0.560721	0.65	0.5238

I.4. L'optimisation par surface de réponse du rendement d'extraction des PPt:

Pour comprendre l'interaction des cinq variables, le modèle de régression développé peut être représenté par les surfaces de réponse. Ces dernières montrent l'interaction de deux variables indépendantes quand une autre variable est fixée à zéro. La (**fig.17**) représente les surfaces de réponse établies pour le rendement des PPt.

La teneur la plus élevée des PPt a été obtenue avec une température de 70 °C et un temps d'extraction de 2h. Concernant la concentration du méthanol et la température, ces deux variables exercent un effet positif sur le rendement des PPt, en effet, ce dernier évolue en augmentant la proportion du méthanol et la température d'extraction (corrélation positive). Le maximum des PPt est atteint dans un milieu d'extraction où le méthanol fait 70% et avec une température de 70°C. Quant au facteur rapport Mv/solvant, il semble avoir une influence négative sur la teneur en PPt. L'augmentation de ce rapport provoque la diminution de la concentration des PPt.

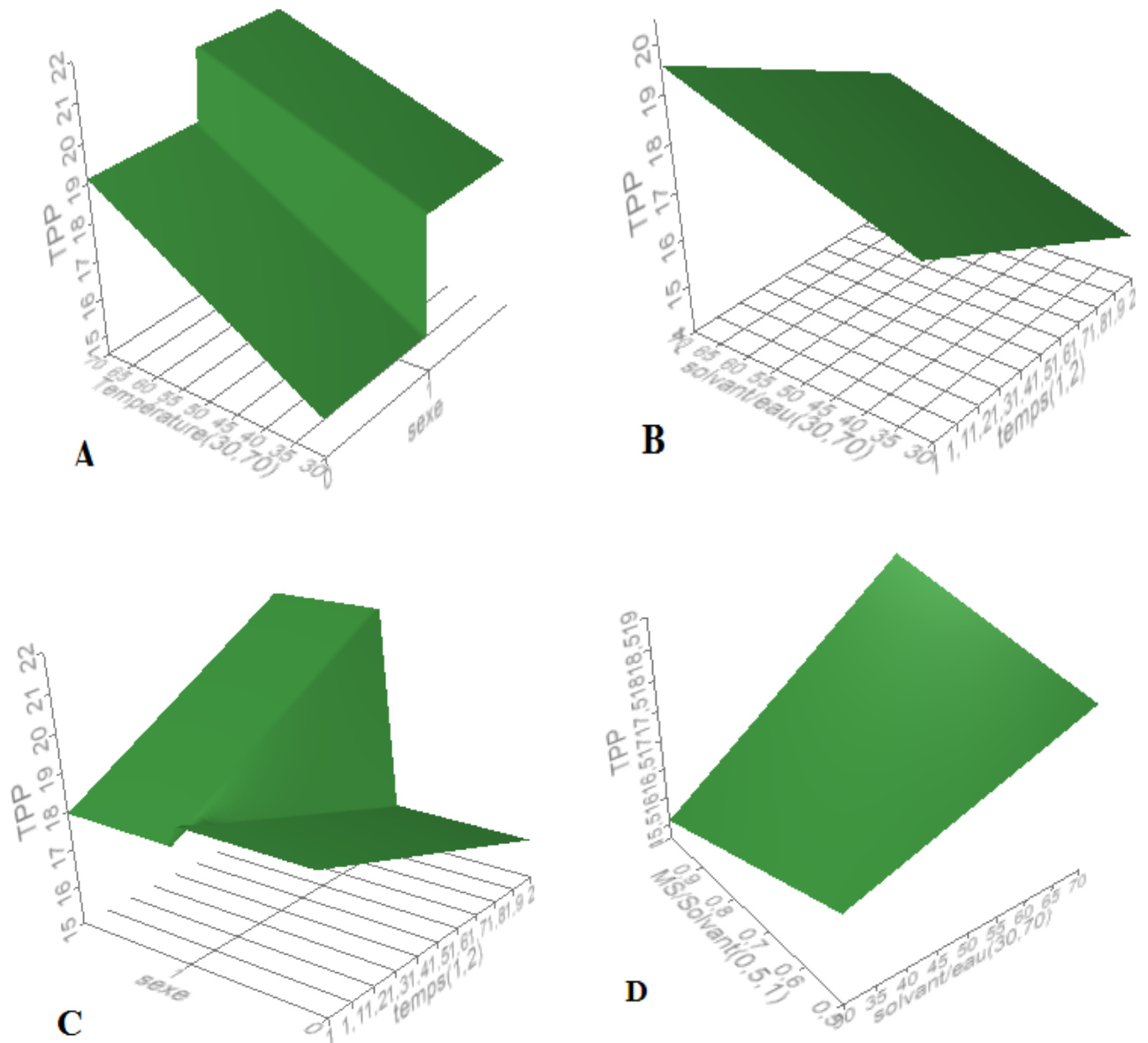


Figure 17: Surface de réponse de l'influence des différents facteurs sur le rendement de l'extraction des polyphénols. **A:** Influence de la température avec le sexe, **B :** Influence du rapport solvant/ eau avec le temps d'extraction, **C:** Influence du sexe avec le temps, **D:** Influence du rapport solide/liquide avec le rapport solvant/eau.

Généralement, la température a un effet positif sur l'extraction des composés phénoliques à partir de sources végétales (**Bucic-Kojic et al., 2007, Harbourne et al., 2009, Spigno et al., 2007**). L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction aussi car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Cependant cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction.

Les mélanges extraient souvent mieux les substances ciblées que les solvants purs (Yilmaz & Toledo 2006, Pinelo *et al.*, 2005, Penchev *et al.*, 2010). Les combinaisons de solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone avec l'eau font améliorer l'extraction des composés phénoliques glycosylés (Chirinos *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2007 ; Spigno *et al.*, 2007 ; Tabart *et al.*, 2007). En plus, un rapport de 70% de méthanol au minimum est nécessaire pour inactiver les polyphénols-oxydases, des enzymes intervenant dans l'oxydation des polyphénols, ce qui conduit au phénomène de brunissement (Chirinos *et al.*, 2007). Ce rapport est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes (catéchines ou épicatechines), les acides-phénols et leurs dérivés et plusieurs autres sous-groupes des flavonoïdes (Al-Farsi *et Lee*, 2007 ; Tabart *et al.*, 2007).

De nombreux auteurs (Nazck *et Shahidi*, 2004 ; Nazck *et Shahidi*, 2006 ; Chirinos *et al.*, 2007 ; Drużyńska *et al.*, 2007) ont signalé que la prolongation du temps d'extraction accroît d'une manière significative le pouvoir d'extraction du solvant.

Des résultats similaires sur l'influence du temps de macération sur l'extraction des polyphénols ont été obtenus par plusieurs auteurs (Chirinos *et al.*, 2007 ; Drużyńska *et al.*, 2007 ; Silva *et al.*, 2007).

Une équation de corrélation entre les variables et les réponses s'écrit :

$$Y=18,466-1,20 X_1+1,59 X_2+0,23 X_3+1,45 X_4+1,34 X_5+0,25 X_1X_2-1,47 X_1X_3+2,53 X_2X_3-0,37 X_1X_4+0,16 X_2X_4+0,0046 X_3X_4-1,54 X_1X_5+0,02 X_2X_5-0,29 X_3X_5+0,42 X_4X_5.$$

II. Résultats de l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes:

Les conditions expérimentales, les résultats mesurés de la teneur en flavonoïdes ainsi que les valeurs prévues (en µg EQ/g matières sèche) sont représentés dans le **tableau 09**.

La teneur en flavonoïdes de nos extraits varie de 60,52 à 508,99 µg EQ/g Ms. La plus faible concentration a été observée avec le sexe mâle et les valeurs 30°C, 60 min, 30% et 0,5g/10ml pour les variables, **X2, X3, X4 et X5** successivement. D'autre part, la valeur de 508,99 µg EQ/g Msa été obtenue avec une macération à température de 70°C et un temps de 180 min, et en utilisant un rapport solide/liquide de 1 et 70% du méthanol. Les valeurs mesurées sont très proches des valeurs prévues ce qui prouve l'intérêt du model.

Tableau 09: Résultats du dosage des flavonoïdes:

Essai	Variables indépendants					Taux des flavonoïdes	
	X1	X2	X3	X4	X5	Mesuré	Prévu
1	F	30	1	70	0.5	72.9	106.07375
2	F	30	2	70	0.5	157.97	158.531875
3	M	70	2	30	0.5	136.39	139.33275
4	M	30	2	30	1	210.43	195.95275
5	M	70	1	70	1	419.93	399.005875
6	F	70	1	70	0.5	185.37	161.636875
7	M	50	1.5	50	0.75	160.88	212.7065
8	F	70	1	30	1	150.85	101.016875
9	F	70	1	70	1	253.86	293.72375
10	M	30	1	30	0.5	60.52	111.97525
11	M	30	2	70	1	354.96	335.040875
12	M	70	2	70	0.5	152.76	205.005875
13	F	30	2	30	0.5	176.34	163.46625
14	M	70	2	70	1	494.23	465.04775
15	F	30	1	70	1	219.72	211.606875
16	M	30	1	30	1	145.76	160.943375
17	M	50	1.5	50	0.75	158.59	212.7065
18	F	30	1	30	1	69.25	80.01375
19	F	70	2	30	1	240.97	238.49625
20	M	30	1	70	0.5	124.89	118.533375
21	M	50	1.5	50	0.75	154.39	212.7065
22	M	30	2	30	0.5	82.91	96.993375
23	M	70	1	70	0.5	224.85	188.95525
24	F	70	1	30	0.5	87.49	103.45875
25	M	70	2	30	1	264.04	264.845875
26	F	70	2	70	0.5	205.17	247.12625
27	F	30	1	30	0.5	127.1	109.009375
28	F	30	2	70	1	317.98	314.05625
29	F	70	2	30	0.5	227.91	190.946875
30	F	70	2	70	1	508.99	429.204375
31	M	70	1	30	0.5	93.26	121.283375
32	F	30	2	30	1	185.96	184.461875
33	M	30	1	70	1	235.5	302.03025
34	M	30	2	70	0.5	118.96	101.55275
35	M	50	1.5	50	0.75	155.15	212.7065
36	M	70	1	30	1	205.73	196.80525

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

L'analyse du model par ANOVA a montré un effet très hautement significatif vis-à-vis de la réponse teneur en flavonoïdes ($p < 0.001$) (**tab. 10**).

Tableau 10: Analyse de la variance pour la teneur en flavonoïdes:

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	15	380215,88	25347,7	17,1082
Résidus	20	29632,30	1481,6	Prob. > F
Total	35	409848,18	26829.3	<, 0.001

La valeur du (R^2) était de l'ordre de 0,93, ce qui reflète une corrélation forte entre les valeurs prévues et les valeurs observées.

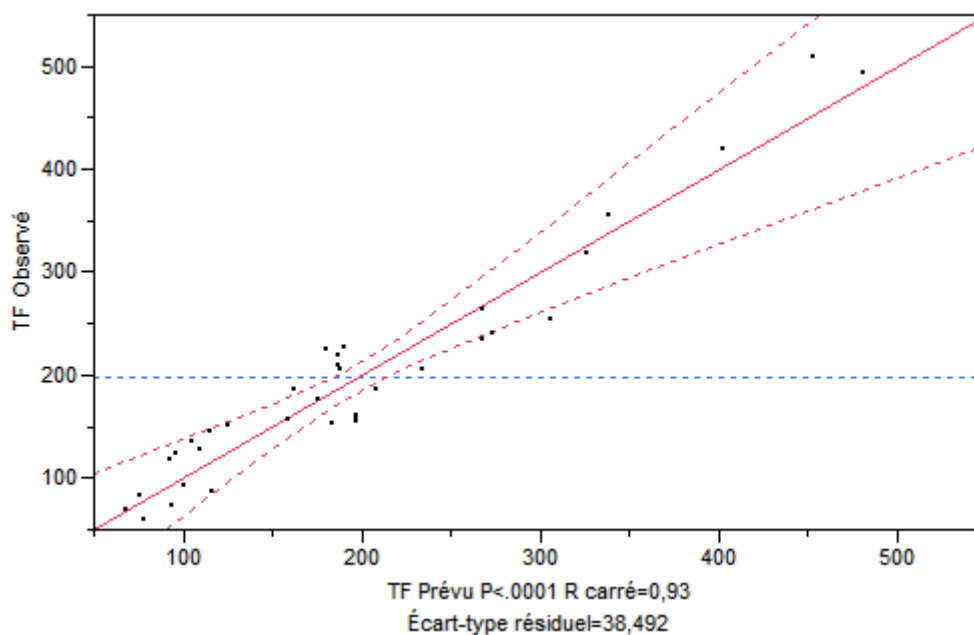


Figure18: Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de la teneur en flavonoïdes.

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

Les résultats d'analyse du manque d'ajustement sont résumés dans le (**tab.11**).

Les résultats du manque d'ajustement ont été non significatifs ($p = 0,99 > 0,05$). Ils sont en accord avec les résultats de l'analyse par ANOVA.

Tableau 11: Résultats du manque d'ajustement du model pour la teneur en flavonoïdes:

Source	Degré(s) de liberté	Somme des Carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	17	29604,741	1741,46	189,5491
Erreur pure	3	27,562	9,19	Prob. > F
Erreur totale	20	29632,303	1750.65	0,9999

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

Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et leur influence de sur la teneur en flavonoïdes sont représentés dans le (**tab12**).

Tableau 12 : Analyse de régression des résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes:

Variable	Estimation	Ecart type	Rapport t	Prob.> t
Constante	198.47294	6.455263	30.75	<,0.001*
Sexe [M]	-.0766438	6.455263	-0.12	0.9067
Température(30,70)	37.207813	6.804445	5.47	<,0.001*
Temps(1,2)	36.218438	6.804445	5.32	<,0.001*
Solvant/eau(30,70)	49.472813	6.804445	7.27	<,0.001*
MS/Solvant (0.5, 1)	63.855313	6.804445	9.38	<,0.001*
Sexe [M]*Température	3.8709375	6.804445	0.57	0.5758
Sexe [M]*temps	-17.20344	6.804445	-2.53	0.0200*
Température*temps	1.8515625	6.804445	0.27	0.7883
Sexe [M] *solvant/eau	8.4671875	6.804445	1.24	0.2278
Température*solvant/eau	15.434687	6.804445	2.27	0.0345*
Temps* solvant/eau	-0.343438	6.804445	-0.05	0.9602
Sexe [M] * MS/Solvant	19.647188	6.804445	2.89	0.0091*
Température* MS/Solvant	12.732188	6.804445	1.87	0.0760
Temps* MS/Solvant	18.591563	6.804445	2.73	0.0128*
Solvant/eau* MS/Solvant	33.788438	6.804445	4.97	<,0.001*

Nos résultats font ressortir que la teneur en flavonoïdes est très significativement influencé par les facteurs linéaires température, temps et rapport solvant/eau et rapport solide/liquide avec ($p < 0.01$). De plus, la teneur en flavonoïdes est influencée significativement par les variables de synergie sexe M*Temps, Température*solvant/eau, sexe M*Ms/Solvant, temps*Ms/Solvant, solvant/eau et Ms/Solvant.

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

L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme des surfaces de réponse dans la (fig.19).

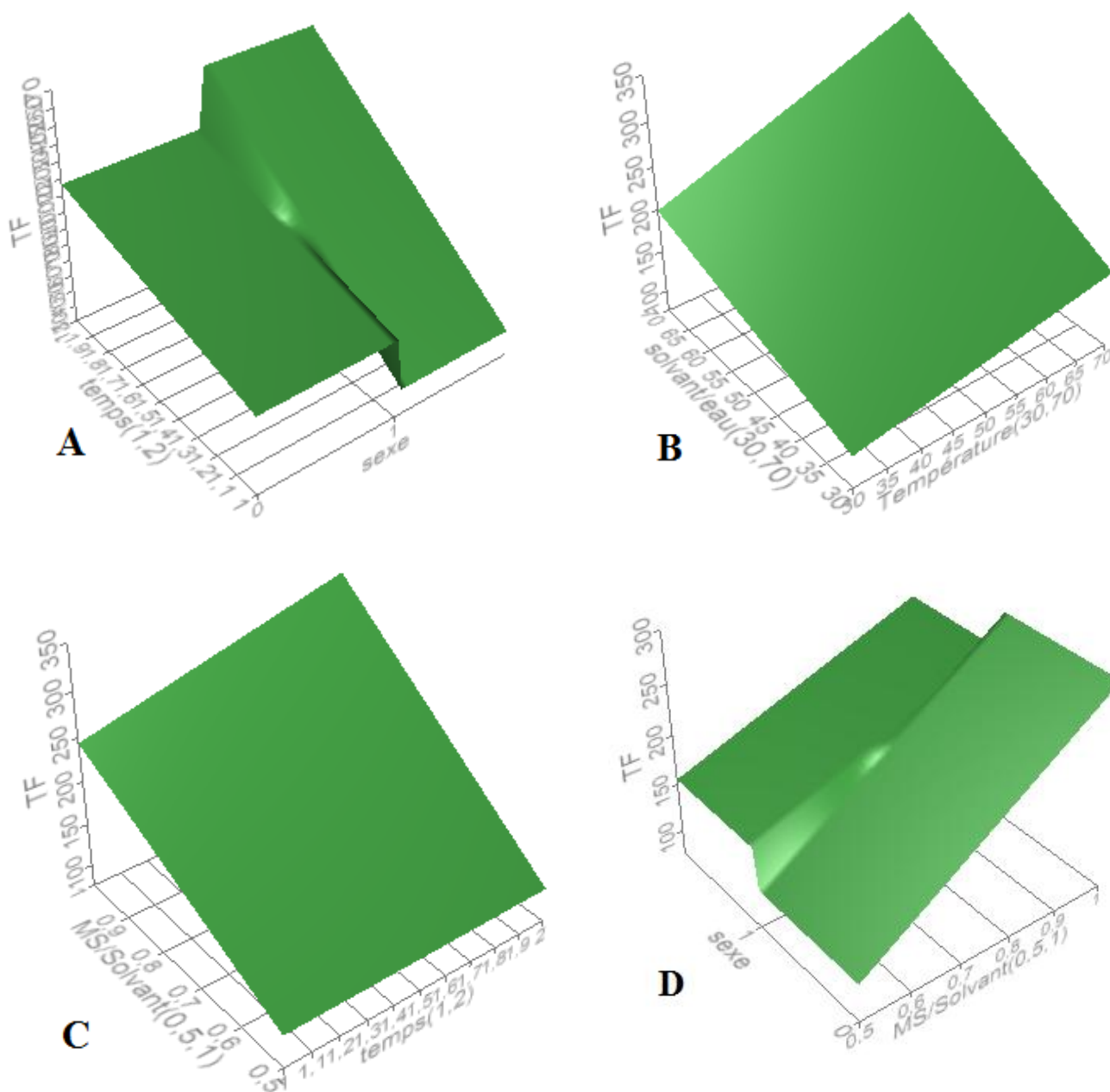


Figure19 : Surface de réponse de la variation de la teneur en flavonoïdes en fonction des conditions d'extraction. (A): le sexe avec le temps, (B) : le rapport solvant/eau avec la température, C: le temps d'extraction avec le rapport Ms/Solvant, D: le sexe avec le rapport Ms/Solvant.

La teneur en flavonoïdes est maximale quand la température est de 70° C et le temps d'extraction est de 2h. De même, le maximum de flavonoïdes a été enregistré dans un milieu d'extraction contenant 70% du méthanol et où le rapport solide/liquide est de 1g/10ml. Les quatre variables : température de macération, temps d'extraction, proportion du méthanol ainsi que le rapport solide/liquide influencent positivement ce paramètre, autrement dit la teneur en flavonoïdes évolue avec l'augmentation des valeurs de ces variables.

Il est à signaler que les variables étudiées (sexe, temps, température, composition du solvant et la concentration du méthanol) exercent des effets très similaires à ceux observées pour les polyphénols totaux.

Une équation de corrélation entre les variables et les réponses s'écrit :

$$Y=198,47-0,76 X_1+37,20 X_2+36,21 X_3+49,47 X_4+63,85 X_5+3,87 X_1X_2-17,20 X_1X_3+1,85 X_2X_3+8,46 X_1X_4+15,43 X_2X_4-0,34 X_3X_4+19,64 X_1X_5+12,73 X_2X_5+18,59 X_3X_5+33,78 X_4X_5.$$

III. Résultats de l'optimisation de l'activité anti-radicalaire (AAR):

L'activité anti-radicalaire a été mesurée en utilisant le radical DPPH. Les résultats trouvés ont été analysés et comparés avec les valeurs prévues (**tab. 13**).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire sont compris entre 38% et 95%. La meilleure activité a été enregistrée avec l'extrait préparé à partir d'une poudre issue d'individu femelle qui a été soumise à une macération à 30°C pendant 60 min et le milieu d'extraction est fait de 70% du méthanol et où le rapport solide/liquide est de 1/10.

Tableau 13: Résultats de l'activité anti-radicalaire.

Essai	Variables indépendants					Taux des flavonoides	
	X1	X2	X3	X4	X5	Mesurés	Prévus
1	F	30	1	70	0.5	62	58.0625
2	F	30	2	70	0.5	73	60.125
3	M	70	2	30	0.5	88	90.0125
4	M	30	2	30	1	88	82.7625
5	M	70	1	70	1	65	71.825
6	F	70	1	70	0.5	64	76.875
7	M	50	1.5	50	0.75	61	68.45
8	F	70	1	30	1	94	88.375
9	F	70	1	70	1	93	95.5625
10	M	30	1	3	0.5	53	54.7625
11	M	30	2	70	1	57	54.075
12	M	70	2	70	0.5	65	69.075
13	F	30	2	30	0.5	78	68.5625
14	M	70	2	70	1	60	49.5125
15	F	30	1	70	1	95	86.875
16	M	30	1	30	1	89	83.325
17	M	50	1.5	50	0.75	66	68.45
18	F	30	1	30	1	87	84.3125
19	F	70	2	30	1	66	62.0625
20	M	30	1	70	0.5	41	43.325
21	M	50	1.5	50	0.75	65	68.45
22	M	30	2	30	0.5	94	89.075
23	M	70	1	70	0.5	71	56.5125
24	F	70	1	30	0.5	76	66.5625
25	M	70	2	30	1	73	73.575
26	F	70	2	70	0.5	72	71.3125
27	F	30	1	30	0.5	38	52.375
28	F	30	2	70	1	39	54.0625
29	F	70	2	30	0.5	66	75.125
30	F	70	2	70	1	60	55.125
31	M	70	1	30	0.5	71	63.325
32	F	30	2	30	1	58	65.625
33	M	30	1	70	1	71	68.7625
34	M	30	2	70	0.5	55	63.5125
35	M	50	1.5	50	0.75	65	68.45
36	M	70	1	30	1	71	81.7625

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

L'analyse du model par ANOVA a montré un effet très hautement significatif vis-à-vis de la réponse activité antioxydante ($p < 0.001$) (**tab. 14**).

Tableau 14: Analyse de la variance pour l'activité anti-radicalaire:

Source	Degré(s) de liberté	Sommes des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	15	5809,800	387,320	3,7293
Résidus	20	2077,2000	103,860	Prob. > F
Total	35	7887,000	491.18	0,0035*

La valeur du (R^2) été à l'ordre de 0,74, ce qui reflète une corrélation forte entre les valeurs prévues et les valeurs observées. Donc notre model a pu expliquer et prédire 74% de nos résultats.

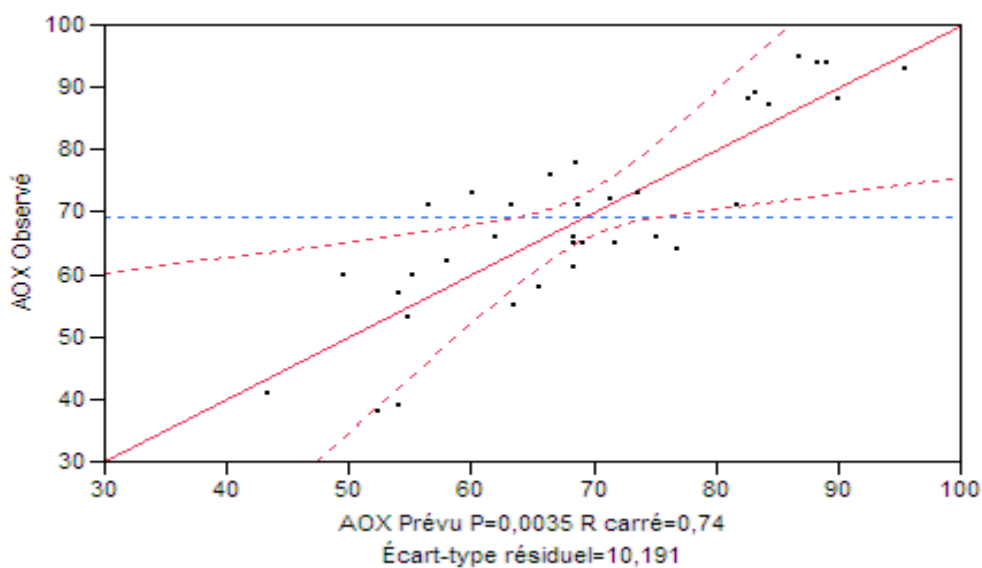


Figure20 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de l'activité anti-radicalaire.

III.2. L'analyse du manque d'ajustement:

Les résultats de l'analyse du manque d'ajustement sont résumés dans le (**tab.15**).

Tableau 15 : Résultats du manque d'ajustement du model pour l'activité anti-radicalaire.

Source	Degré(s) de liberté	Somme des Carrés	Carré moyen	Rapport F
Manque d'ajustement	17	2062,4500	121,321	24,6754
Erreur pure	3	14,7500	4,917	Prob. > F
Erreur totale	20	2077,2000	126.238	0,9981

Les résultats du manque d'ajustement ont été non significatifs ($p=0,99>0,05$). Ils sont en accord avec les résultats de l'analyse par ANOVA.

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

Les résultats de l'analyse de l'influence des variables indépendantes et leur influence sur l'activité antioxydante sont représentés dans le (tab.16).

Tableau 16 : Analyse de régression des résultats obtenus anti-radicalaire:

Variable	Estimation	Ecart type	Rapport t	Prob.> t
Constante	69.25625	1.709112	40.52	<,0.001*
Sexe [M]	-0.80625	1.709112	-0.47	0.6422
Température(30,70)	2.40625	1.801562	1.34	0.1967
Temps(1,2)	-1.53125	1.801562	-0.85	0.4054
Solvant/eau(30,70)	-4.59375	1.801562	-2.55	0.0191*
MS/Solvant (0.5, 1)	3.09375	1.801562	1.72	0.1014
Sexe [M]*Température	-1.40625	1.801562	-0.78	0.4442
Sexe [M]*temps	4.53125	1.801562	2.52	0.0206*
Température*temps	-1.90625	1.801562	-1.06	0.3026
Sexe [M] *solvant/eau	-4.28125	1.801562	-2.38	0.0276*
Température*solvant/eau	1.15625	1.801562	0.64	0.5283
Temps* solvant/eau	-3.53125	1.801562	-1.96	0.0641
Sexe [M] * MS/Solvant	-0.84375	1.801562	-0.47	0.6446
Température* MS/Solvant	-2.53125	1.801562	-1.41	0.1754
Temps* MS/Solvant	-8.71875	1.801562	-4.84	<,0.001*
Solvant/eau* MS/Solvant	-0.78125	1.801562	-0.43	0.6692

Nos résultats font ressortir que le pouvoir anti-radicalaire est très significativement influencé par le facteur linéaire rapport solvant/eau ($p<0.01$). D'autre part l'effet du sexe, de la température, du temps de macération et du rapport solide/liquide est non significatif. De plus, l'activité antioxydante est influencée significativement par la variables de synergie sexe M*temps et sexe M* Ms/solvant.

III. 4. L'optimisation par surface de réponse de l'activité anti-radicalaire

L'interaction entre les différents facteurs étudiés est représentée sous forme des surfaces de réponse dans la (fig. 21).

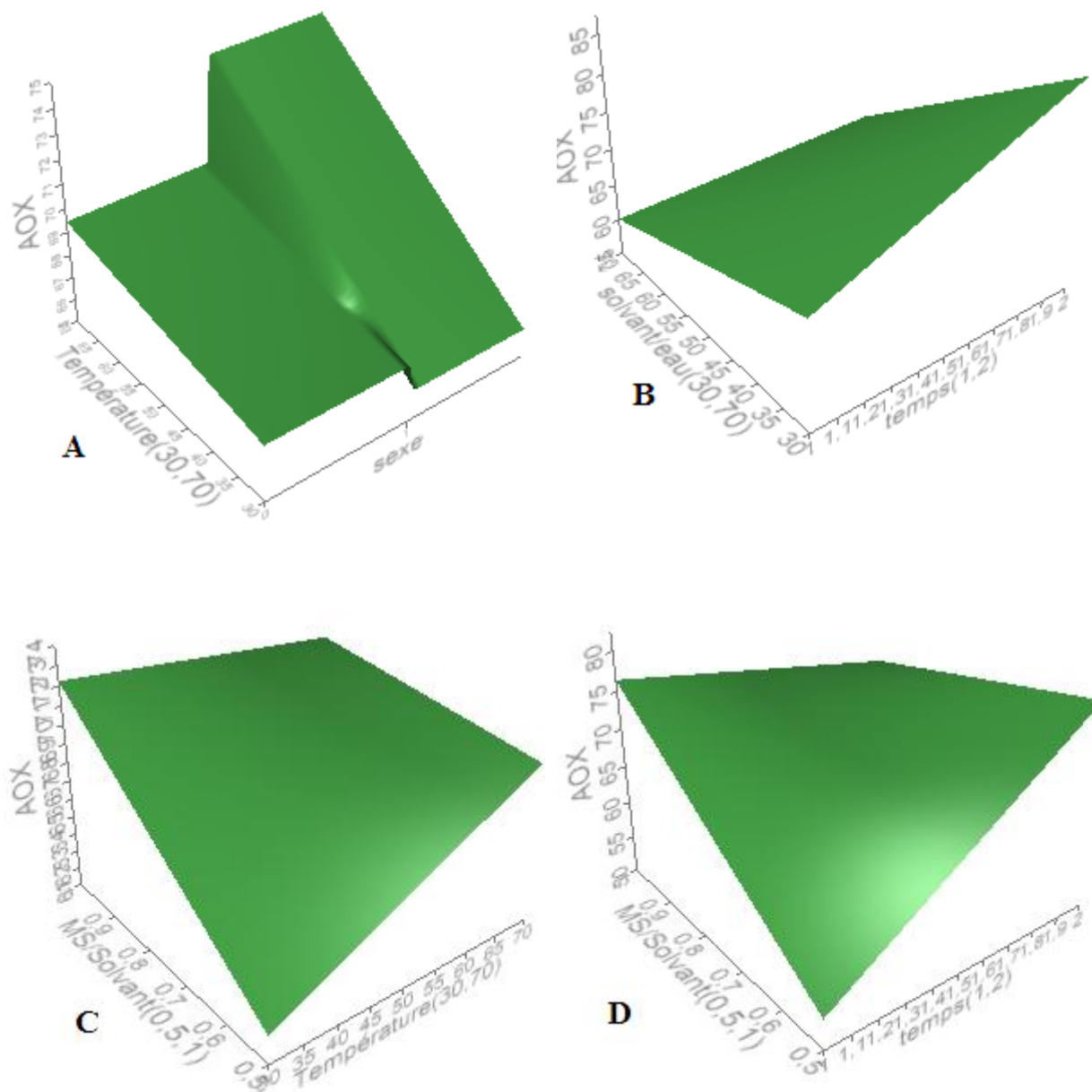


Figure 21 : Surface de réponse de la variation de l'activité antioxydante en fonction des conditions d'extraction. (A): le sexe et la température, (B) : le rapport Mv/Solvant et le temps, C: la température de l'extraction et le rapport solide/liquide, D: le temps de l'extraction et le rapport solide/liquide.

Généralement la capacité antioxydante augmente avec l'augmentation de la teneur en polyphénols. Certains auteurs ont évoqué aussi une augmentation de la capacité antioxydante de certains composés phénoliques lorsque leur teneur dans les extraits augmente (**Gasiorowski et al., 1997, Aehle et al., 2004**).

Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire. Des températures élevées au cours de l'extraction ou du séchage affectent la stabilité de certains composés phénoliques en raison de réactions impliquant des dégradations chimique et enzymatique, ou une décomposition thermique. **Larrauri et al., (1997)** ont constaté que la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols.

Plusieurs chercheurs (**Nazck et Shahidi, 2004 ; Nazck et Shahidi, 2006 ; Chirinos et al., 2007 ; Drużyńska et al., 2007**) ont attiré l'attention à la possibilité de l'oxydation des composés phénoliques si le temps d'extraction est long.

L'équation du second degré du model résume les différents effets des variables indépendantes sur l'activité antioxydante :

$$Y=69,25-0,80 X_1+2,40 X_2-1,53 X_3-4,59 X_4+3,09 X_5-1,40 X_1X_2+4,53 X_1X_3-1,90 X_2X_3-4,28 X_1X_4+1,15 X_2X_4-3,53 X_3X_4-0,84 X_1X_5-2,53 X_2X_5-8,71 X_3X_5-0,78 X_4X_5.$$

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 technique classique d'optimisation sont couteuses, lentes et les résultats qui ne sont pas toujours reproductible. Dans ces dernière années les méthodes statistiques sont de plus en plus utilisées vue leur rapidité, précision et l'économie du matériel.

Ce travail de thèse visait l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à activité antioxydante à partir des feuilles de *Juniperus thurifer* par la méthode des plans d'expérience.

L'influence et les interactions entre cinq facteurs indépendants à savoir le sexe de l'arbre, la température, le temps de macération, le rapport solide/liquide, et le rapport méthanol/eau a été étudiée sur trois réponses: le taux des PPT, la teneur en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire.

Les résultats ont montré que le model utilisé est ajusté à nos réponses. 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.

Les résultats de la présente étude montrent que le rendement d'extraction des PPT est significativement influencé par les variables: température, rapport solvant/eau et le sexe de la plante. Les facteurs température, temps, rapport solvant/eau et rapport solide/liquide exercent une influence significative sur la teneur en flavonoïdes. Quant au pouvoir anti-radicalaire, la proportion du méthanol dans le milieu d'extraction semble être le facteur le plus influant ($p < 0.01$).

Dans cette étude, les extraits des feuilles des individus femelles ont été les plus riches en polyphénols, en flavonoïdes et par conséquent possédant le pouvoir de réduction du radical libre DPPH le plus remarquable par rapport à ceux obtenus pour les individus mâles.

Il est à signaler que si la température de l'extraction et la prolongation du temps d'extraction ont eu une influence positive sur l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes

en augmentant le pouvoir d'extraction du solvant, ces deux facteurs semblent avoir un effet inverse sur l'activité antioxydante, cela peut être justifié par le fait que la température excessive au cours de l'extraction affecte la stabilité de certains composés phénoliques ce qui peut provoquer leur dénaturation, il en résulte une diminution du pouvoir anti-radicalaire.

Les effets des principaux paramètres du procédé (sexe, temps, température, composition du solvant et la concentration du méthanol) sur la teneur en flavonoïdes sont très similaires à ceux observées pour les polyphénols totaux. Les extraits les plus riches en polyphénols sont ceux présentant une teneur en flavonoïdes importante.

L'utilisation de la méthode de surface de réponse pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols a montré son efficacité, l'économie (temps et matériels), sa reproductibilité et sa précision. Cette dernière est devenue l'alternative des méthodes d'optimisation classiques. Les plans d'expérience fournissent le maximum d'information avec le minimum d'expériences.

D'autres paramètres qui ne sont pas étudiés dans ce travail et qui ont une influence sur le rendement d'extraction, peuvent servir de perspectives pour optimiser au mieux l'extraction en vue de son utilisation à l'échelle industrielle.

Liste des référence:

- Adams W K, Reid S, LeMaster R, Perkins K K, Dubson M & Wieman C E., (2008).** A study of educational simulations: Part I - engagement and learning. *Journal of Interactive Learning Research*, Vol.19 (3).p:397-419.
- Aehle E, Raynaud-Le Grandic S, Ralainirina R, Baltora-Rosset S, Mesnard F, Prouillet C, Mazière J.C & Fliniaux M. A., (2004).** Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chemistry*, Vol. 86.p:579–585.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M, (2012).** "Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance". *Plant Sci.* Vol. 196. p: 67– 76.
- Akroum S., (2010).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat de l'université Mentouri de Constantine:10
- AL-Farsi M A and Lee C Y., (2008).** Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds; *Journal of Food Chemistry*, Vol.108.p: 977-985.
- Alillou H., (2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (*Schousb.*) *Greuter* et *Asteriscus imbricatus*(Cav) DC. Thèse de Doctorat en sciences. Université Ibn Zohr. Agadir, Maroc. 215p.
- Athamena S., (2009).** Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique, mémoire magister, université el-hadj lakhdar-batna . p: 12.
- Bahorun T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, Vasseur J, Cazin M, Cazin C and Pinkas M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations *Arzneimittel-Forschung*, 46(11).p: 1086-1089.

- Bas D and Boyaci I H., (2007).**Modelling and optimization II: comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*, February, Vol. 78, no. 3.p: 846-854.
- Beckman C H., (2000).**Phenolic-storing cells:Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol.Mol.Plant Pathol.*57.p:101-110.
- Benaissa O., (2011).**Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. P63.
- Benariba N, Djaziri R W, Belkacem N , Kadiata M, Malaisse W J and Sener A ., (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* Vol. 3(1).p:35–40.
- Bonilla F, Mayen M, Merida J and Medina M., (1999).**Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, Vol. 66.p: 209-215.
- Bravo L., (1998).** "Polyphénols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, Vol. 56(11). p: 317-333.
- Bruneton J., (1999).** *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed* Techniques et documentations. Paris. p: 227-233.
- Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M. &Velic D., (2007).**Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, Vol., 81.p:236-242.
- Bucic-Kojic A , Planinic M , Tomas S , Bilic M and Velic D., (2007).**Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of food Engineering*, Vol. 81.p: 236-242.

- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R and Larondelle Y., (2007).** Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers; Journal of Separation and Purification Technology, Vol. 55. p: 217-225.
- Cowan M M., (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Review, vol. 12. p: 564-582.
- Cristina P, Ilonka S, Bartosz T., (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel. p: 1313-8871.
- Crozier G., (2003).** Researching black parents: making sense of the role of research and the researcher. Qualitative research, 3. p: 79-94.
- Dai J et Mumper R J., (2010).** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules, Vol. 15 (10). p: 7313-52.
- Dibert K. and Cros E., (1989).** Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: kinetic data. Journal of Food Engineering, Vol. 10(3). p: 199-214.
- Druzynska B, Stepniewska A and Wolosak R., (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts; Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., Vol. 6. p 27-36.
- 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, vol. 540. p: 1-18.
- Emerenciano M G, Wasielesky, W J, Soares, R B., Ballester, E C., Izeppi, E. M, & Cavalli, R. O., (2007).** Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 29(1). pp 1-7.
- Ford R A; Hawkins D R; Mayo B C; Api A M., (2001)** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. Food and Chemical Toxicology. 39 p :153-162.

- Gasiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kolaczynska B, Jankowiak Włodarczyk M & Oszmianski J.,(1997).** Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aroniamelanocarpa* fruits. *Cancer Letters*, Vol. 119. p: 37-46.
- Gauquelin T, Idrissihassani M E Tlebreton P H., (1988).**le *Génévrier thurifère (juniperus thurifera* L. (cupressacées):analyse systématiques.Oecologia méditerranéa XIV3(4).p:31-42.
- Ghestem A, Seguin E, Paris M, Orecchioni AM., (2001).**Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie. Tec et Doc (Ed). p: 272.
- Gilbert B. L., Norris D. M., (1968).**Achemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees.*J Insectphysiol.* Vol. (14).p: 1063-1068.
- Gilbert B L., Norris D M., (1968).**Achemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees.*J Insect physiol.* Vol. (14).p: 1063-1068.
- Harbourne N, Jacquier J C. & O’Riordan D., (2009).**Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) for incorporation into beverages. *Food Chemistry*, Vol. 116:722-729.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ., (2002).**Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J NutrBiochem.*; Vol. 13(10).p:572-584.
- Innocenti M, Gallori S, Giaccherini C, Leri F, Vincieri F F and Mulinacci N., (2005).** Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L.*J.Agric Food Chem.*, Vol. 53.p: 6497-6502.
- Kalemba D, Kunicka A., (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 10.p: 813-829.
- Kamali F P, Linden A, Meuwissen M, Malafia G C Lnsink O, Imke J. MdeBoev., (2016).**Environmental and economic performance of beef farming systems with different feeding strategies in southern Brazil, Vol .146. p : 70-79.

- Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., (2006).**Inhibition of ruminalmethanogenesis by tropical plants containing secondary compounds.International CongressSeries. Vol. (1293). p: 156–163.
- Karaali A, Boyacioğlu D, Günez G and Özçelik B., (2004)** Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university.Turkey.
- Kebbab., (2014).**Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété *Chamlal*:Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation.En vue de l'obtention du Diplôme de Magister. p7.
- Kim J.-M, Chang S.-M, Kim I.-H., Kim Y.-E, Hwang J.-H, Kim K.-S and Kim W.-S.; (2007).** Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from mulberry leaves; *Biochemical Engineering Journal*, vol. 37: 271-278.
- Larrauri J. A., Ruperez P. and Saura-Calixto F., (1997).**Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44.p: 1390-1393.
- Larrauri J A, Sanchez-Moreno C & Saura-Calixto F., (1998).**Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46.p:2694-2697.
- Legrand G., (2015)** Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée:approches biochimique et moléculaire thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'université de Lille 1
- Leinmuller E, Steingass H, MenkeKh., (1991).** Tannins in feeds for ruminants. II Effects on rumen metabolism in vitro. *ÜbersichtenzurTierernährung*.Vol. (19).p:45–70.
- Leybros J. et Frémeaux P., (1990).** Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*.p :1-21.

- Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses.
- Macheix J. J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P., (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier Paris,p:1-28.
- Maire R., (1967).** La flore de l'Afrique du Nord. Encyclopédie biologique, Vol 12-13, Paris.
- Rameau., Mansion D., Gérard Dumé., (2008).** Flore forestière française guide écologique illustré région méditerranéenne. 317P.
- Malešev D. et Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the
- Mao K., Hao G., Liu J., Adams R. P., Milne R. I., (2010).** Diversification and biogeography of Juniperus (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. New Phytologist, Vol. 188, (11),p : 254-272.
- Martin S, Andriantsitohaina R., (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. Issue.6. Vol.51.p:304-315.
- Montés., (1999).** Potentialité, dynamique et gestion d'une formation arborée à *genévrierthurifère* (L) des atlas marocains.
- Montgomery, D. C. (2001),** *Design and Analysis of Experiments* (5th ed.) New York: John Wiley and Sons, Journal of Statistics Education Vol:10, Nbr 1.
- Mutlib A E., Abbott F S., (1992).** Isolation and characterization of carbinolamide and phenolic glucuronide conjugates of (+-)-N-methyl-N-(1-methyl-3, 3-diphenylpropyl) formamide and Nformylmethamphetamine by FAB/MS, LC/MS/MS, and NMR. Drug Metabolism and Disposition, Vol. 20(3). p: 451-460.
- Naczka M and Shahidi F., (2004).** Extraction and Analysis of Phenolics in Food. Journal of Chromatography, Vol. 1054.p:95-111.

- Nazck M. and Shahidi F., (2006).**Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 41. p: 1523-1542.
- Nićiforović N. & Amarović H., (2014).**Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 13.p: 34-51.
- Nićiforović N. and Amarović H., (2014).**Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 13.p: 34-51.
- Nicolas Montes., (2007).**Potentailites, dynamique et gestion d'une formation Arborée *genévrier thurifere (Juniperus.ThuriferaL.)* des atlas marocains: le cas de la vallée de l'Azzaden.Thèse de Doctorat de Université Toulouse le Mirail Spécialité Géographie - Aménagement .p4.
- Penchev P, Angelov G & Condoret J S., (2010).** Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis L.*). Revue de génie industriel, Vol. 5. p: 115-123.
- Peronny S., (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (Lemure Catta). Thèse de doctorat en éco-ethologie, Muséum national d'histoire naturelle, France. 22 p.
- Pinelo M., Del Fabbro P., Marzocco L., Nunez M.J. & Vicoli M.C., (2005).**Optimisation of continuous phenol extraction from *Vitisvinifera* By-products. Food Chemistry, Vol. 92.p:109-117.
- Piquemal G., (2008).** Les flavonoïdes (en ligne): http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166 &Item. p: 215.
- Pouss et JL., (1989).** Plantes médicinales africaines. Edition Ellipses. Paris : A.C.C.T ; 156p.
- Quezel P., Gast M., (1998).** « *Genévrier* », in Encyclopédie berbère, 20 Gauda – Girrei, Aixen-Provence, Ed. isud .Vol . 20.p : 3016-3023.

- 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*, Vol.50. (2).p167–176.
- Rameau J C, Mansion D, Dumé G et Gauberville C.,(2008).** *Flore forestière française, guide écologique illustré. Tome 3 : région méditerranéenne.* Institut pour le développement forestier, Paris, 2426 p.
- Richter G., (1993).** Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire, Romandes. Suisse.526 p.
- Saikia B S,Jeffers S V.Petit P,Marsden S, Morin J, Folsom C P., (2015).** Variable magnetic field geometry of the young sun HN Pegasi (HD 206860) *Astronomy & Astrophysics*, Vol 573, id.A17, 16 p
- Sari M., Biondi D. M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G., (2006).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 21.p: 890-898.
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. p : 02-11.
- Shahidi F. and Naczki M., (2004)** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, vol. (1054). p: 95-111.
- Sheabar F. Z. and Neeman I., (1988).** Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 65.p: 990-993.
- Silva E. M., Rogez H. and Larondelle Y.:(2007).** Optimisation of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology; *Journal of Separation and Purification Technology*, Vol. 55. p: 381-387.
- Sparreskilsson C. and Björklund E., (2000).** Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, Vol. 49.p: 415-420.

- Spigno G., Trarneli L. and De Favari D. M., (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics; Journal of Food Engineering, Vol. 81.p: 200-208.
- Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.-O. and Dommes J.; (2007).** Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage; Journal of Food Chemistry, Vol. 105, pp 1268-1275.
- Telli M, Guiral E, Martínez J A et al., (2010).** Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. FEMS Microbiol Lett. 306p:117-121.
- Temagoult O., (1988)** Inventaire et répartition du *Genévrier thurifère (Juniperus thurifera L.)*. Memoire Ing. I.N.E.S Agronomie, BATNA. 61 p.
- 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., Vol. 7 p: 140-146.
- Tugwell S. and Branch G.M., (1989).** Differential polyphenolic distribution among tissues in the kelps *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallid* and *Macrocystis angustifolia* in relation to plant defence theory. J. Exp. Mar. Bio. Ecol., 129.p:219-230.
- Vanhaelen M., Vanhaelen Fasté R., (1980).** High performance liquid gas and thin layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. Journal of chromatography. Vol. 187.p: 255-26.
- Vela E, Schafer P.A., (2013).** Typification de *Juniperus thurifera* var. *africana* Maire, délimitation taxonomique et conséquences nomenclaturales sur le *Genévrier thurifère* d'Algérie. *Ecologia mediterranea* 39(1).p: 69-80.

- W Erdman J, Balentine J D, Arab L, Beecher G, Dwyer J T, Folts J, Harnly, Hollman J P, L –Keen C., Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G and Burrowes J., (2007).** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Ntr., Vol. 137 no. 3.p:718S-737S.
- Wang L. and Weller CL., (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology.Vol. 17.p : 300-312.
- Wang Y & Ho CT., (2009).** Phenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress.Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 57.p: 8109-8114.
- Wang Y and Ho C-T., (2009).** Phenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 57.p: 8109-8114.
- Win M., (1997).** Compartmentation of secondary secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles.Adv.Bot.Res., 25.p: 141-169.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK., (1995).**HerpesvirusSaimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor,Vol. 3(6) .p:811-21.
- Yilmaz Y & Toledo R T., (2006).**Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industrybyproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. Journal ofFood Composition and Analysis, Vol. 19.p:41-44.
- Zeraib A, Ramdani M, Boudjedjou L, Chalard P, Figuredo G., (2014).**Characterization andChemosystematic of Algerian *Juniperusthurifera*L. Journal of Applied Botany and Food Quality, Vol. 87. P: 249-255.

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'optimiser l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes à activité antioxydants à partir des feuilles de *Juniperus thurifera*. L'optimisation est réalisée en utilisant le plan factoriel complet (PFC) en prenant en considération quatre facteurs quantitatifs ; température, temps, rapport solide/liquide, et rapport méthanol/eau, et un facteur qualitatif : le sexe de l'arbre. Le taux des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), la teneur en flavonoïdes ($AlCl_3$), ainsi que le pouvoir anti-radicalaire (DPPH) ont été évalués pour chaque extrait. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les trois réponses ($p > 0,05$) et R^2 [0.70-0,93]. 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. Les résultats trouvés ont été très proches des résultats prévus par le modèle.

Mots-Clés: Optimisation, *Juniperus thurifera*, Extraction, Plan d'expérience, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité anti-radicalaire.

Abstract:

The objective of our work is to optimize the extraction of polyphenols and flavonoids with antioxidant activity from the leaves of *Juniperus thurifera*. The optimization is carried out using the full factor design (FFD) taking into consideration four quantitative factors; Temperature, time, solid / liquid ratio, methanol / water ratio, and one qualitative factor: the sex of the tree. The total polyphenol content (by the Folin-Ciocalteu method), flavonoid content ($AlCl_3$), and anti-free radical (DPPH) were evaluated for each extract. Les résultats ont montré que le modèle est bien ajusté avec les trois réponses ($p > 0,05$) and R^2 [0.70-0,93]. The establishment of the quadratic polynomial equations and the response surface curves allowed us to study the influence of each factor on the extraction of polyphenols, as well as the interaction between the various factors. The results obtained were very close to the results predicted by the model.

Keywords: Optimization, *Juniperus thurifera*, Extraction, Experimental design, Polyphenols, Flavonoids, Anti-free radical activity.

المخلص:

الهدف من عملنا هو تحسين استخراج مادة البوليفينول ومركبات الفلافونويد ذات النشاط المضاد للأكسدة من أوراق *Juniperus thurifera* ، مع الأخذ بعين الاعتبار العوامل الأربعة (الكمية، درجة الحرارة، الوقت، نسبة الصلب/السائل، نسبة الميثانول/الماء، والعامل النوعي : جنس النبتة). تم تقييم معدل إجمالي الفلافونويدات ومتعدد الفينول لكل عينة. وقد أظهرت النتائج أن النموذج يناسب بشكل جيد مع ثلاثة استجابات ($R^2 = 0.70-0.93$) و $p > 0,05$. إنشاء المعادلات متعددة الحدود من الدرجة الثانية و منحنيات استجابة السطوح سمح لنا بدراسة تأثير كل عامل على استخراج مادة البوليفينول . والتداخل بين هذه العوامل المختلفة تم العثور على نتائج قريبة جدا من النتائج التي تنبأ بها النموذج.

الكلمات المفتاحية: تحسين، *Juniperus thurifera* ، استخلاص، التصميم التجريبي، البوليفينول، مركبات الفلافونويد، نشاط مضاد للأكسدة.