

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Réf :.....

Mémoire

Présenté par

AIT AHMED Tifina & MAOUCHÉ Faouzi

Pour l'obtention du diplôme de

Master Académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et la détermination de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Crataegus monogyna*.

Soutenu le : **07/07/2025**

Devant le Jury composé de

Nom et Prénom

Grade

Qualité

Mme LAIB Yasmina

MAA

Présidente

Mr NABET Nacim

MCA

Encadrant

Mme BOUDJOU Souhila

MCB

Examinateuse

Année Universitaire 2024/2025

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu, pour la force qu'il nous a donné quand nous étions à bout, pour la patience dans les moments d'incertitude, et pour la paix qu'il a déposé dans nos cœurs quand tout semblait flou. Sans lui, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons à remercier **Monsieur NABET Nacim**, notre encadrant, pour sa disponibilité, sa patience et la clarté de ses conseils. Son accompagnement constant et sa rigueur bienveillante ont été d'un grand soutien tout au long de ce travail. Grâce à lui, nous avons pu avancer avec confiance et méthode. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nos sincères remerciements à **Mme LAIB Yasmina**, qui a nous a fait l'honneur de présider ce comité d'évaluation, ainsi que **Mme BOUDJOU Souhila**, qui nous a fait l'honneur d'évaluer attentivement ce travail.

Nous exprimons également notre gratitude à **Mr ARROUL Younes** pour son aide concrète, sa présence et son soutien.

Nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance envers **Mme OUATAH** et tous les ingénieurs du laboratoire de la faculté SNV pour leur amabilité et leur patience exceptionnelles.

Nos remerciements vont aussi à **Monsieur NOURI Hamid**, ainsi qu'à tous les enseignants et personnels de la Faculté SNV de Béjaïa. Chacun, à sa manière, a contribué à la réalisation de ce mémoire.

Que Dieu bénisse chaque personne qui, d'une façon ou d'une autre, a été un soutien sur ce chemin.

Dédicace :

Je dédie ce travail :

À ma mère, pour son cœur immense, ses sacrifices silencieux et son amour qui ne connaît ni limite ni condition.

À mon père, pour sa force tranquille et la confiance qu'il m'a toujours inspirée.

À mes frères, **Achour** et **Ali**, compagnons de route fidèles, pour leur soutien, leur tendresse et leur présence rassurante.

À ceux qui m'ont tendu la main avec sincérité, dans l'ombre ou la lumière.

À mon ami, **KASIRYE Muhammad Ali** dont la bonté et la patience ont été un réel appui.

À mon binôme, **MAOUCHÉ Faouzi** pour sa complicité, son engagement, son sérieux, son esprit d'équipe et pour sa bonne humeur qui ont marqué notre travail commun.

À tous mes enseignants et camarades, du primaire à l'université, avec qui j'ai grandi, appris et partagé de précieux souvenirs.

À toutes les prières portées pour moi, parfois sans que je le sache.

À cette paix intérieure venue quand j'en avais le plus besoin.

À cette main invisible qui a ouvert les bonnes portes au bon moment.

À chaque souffle d'espérance qui m'a permis d'aller plus loin.

Et à moi-même, pour avoir avancé avec foi et persévérance.

AIT AHMED Tifina

Dédicace :

Après de longues années de labeur et de défis surmontés, c'est empreint d'une fierté profonde que je choisis de dédier ce travail,

À mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience infinie et leurs sacrifices silencieux, sans lesquels rien de tout cela n'aurait été possible.

À mes sœurs **Nabila** et **Saliha**, pour leur tendresse, leur écoute et leur soutien constant.
À mon frère **Layachi**, pour sa présence rassurante et ses encouragements.

À mes nièces adorées **Nour El houda**, **Nour El imane** et **Maria Ilyna**, et à mes neveux **Sabar** et **Amir**, qui illuminent ma vie de leur innocence et de leur joie.

À ma binôme **AIT AHMED Tifina**, avec qui j'ai partagé cette belle aventure scientifique. Merci pour ton implication, ta persévérance et ton esprit de collaboration qui ont grandement contribué à la réussite de ce travail.

À mes chères amies, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, et à tous ceux qui, de près ou de loin, ont veillé à l'aboutissement de ce mémoire.

À toute la promotion BM 2024/2025, pour les moments de solidarité, de travail et de camaraderie vécus ensemble.

Enfin, à tous mes enseignants, je tiens à exprimer ma profonde gratitude. Grâce à votre dévouement, votre patience et votre passion, vous avez su éveiller en moi le goût du savoir et de l'effort. Vous avez été bien plus que de simples éducateurs : vous avez été des guides, des repères, des modèles.

Merci d'avoir façonné mon parcours avec autant de générosité.

MAOUCHÉ Faouzi

Table des matières

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	11

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur *Crataegus monogyna* et activités biologiques

1. Présentation de <i>Crataegus monogyna</i>	3
1.1. Noms communs	3
1.2. Description botanique selon Fichtner et Wissemann, (2021)	3
1.3. Classification botanique.....	4
1.4. Origine de <i>Crataegus monogyna</i>	5
1.5. Exigences climatiques.....	5
1.6. Propriétés thérapeutiques	5
1.7. Utilisations alimentaires.....	6
1.8. Toxicité	6
1.9. Composition biochimique.....	7
1.9.1. Composition en métabolites primaires et autres	7
1.9.2. Composition en métabolites secondaires	9
2. Activité antioxydante	11
3. Activité antimicrobienne.....	12
3.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	12
3.1.1. Méthodes de diffusion sur gélose	12
3.1.2. Méthode de microdilution sur milieu liquide.....	13

3.1.3. Étude de la perméabilité membranaire	13
3.2. Spectre d'action des composés phénoliques	13

Chapitre II : Extraction assistée par ultrasons

1.Définition des bains à ultrasons	14
2. Principe de l'extraction des composés phénoliques par bain à ultrasons	14
3. Paramètres influençant l'extraction des composés phénoliques.....	15
3.1. Paramètres physiques.....	15
3. 2. Paramètres chimiques	16
3.3. Paramètres opérationnels	16
4. Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrasons	16
5. Applications des bains à ultrasons	17

Chapitre III : Matériel et méthodes

1.Matériel végétal	18
1.1.Récolte	18
1.2. Lavage et séchage	18
1.3. Broyage et tamisage.....	19
2. Analyses phyto-chimiques	19
2.1. Détermination de l'humidité.....	19
2.2. Détermination du taux de cendres	19
2.3. Dosage des caroténoïdes	20
3. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques	21
3.1. Optimisation séquentielle	21
3. 1.1.Variation du temps d'extraction	21
3.1.2.Variation de la température.....	21
3.2. Optimisation avec un plan d'expérience.....	22
3.2.1. Modèle expérimental	22

3.3. Extraction des composés phénoliques par ultrasons	23
3.3.1. Principe	23
3.3.2. Protocole expérimental	23
3.4. Dosage des polyphénols totaux.....	24
3.4.1. Principe	24
3.4.2. Protocole expérimental	24
4.Détermination de l'activité antioxydante	25
4.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH	25
4.1.1. Principe	25
4.1.2. Protocole expérimental	26
4.2. Test de piégeage des radicaux cationiques ABTS ⁺	26
4.2.1. Principe	26
4.2.2. Protocole expérimental	27
5. Détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut de <i>C. monogyna</i>	27
5.1. Préparation des cultures microbiennes fraîches (Revivification)	28
5.2. Standardisation de l'inoculum	28
5.3. Détermination des diamètres de zone d'inhibition par la méthode des trous	29
6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	30
6.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	30
6.2. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide	31

Chapitre IV : Résultats et discussion

1.Taux d'humidité.....	32
2. Taux de cendres	33
3. Teneur en caroténoïdes	34
4. Optimisation des extraits de <i>C. monogyna</i> par ultrasons.....	35
4.1. Optimisation séquentielle	35

4.1.1. Optimisation du temps d'extraction.....	35
4.1.2.Optimisation de la température d'extraction	36
5. Optimisation des extraits de <i>C. monogyna</i> par le plan d'expérience	37
5.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>C. monogyna</i>	38
5. 2.Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de <i>C.monogyna</i>	41
5.3. Optimisation de la capacité antioxydante équivalente Trolox (TEAC) de <i>C. monogyna</i>	42
5.4. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de <i>Crataegusmonogyna</i>	44
6. Activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut de <i>C. monogyna</i>	45
6.1. Diamètres des zones d'inhibition.....	45
6.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	48
6.3.Effet bactériostatique ou bactéricide.....	49
Conclusion	50
Références bibliographiques	52

Liste des figures

Figure 1: Présentation de l'espèce <i>C. monogyna</i> : fleurs, fruits feuilles et arbre	3
Figure 2: Structures chimiques des : (a) proanthocyanidines, b) : les Acide triterpénique, (c) acides phénoliques représentatifs (d) flavonoïdes de <i>C. monogyna</i>	10
Figure 3 : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une cellule végétale	15
Figure 4: Feuilles de <i>Crataegus monogyna</i>	18
Figure 5: Bain à ultrasons utilisé pour l'extraction des composés phénoliques	24
Figure 6: Forme radicalaire et réduite du DPPH.....	25
Figure 7: Distribution des concentrations préparées et de l'inoculum au niveau de la microplaqué.....	31
Figure 8: Teneur en humidité de <i>C. monogyna</i>	32
Figure 9: Teneur en cendres de <i>C. monogyna</i>	33
Figure 10: Teneur en caroténoïdes de <i>C. monogyna</i>	34
Figure 11: Effet du temps d'extraction sur la teneur en composés phénoliques	35
Figure 12 : Effet de la température d'extraction sur la teneur en composés phénoliques	36
Figure 13 : Diagramme de Pareto des polyphénols de <i>C. monogyna</i>	39
Figure 14: Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	41
Figure 15: Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	43
Figure 16: Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets de temps et de température sur la désirabilité de l'extrait de <i>C. monogyna</i> obtenu par extraction assistée par ultrason.....	45
Figure 17: Concentrations minimales inhibitrices de l'extraits de <i>C. monogyna</i> à l'égard de <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. albicans</i>	48
Figure 18: Evaluation de l'effet bactériostatique et fongistatique de l'extrait de <i>C. monogyna</i>	49

Liste des tableaux

Tableau I: Teneurs en vitamines chez <i>C. monogyna</i>	7
Tableau II : Teneurs en glucides chez <i>Crataegus monogyna</i>	8
Tableau III: Teneurs en minéraux chez <i>Crataegus monogyna</i>	8
Tableau IV: Plan d'expérience utilisé pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de <i>Crataegus monogyna</i>	22
Tableau V: Plan d'expérience et résultats des réponses étudiées pour les extraits de <i>C. monogyna</i> obtenus par ultrason.	38
Tableau VI: Comparaison des valeurs expérimentales et prédictives des réponses optimisées des extraits de <i>C.monogyna</i>	44
Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition (DZI) en mm de l'extrait de <i>C. monogyna</i> sur les souches testées.....	46
Tableau VIII: Résultats des concentrations minimales inhibitrices obtenues.....	48

Liste des abréviations

ABTS•+ : Acide 2, 2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique),
ADN : Acide désoxyribonucléique,
ATCC : American type culture collection,
CMI : Concentration minimale d'inhibition,
DMSO : Diméthylsulfoxyde,
DO : Densité optique,
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle,
EAG : Equivalent d'acide gallique,
EQ : Equivalent de la quercitine,
ERO : Espèces réactives de l'oxygène,
ET : Equivalent de Trolox,
EtOH : Ethanol,
IC50 : Concentration inhibitrice à 50%,
KHz : Kilohertz,
KOH : Hydroxyde de potassium,
LDL : Low density lipoprotein,
Mmol : Millimoles,
MS : Matière sèche,
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure,
nm : Nanomètre,
ppm : Partie par million.
rpm : Rotation par minute.
SM : Solution mère.
TPT : Teneurs en polyphénols totaux.
Trolox : Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylique.
UV-Vis : Ultraviolet-Visible.
µg: Microgramme.
µl: Micro litre.

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des siècles, les plantes jouent un rôle essentiel dans la santé humaine, que ce soit pour prévenir ou soigner diverses maladies. Elles sont à l'origine de nombreux principes actifs utilisés aujourd'hui dans la médecine moderne (**Gourguillon et al., 2016**). Environ un quart des médicaments prescrits sont issus de plantes médicinales. Parmi eux, on retrouve la morphine, issue du *Papaver somniferum*, et la quinine, extraite du *Cinchona officinalis*, deux exemples majeurs de principes actifs végétaux toujours utilisés en thérapeutique (**Djahra, 2014 ; Newman et Cragg, 2020**). L'intérêt pour les traitements naturels ne cesse d'augmenter, notamment avec la recherche croissante de produits plus sains et plus respectueux de l'environnement (**Mathé, 2015**).

Les composés phénoliques comme les flavonoïdes et les tanins présents dans les plantes médicinales ont la capacité de lutter contre le stress oxydatif, un phénomène causé par les radicaux libres, responsables de divers dégâts cellulaires et liés à de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires ou encore certaines affections neurodégénératives (**Chanwitheesuk et al., 2005 ; He et Giusti, 2010**).

Par ailleurs, les composés phénoliques sont aussi reconnus pour leur action antimicrobienne. Face au développement de résistance des microorganismes aux antibiotiques et aux effets indésirables des antioxydants de synthèse, les substances naturelles représentent une alternative de plus en plus envisagée (**Joshi et Pawar, 2015**).

Les substances naturelles sont aujourd'hui très recherchées dans des domaines variés comme la pharmacie, la cosmétique ou encore l'agroalimentaire, mais pour pouvoir les exploiter efficacement, il faut d'abord les extraire.

Les méthodes traditionnelles d'extraction comme la macération ou l'extraction par Soxhlet, bien qu'efficaces, présentent plusieurs inconvénients : elles sont longues, nécessitent beaucoup de solvant et sont peu écologiques (**Pradal et al., 2016**). C'est

Introduction

pourquoi des techniques plus modernes, dites "vertes", comme l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par microondes, l'extraction sous pression (PLE) sont de plus en plus utilisées, car elles permettent d'obtenir un bon rendement tout en consommant moins d'énergie et de solvant (**Azmir et al., 2013**).

L'Algérie, comme beaucoup de pays africains, possède une biodiversité végétale très riche. On y recense plusieurs milliers d'espèces aux propriétés médicinales, dont certaines restent encore peu étudiées sur le plan scientifique (**Aberkane, 2006 ; Bouzid, 2009**). Parmi ces plantes, l'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna*), un arbuste appartenant à la famille des Rosaceae, attire particulièrement l'attention. Très répandue dans le pays, elle est connue en phytothérapie pour ses effets bénéfiques sur la santé ainsi que pour ses propriétés antioxydante et antimicrobienne (**Bahorun et al., 1994 ; Bahorun, 1997**).

C'est dans cette optique que rentre notre étude, qui vise en premier lieu à réaliser une étude préliminaire (optimisation séquentielle) de deux variables indépendantes (température et temps d'extraction) des extraits des feuilles de *C. monogyna*, en suite optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques par ultrasons couplée à un plan d'expérience de type Box-Behnken. Les extraits obtenus ont été évalués pour leur teneur en polyphénols totaux ainsi que leur pouvoir antioxydant à l'aide des tests ABTS et DPPH. En fin l'étude de l'activité antimicrobienne de l'optimum obtenu par le plan d'expérience a été évaluée sur 4 souches bactériennes et une levure.

Ce mémoire est structuré en deux grandes parties une synthèse bibliographique et une partie expérimentale.

- La synthèse bibliographique comprend deux chapitres principaux :
 - **Chapitre I :** Généralités sur *Crataegus monogyna* et activités biologiques.
 - **Chapitre II :** Extraction assistée par ultrasons
- La partie expérimentale, quant à elle, est divisée en deux chapitres :
 - **Chapitre III :** matériel et méthodes,
 - **Chapitre IV :** Résultats et discussion, suivi par une conclusion générale ainsi que des perspectives pour les futures études.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

**Généralités sur *Crataegus monogyna* et
activités biologiques**

Chapitre I : Généralités sur *Crataegus monogyna* et activités biologiques

1. Présentation de *Crataegus monogyna*

Le genre *Crataegus* tire son nom du mot grec « kratos », qui signifie dureté, en référence à la solidité de son bois. Il regroupe un grand nombre d'arbustes appartenant à la famille des Rosacées, avec une diversité d'espèces allant de 200 à 1200 selon les classifications botaniques (**Kashyap et al., 2012**). Parmi ces espèces, *Crataegus monogyna* est l'une des plus répandues et plus utiles. Son nom *monogyna* provient du grec « monogonus », signifiant fleur à un seul pistil (**Djerroumi et Nacef, 2004 ; Zhang, 2002**).

1.1. Noms communs

- **Français** : Aubépine monogyne, Épine blanche (**Lazli et al., 2019**)
- **Anglais**: Hawthorn, English hawthorn ;(**Zhang, 2002**)
- **Arabe** : زعرور أحادي المدققة, الزعرور الشائك (**Zaârour el barri**)
- **Berbère** : Idhmim (**Djerroumi et Nacef, 2004**)



Figure 1: Présentation de l'espèce *C. monogyna* : fleurs, fruits feuilles et arbre

1.2. Description botanique

Crataegus monogyna est un arbuste caduc ou un petit arbre épineux, très ramifié, mesurant généralement entre 2 et 8 mètres de haut (parfois jusqu'à 10 m), avec un tronc pouvant atteindre 30 cm de diamètre. Il possède une couronne dense, arrondie à ovoïde.

Son écorce, d'abord gris-brun et lisse, devient brun rosé et écailleuse en vieillissant. Les bourgeons, ovoïdes et glabres, atteignent 3 mm, avec des écailles brun-rouge.

Les feuilles, alternes, sont ovées à obovées, profondément lobées (3 à 7 lobes), vert brillant dessus et vert glauque dessous, parfois avec de petites touffes de poils sous les nervures. Elles mesurent entre 1,0 et 5,7 cm de long. Les stipules sont caduques, lancéolées à subulées, atteignant 16

Les fleurs, bisexuées, blanches (parfois roses ou rouges), de 10 à 15 mm de diamètre, sont regroupées en corymbes de 10 à 18 fleurs. Chaque fleur comporte 5 sépales, 5 pétales, environ 20 étamines, un style simple, et un ovaire infère à un seul ovule fertile.

Le fruit est une petite drupe rouge vif à rouge foncé, ovoïde à ellipsoïde (6–11 mm), à chair jaunâtre et farineuse, contenant un noyau unique, brun foncé et sillonné (**Fichtner et Wissemann, (2021)**).

1.3. Classification botanique

La classification botanique de *C. monogyna* est donnée selon **Martinelli et al. (2021)**

- **Règne :** Plantes
- **Sous-règne :** Plantes vasculaires
- **Embranchement :** Spermaphytes
- **Sous-embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Sous-classe :** Rosidae
- **Ordre :** Rosales
- Famille :** Rosacées
- **Genre :** Crataegus
- **Espèce :** *Crataegus monogyna*

1.4. Origine de *Crataegus monogyna*

L’aubépine *monogyne*, un arbuste buissonnant muni de longues et solides épines, est originaire d’Europe du Sud, notamment de Chypre, de Malte et de la Sicile, ainsi que d’Asie. Elle est actuellement répandue dans toutes les régions tempérées de l’hémisphère Nord, où elle s’installe volontiers en lisière des bois et dans des formations végétales denses comme les haies et les maquis (**Mitchell, 1991 ; Edin et Nimmo, 1999 ; Pittler et al., 2003**).

En Algérie, *Crataegus monogyna*, connue sous le nom local de Zaârour el barri, pousse naturellement dans les régions montagneuses du Tell méridional oriental. On la croise souvent dans les forêts et les maquis de l’Atlas tellien, où elle joue un rôle important dans l’équilibre de l’écosystème (**Abdelgherfi, 2003 ; Bouzid, 2009**).

1.5. Exigences climatiques

L’aubépine est une plante robuste, qui ne demande pas beaucoup pour se développer. Elle s’adapte à différents types de sols et de climats, même difficiles. Elle pousse un peu partout, mais elle préfère les terrains calcaires, secs, légers et pauvres en argile. Elle supporte aussi bien les sols acides, neutres ou alcalins (**Aymonin, 1993 ; Brosse, 2000**).

1.6. Propriétés thérapeutiques

C. monogyna possède plusieurs propriétés thérapeutiques reconnues. Elle exerce une action calmante, antioxydante, cardioprotectrice et antispasmodique (**Bahorun, 1997 ; Degenring et al., 2003**). Ainsi elle contribue à la baisse de la tension artérielle, détend les muscles des vaisseaux sanguins, soulage l’anxiété, les troubles du sommeil et l’épuisement nerveux (**Bouzid, 2009**). Ses procyanidines permettent également de réduire les taux de cholestérol et de triglycérides, participant à la prévention des maladies cardiovasculaires (**Svedstroma et al., 2006**). Par ailleurs, elle permet d’augmenter la vitamine E sanguine (α -tocophérol) et à freiner l’oxydation des LDL, impliquée dans l’athérosclérose (**Zhang**

et al., 2004). Enfin, l'aubépine est utilisée pour atténuer les crises de tachycardie et présente une activité antiparasitaire contre *Trichomonas vaginalis* (**Garcia et al., 1997 ; Sparska et Martin, 1999 ; Girre, 2000**).

1.7. Utilisations alimentaires

Les fruits de *Crataegus monogyna* peuvent être consommés frais ou cuits, bien qu'ils aient été historiquement considérés comme un aliment de disette. Ils permettent la production de divers produits alimentaires tels que des farines, des jus, des marmelades, des gelées, des sirops, des boissons et même du vin (**Leung et Foster, 1996 ; Koyuncu et al., 2007 ; Vivar-Vera et al., 2007**).

En outre, les fruits d'aubépines sont transformés en purée, et peuvent être incorporés à de la farine pour confectionner des biscuits, des galettes ou encore des bouillies (**Uphof, 1959**).

Les feuilles jeunes, de couleur vert clair, sont parfois ajoutées aux salades composées ou utilisées pour préparer du thé (**Uphof, 1959 ; Lust, 1983 ; Kunkel, 1984**). Quant aux fleurs, elles sont appréciées pour leur capacité à aromatiser des sirops et des desserts (**Keser et al., 2014**).

1.8. Toxicité

Une consommation excessive de cette plante chez l'homme peut entraîner des troubles cardiovasculaires et respiratoires, une dépression du système nerveux, ainsi que des troubles digestifs mineurs et des réactions allergiques cutanées légères. Chez les jeunes enfants, l'ingestion d'une grande quantité de ses fruits pourrait provoquer une hypotension sévère. Par ailleurs, son pollen est reconnu comme allergisant (**Girre, 2000 ; Pierre, 2004**).

1.9. Composition biochimique

1.9.1. Composition en métabolites primaires et autres

- **Composition en vitamines**

Les vitamines sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, sans apporter d'énergie. Elles interviennent dans des fonctions vitales telles que la croissance, l'immunité, le système nerveux, la vision ou la synthèse de l'ADN. Une alimentation équilibrée suffit à couvrir les besoins, mais une carence ou un excès peut entraîner des troubles. On distingue les vitamines liposolubles (A, D, E, K), stockées dans les graisses avec un risque de surdosage, et les hydrosolubles (B et C), éliminées dans les urines, avec un risque plus faible de toxicité (**Anonyme 1, 2025**).

Le **Tableau I** regroupe les différentes vitamines trouvées au niveau de l'espèce *Crataegus monogyna*.

Tableau I: Teneurs en vitamines chez *C. monogyna* (**Boudraa., 2008**).

Nom	Teneur (mg /100 g MS)
Tocophérol	0.09-0.79
Vitamine C	0.69-4.06
Caroténoïdes (précurseur de vitamine A)	1,37
Pyridoxine (vitamine B6)	0,012
Thiamine (Vitamine B1)	0,05
Biotine (Vitamine B7)	0,031

- **Composition en glucides**

Les glucides sont des composés organiques essentiels, définis par la présence d'une fonction carbonyle (aldéhyde ou cétone) et de plusieurs groupes hydroxyles. Ils jouent un rôle central dans le stockage et le transfert de l'énergie chez les êtres vivants (**Aryan, 2023**).

Le **Tableau II** regroupe la teneur en glucides au niveau du fruit de *C. monogyna*

Tableau II : Teneurs en glucides chez Crataegus monogyna (Saadoudi., 2007)

Le nom	Teneur (g /100g MS)
Sucres solubles	11,45
Sucres réducteurs	7,86
Saccharose	3,59
Cellulose	11,40
Pectines	1,60

Saadoudi (2007), rapporte dans son étude que le fruit de *C. monogyna* possède une forte teneur en cellulose et en sucres solubles (**Tableau II**).

- **Composition en éléments minéraux**

Les minéraux sont des nutriments essentiels présents en quantités très variables dans l'organisme et jouant des rôles physiologiques importants. Ils participent notamment à la minéralisation, à l'équilibre hydrique et au bon fonctionnement des systèmes nerveux, musculaire et immunitaire (Anonyme 2., 2012).

Le **Tableau III** regroupe les teneurs des différents éléments minéraux trouvés au niveau du fruit de *C. monogyna*.

Tableau III: Teneurs en minéraux chez Crataegus monogyna (Boudraa., 2010)

Eléments minéraux	Teneur (mg/ 100 g matière sèche)
Ca ²⁺	414,18
Mg ²⁺	156,52
Na ⁺	31,20
Po ₄ ³⁻	20,09
Cu ²⁺	0,31
Fe ²⁺	4,09
Mn ²⁺	1,52
Zn ²⁺	0,32
Co ²⁺	0,17
Pb ²⁺	0,31
K ⁺	1694,80

D'après l'étude menée par **Boudraa et al. (2010)**, le fruit de *C. monogyna* contient des teneurs remarquables en potassium, calcium, magnésium et en sodium (**Tableau III**).

1.9.2. Composition en métabolites secondaires

Les métabolites secondaires jouent un rôle dans la protection contre les pathogènes, les insectes et le stress environnemental (**Colmar, 2007**).

➤ Composés phénoliques

Les composés phénoliques, issus des voies du shikimate, du pentose phosphate et du phénylpropanoïde (**Lin et al., 2016**), jouent un rôle clé dans la défense des plantes et présentent des bienfaits pour la santé humaine, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires et hypcholestérolémiants (**Scalbert et al., 2005**).

Crataegus monogyna est particulièrement riche en polyphénols, ce qui lui confère un intérêt médicinal, notamment pour ses propriétés cardiovasculaires et antioxydantes (**Ruiz-Rodriguez et al., 2014**).

La vitexine, l'hyperoside, la quercétine, l'isoquercitrine et l'apigénine sont les flavonoïdes majoritaires isolés au niveau des feuilles et des fleurs de *C. monogyna*. Ces composés peuvent représenter entre 1 % et 2 % de la masse, ce qui est assez élevé (**Chang et al., 2002 ; Dinesh et al., 2012**). Les fruits en contiennent aussi, mais en plus petite quantité entre 0,1 % et 1 % avec sur tout de la quercétine, de la vitexine et de l'isoquercitrine (**Chang et al., 2002**)

Les procyanidines B2, B5 et C1 qui appartiennent aux proanthocyanidines (ou OPCs), sont surtout présentes dans les fruits, mais aussi dans les feuilles et les fleurs, avec des taux pouvant aller jusqu'à 10 % tandis que dans les feuilles ils peuvent atteindre les environs de 40% (**Jurikova et al., 2012 ; Zurek et al., 2024**).

En ce qui concerne les acides phénoliques, les plus courants dans la plante sont l'acide chlorogénique et l'acide caféïque. Ils sont présents un peu partout dans les feuilles, les fleurs et les fruits et ils contribuent largement aux effets antioxydants de la plante (**Ozturk et al., 2011, Alirezalu et al., 2020**).

Les tanins sont eux aussi bien présents, surtout dans les fruits, où on trouve principalement des tanins condensés (**Dou et al., 2013**).

On retrouve également des coumarines comme l'ombelliférone dans les feuilles (**Dinesh et al., 2012**). La **Figure 2** représente les différents polyphénols isolés au niveau de *C. monogyna*.

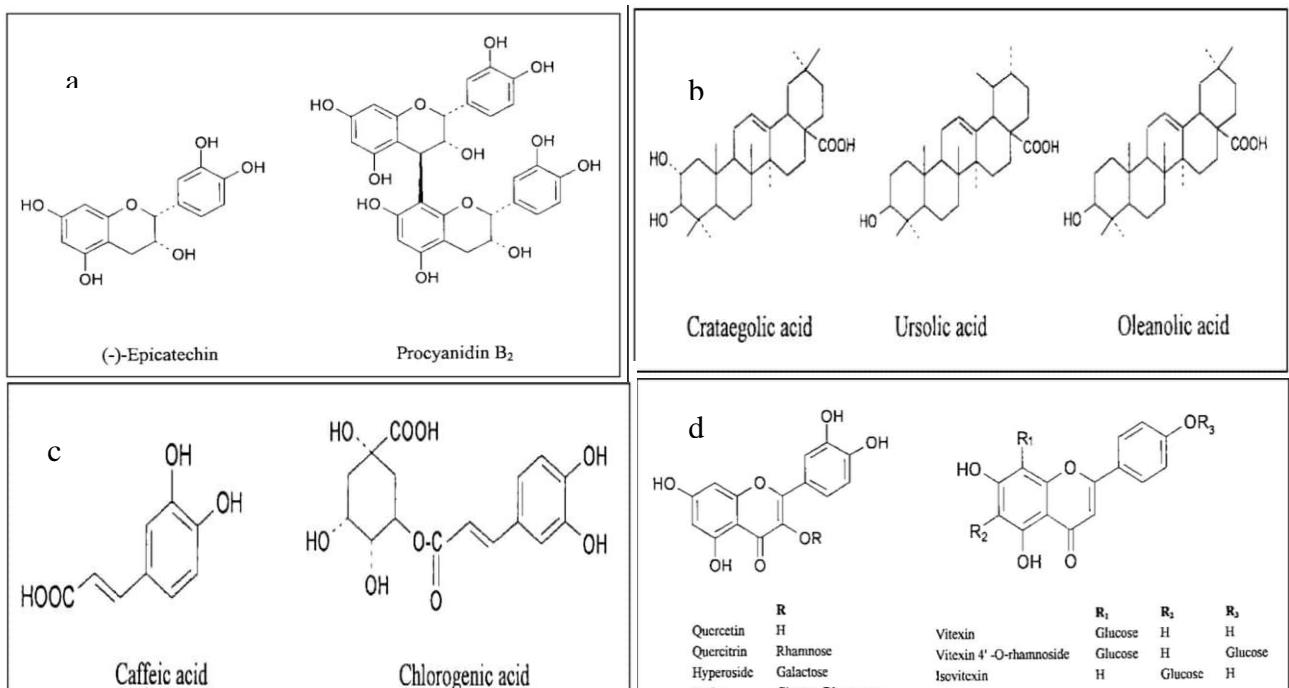


Figure 2: Structures chimiques des : (a) proanthocyanidines, b) : les Acide triterpéniique, (c) acides phénoliques représentatifs (d) flavonoïdes de *C. monogyna* (**Chang et al ., 2002**).

- Composés terpéniques

Les fleurs contiennent des huiles essentielles (**Bouzid, 2009**). En outre, des acides triterpéniques tels que l'acide oléanolique et l'acide ursolique sont également retrouvés dans les fruits, avec des concentrations comprises entre 0,5% et 1,4% (**Chang et al ., 2002**).

- Autres composés

Les fruits renferment aussi des acides organiques, notamment l'acide ascorbique (vitamine C), dont la concentration varie selon le stade de maturité (**Chang et al ., 2002**).

2. Activité antioxydante

Les composés phénoliques sont largement reconnus pour leur rôle dans la protection contre le stress oxydatif grâce à leur forte activité antioxydante. Ils sont présents en grande quantité dans divers végétaux, y compris les feuilles de *Crataegus monogyna*, et contribuent à la neutralisation des radicaux libres par différents mécanismes (**Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Rice-Evans et al., 1996**)

Les radicaux libres, tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($OH\cdot$) et l'oxygène singulet (1O_2), sont des espèces hautement réactives qui peuvent induire des dommages oxydatifs aux lipides, protéines et ADN cellulaires (**Harman, 1992 ; Gerschman, 1981**). L'accumulation excessive de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) est impliquée dans divers processus pathologiques et dans le vieillissement cellulaire et les maladies chroniques (**Finkel et Holbrook, 2000**). Les composés phénoliques, grâce à leur structure chimique, jouent un rôle clé dans la prévention de ces effets délétères en agissant comme des antioxydants naturels, capables de piéger les radicaux libres et de limiter l'oxydation cellulaire (**Cao et al., 1993**).

Les feuilles de *C. monogyna* sont particulièrement riches en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes et en acides phénoliques, qui contribuent à leur forte activité antioxydante (**Oueslati, 2017**). Ces composés sont capables de piéger efficacement les radicaux libres tels que le DPPH et l'ABTS+, comme démontré par diverses études d'évaluation de l'activité antioxydante (**Li et al., 1999 ; Kim et al ., 2002**).

L'activité antioxydante des extraits de feuilles de *Crataegus monogyna* peut être déterminée à l'aide de plusieurs méthodes telles que :

-L'ORAC (capacité d'absorbance des radicaux de l'oxygène), qui évalue la capacité d'un extrait à neutraliser les radicaux peroxyyles (ROO) (**Cao et al., 1993**).

- La photochémiluminescence (PLC), qui permet une détection sensible de la neutralisation des ERO (**Zielonka et Kalyanareaman, 2020**).

Ces méthodes ont montré que les extraits de *Crataegus monogyna* possèdent une capacité significative à inhiber la peroxydation lipidique, renforçant ainsi la stabilité des membranes cellulaires et limitant les dommages oxydatifs (**Kim et Lee, 2004**).

3. Activité antimicrobienne

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques ont une vraie activité antimicrobienne. Ils sont capables de freiner ou même de tuer certains micro-organismes pathogènes. Ce pouvoir vient principalement de leur capacité à s'attaquer aux membranes cellulaires des bactéries et des champignons, ce qui dérègle leur fonctionnement normal (**Cowan, 1999 ; Daghia, 2012**).

3.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne repose sur plusieurs techniques de laboratoire.

3.1.1. Méthodes de diffusion sur gélose

- **Méthode des trous**

C'est une technique assez simple, des petits trous ont été creusés sur une gélose préalablement ensemencée avec des bactéries. Une quantité précise d'extrait phénolique a été mise au niveau des trous. Après incubation, la formation d'une zone claire autour du trou, appelée zone d'inhibition, signifie un effet antibactérien (**Cowan, 1999**).

- **Méthode de diffusion sur disque**

Des disques en papier imbibés d'extrait sont déposés sur une gélose préalablement ensemencée. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la zone claire autour de chaque disque a été mesurée. Plus elle est large, plus l'extrait est efficace contre les bactéries (**Hidayat et al., 2023 ; Matuschek et al., 2014**).

3.1.2. Méthode de microdilution sur milieu liquide

L'extrait phénolique est dilué dans un bouillon nutritif qui contient les bactéries. La plus faible concentration qui empêche toute croissance visible des bactéries a été déterminée. Cette dernière appelée concentration minimale inhibitrice (**Daglia, 2012**).

3.1.3. Étude de la perméabilité membranaire

Cette méthode utilise des marqueurs fluorescents pour observer si les composés phénoliques rendent la membrane des bactéries plus perméable. Si la membrane est abîmée, cela peut entraîner la mort de la cellule (**Quideau et al., 2011**).

3.2. Spectre d'action des composés phénoliques

Les polyphénols présentent une activité antimicrobienne large et ciblent les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Des études ont démontré que leur action contre plusieurs pathogènes humains, notamment :

- **Bactéries Gram-positives** : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.
- **Bactéries Gram-négatives** : *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*
- **Champignons pathogènes** : *Candida albicans*

L'efficacité des polyphénols dépend fortement de leur structure chimique. Par exemple, les ellagitannins ont montré une activité particulièrement élevée contre *Campylobacter jejuni* et *Candida albicans* (**Daglia, 2012**)

Chapitre II :
Extraction assistée par ultrasons

Chapitre II : Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est une technique moderne utilisée pour extraire des composés bioactifs à partir de matrices naturelles (**Chemat et al., 2017**). Parmi ces composés, les polyphénols sont particulièrement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes et leurs effets bénéfiques sur la santé (**Dai et Mumper, 2010**). L'utilisation des bains à ultrasons constitue une alternative efficace aux méthodes conventionnelles, car elle améliore le rendement d'extraction tout en réduisant la consommation de solvants (**Vilkhu et al., 2008**).

Grâce aux phénomènes de cavitation acoustique générés par les ultrasons, cette méthode facilite la libération des polyphénols tout en préservant leur stabilité chimique (**Tao et Sun, 2015**). Ces avantages font de l'EAU une technologie prometteuse pour l'extraction des composés bioactifs dans divers domaines industriels tels que l'agroalimentaire, la pharmacie et la cosmétique.

1. Définition des bains à ultrasons

Un bain à ultrasons est un dispositif dans lequel des ondes ultrasonores sont émises dans un liquide, générant des bulles de cavitation qui implosent et exercent des forces mécaniques favorisant l'extraction des composés bioactifs (**Chemat et al., 2017**). Contrairement aux sondes ultrasoniques, qui délivrent une énergie plus localisée et intense, les bains à ultrasons offrent une extraction plus homogène et douce. Cette caractéristique est particulièrement bénéfique pour les composés thermosensibles tels que les polyphénols (**Kumar et al., 2021**).

2. Principe de l'extraction des composés phénoliques par bain à ultrasons

Les principaux mécanismes impliqués sont les suivants :

- **Disruption des parois cellulaires** : La fragmentation des structures cellulaires permet la libération des polyphénols emprisonnés dans les matrices (**Bourgou et al., 2016**).

- **Augmentation de la surface de contact** : La désintégration des particules solides améliore l’interaction entre la matrice et le solvant, optimisant ainsi l’extraction (**Vilkhu et al., 2008**).
- **Amélioration du transfert de masse** : L’agitation ultrasonique accélère la diffusion des composés phénoliques dans le solvant, ce qui réduit le temps d’extraction (**Tao et Sun, 2015**).
- **Diminution de la taille des particules** : L’érosion causée par la cavitation améliore la solubilisation des polyphénols (**Kumar et al., 2021**).

Grâce à ces mécanismes, l’EAU est une technique efficace qui permet d’augmenter le rendement d’extraction tout en préservant la bioactivité des polyphénols (**Dai et Mumper, 2010**).

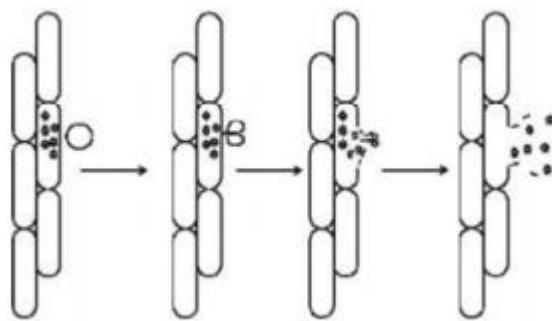


Figure 3 : Evolution d’une bulle de cavitation à proximité d’une cellule végétale (**Sébastien, 2010**)

3. Paramètres influençant l’extraction des composés phénoliques

L’efficacité de l’extraction des composés phénoliques par ultrasons dépend de plusieurs paramètres clés :

3.1. Paramètres physiques

- **Fréquence des ultrasons** : Généralement comprise entre 20 kHz et 120 kHz, elle influence la formation et l’intensité des bulles de cavitation. Une fréquence plus basse (~20 kHz) génère une cavitation plus intense, favorisant l’extraction, tandis qu’une fréquence

plus élevée (~100 kHz) produit une cavitation plus douce, mieux adaptée aux composés sensibles (**Chemat et al., 2017**).

- **Puissance ultrasonique** : Une puissance plus élevée (exprimée en W/ml) intensifie la cavitation et améliore l'extraction. Toutefois, une puissance excessive peut provoquer un échauffement, altérant certains polyphénols (**Kumar et al., 2021**).

3. 2. Paramètres chimiques

- **Température du solvant** : Une température modérée (25°C - 60°C) favorise la solubilité des polyphénols sans entraîner leur dégradation thermique (**Dai et Mumper, 2010**).
- **Type et volume du solvant** : L'efficacité de l'extraction dépend de la polarité du solvant. L'eau, l'éthanol et le méthanol sont couramment utilisés pour extraire les polyphénols (**Bourgou et al., 2016**).

3.3. Paramètres opérationnels

- **Durée de sonication** : Une durée excessive peut entraîner la dégradation des polyphénols, tandis qu'un temps trop court peut limiter l'extraction (**Tao et Sun, 2015**).
- **Rapport solide/liquide** : Un ratio optimal entre la quantité de matière végétale et le volume de solvant est crucial pour maximiser le rendement (**Vilkhu et al., 2008**)

4. Avantages et inconvénients de l'extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons présente plusieurs avantages notables. Elle s'effectue à une température modérée, ce qui permet de réduire la consommation énergétique tout en préservant l'intégrité des composés bioactifs thermosensibles (**Pradal, 2016**). De plus, cette technique améliore le rendement d'extraction en rendant le processus plus rapide et plus efficace (**Goula, 2013**).

Cependant, elle présente également certaines limites. D'une part, cette méthode ne permet pas le renouvellement du solvant au cours de l'extraction (**Penchev, 2010**). D'autre part, l'énergie ultrasonore peut avoir un effet délétère sur certains constituants actifs des plantes médicinales, notamment par la formation de radicaux libres, entraînant ainsi des modifications indésirables des molécules bioactives (**Handa, 2008**).

5. Applications des bains à ultrasons

Les bains à ultrasons sont largement utilisés dans plusieurs domaines :

- **Industrie agroalimentaire** : Extraction des antioxydants et polyphénols pour la formulation de compléments alimentaires (**Vilkhu *et al.*, 2008**).
- **Industrie pharmaceutique** : Isolement de composés bioactifs à partir de plantes médicinales pour le développement de médicaments naturels (**Dai et Mumper, 2010**)
- **Industrie cosmétique** : Extraction d'ingrédients actifs naturels pour les soins de la peau et les produits anti-âge (**Tao et Sun, 2015**).
- **Domaine environnemental** : Décontamination des sols et des eaux en facilitant l'extraction des polluants organiques (**Picó, 2013**).

Chapitre III : Matériel et méthodes

*Chapitre III : Matériel et méthodes***1. Matériel végétal**

Dans cette étude, nous avons étudié les feuilles de *Crataegus monogyna* (**Figure 4**), une plante appartenant à la famille botanique des Rosacées.



Figure 4: Feuilles de *Crataegus monogyna*.

1.1. Récolte

Les feuilles de *Crataegus monogyna* ont été récoltées le 3 février 2025 dans la localité de Tahmamte, relevant de la commune d'Amizour, située dans la wilaya de Béjaïa (Algérie). Le site de récolte se trouve à une altitude approximative de 270 mètres au-dessus du niveau de la mer, aux coordonnées géographiques 36°38'14" de latitude Nord et 4°55'12" de longitude Est.

1.2. Lavage et séchage

Après la récolte, les feuilles de *Crataegus monogyna* ont été soigneusement débarrassées des mauvaises herbes, puis lavées à l'eau du robinet pour éliminer les impuretés et les particules de poussière. Elles ont ensuite été séchées dans une étuve ventilée (Binder GmbH, Allemagne) à 40 °C, jusqu'à stabilisation de leur poids (Pendant 2 jours).

1.3. Broyage et tamisage

Les feuilles préalablement séchées ont été transformées en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (modèle Sonika Z3044, Chine). Le produit du broyage a ensuite été soumis à un tamisage manuel à l'aide des tamis présentant des ouvertures de 250 µm et 500 µm. Afin d'obtenir une poudre homogène et de granulométrie fine, ayant un diamètre compris entre 250 et 500 µm. La poudre ainsi obtenue a été conservée dans un récipient hermétique en verre.

2. Analyses phyto-chimiques

2.1. Détermination de l'humidité

La teneur en humidité de la plante est déterminée par la méthode de décrite par **Ngargueudéjim et al.(2015)**. 2 g des feuilles fraîches de *C. monogyna* ont été placés dans une étuve à $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 2 heures. Le test a été répété 3 fois.

Le taux d'humidité (H%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{p_2 - p_0}{p_1} \times 100 ; \text{ Où}$$

H(%): Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

P0: poids de la boite de pétri vide en gramme ;

P1 : Poids de l'échantillon en gramme avant séchage ;

P2 : Poids de la boite de pétri et de l'échantillon après séchage en gramme (**Ngargueudéjim et al., 2015**)

2.2. Détermination du taux de cendres

Le taux de cendres reflète la teneur en éléments minéraux absorbés par la plante à partir du sol. Il est déterminé par calcination, une méthode consistant à éliminer les matières organiques d'un échantillon par une combustion à haute température durant un temps déterminé. Le taux de cendres correspond au rapport entre la masse du résidu minéral

obtenu après calcination et la masse initiale de l'échantillon, exprimé en pourcentage (%).
(Ngargueudéjim *et al.*, 2015)

La méthode utilisée pour cette analyse est celle décrite par **Letermet *et al.* (2006)**, 1g de poudre sèche de *C. monogyna* été prélevé et mit dans un creuset préalablement taré. L'ensemble (creuset et échantillon) a été placé dans un four à moufle (Nabertherm, Allemagne) à une température de 450°C pendant 6 heures. Après 6heures, l'ensemble est retiré du four et déposé dans un dessiccateur pour le refroidissement ensuite la pesée est effectuée. Le test a été répété 3 fois. (**Annexe 6**)

Le taux de cendres (TC) a été calculé selon la formule suivante :

$$Tc\% = \frac{p2 - p0}{p1} \times 100$$

Où :

TC(%) : taux de cendres exprimé en pourcentage ;

P₀ : Poids du creuset vide en grammes ;

P₁ : Poids de l'échantillon avant calcination en grammes ;

P₂ : Poids du creuset plus le résidu après calcination en grammes.

2.3. Dosage des caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes a été déterminée selon la méthode décrite par **Sass-Kiss *et al.* (2005)**. Un gramme de poudre sèche de *Crataegus monogyna* a été introduit dans un bêcher de 50 ml recouvert d'aluminium pour le protéger de la lumière. Ensuite, 10 ml d'un mélange de solvants composé de n-hexane, acétone et éthanol (2:1:1) (v/v/v) ont été ajoutés. L'ensemble a été soumis à une agitation pendant 10 minutes à l'abri de la lumière afin d'assurer une bonne extraction, puis filtré. L'extrait obtenu a été versé dans une ampoule à décanter. La même procédure a été répétée sur le résidu pour une extraction par épuisement. Les extraits obtenus ont été rassemblés dans l'ampoule à décanter. Un volume d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10%, préparé dans l'éthanol, a été ajouté afin d'éliminer les chlorophylles selon **Cui *et al.* (2004)**. Le mélange a ensuite été lavé à l'aide

d'eau distillée, en plusieurs étapes (environ 70 ml), jusqu'à décoloration de l'extrait. La phase hexanique, de couleur jaune, contenant les caroténoïdes, a été soigneusement récupérée (**Annexe 7**).

L'absorbance de cette phase a été mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en caroténoïdes a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec le β -carotène (**Annexe 1**), et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent β -carotène par gramme de matière sèche (mg Eq β -carotène/g MS).

3. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

3.1. Optimisation séquentielle

L'objectif de cette étape est de déterminer les limites inférieur et supérieur des variables indépendantes (la température et le temps d'extraction) à étudier dans le plan d'expérience Box- Behnken. Afin d'avoir le meilleur rendement en composés phénoliques.

3. 1.1.Variation du temps d'extraction

Afin d'évaluer l'influence du temps d'extraction sur le rendement en composés phénoliques, le pourcentage en éthanol (solvant d'extraction), le ratio masse de l'échantillon / volume et la température d'extraction ont été fixés à 50 % (v/v), 1/20 (m/v), et 25 °C ; respectivement. Alors que le temps d'extraction a été varié de 5 à 60 minutes (5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes).

3.1.2. Variation de la température

À la suite de l'optimisation du temps d'extraction, une durée de 50 minutes a été retenue comme constante pour étudier l'impact de la température sur l'extraction des composés phénoliques. Ainsi qu'un pourcentage de 50 % (v/v) en éthanol et le ratio masse/volume 1/20 (m/v) ont été fixés. La température d'extraction a été variée de 25 à 65°C (25, 35, 45, 55 et 65 °C).

3.2. Optimisation avec un plan d'expérience

3.2.1. Modèle expérimental

Dans le but d'optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante des extraits de *Crataegus monogyna*, un plan d'expériences comportant 15 essais, incluant trois points centraux, a été élaboré à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, USA). Trois variables indépendantes ont été prises en compte : le temps d'extraction (5, 30 et 55 minutes), la température (45, 50 et 55 °C), ainsi que la concentration en solvant (éthanol) à (0, 50 et 100 %). Les réponses mesurées comprenaient la teneur en polyphénols totaux (TPT) exprimée en mg EAG/g de matière sèche, la capacité de piégeage du radical ABTS (en mmol ET/g de matière sèche) et celle du radical libre DPPH (en µg EAG/ml), comme le montre le **Tableau I**.

L'optimisation a été réalisée à l'aide de la méthode des surfaces de réponse (RSM) en s'appuyant sur le plan de Box-Behnken (**Jeganathan et al., 2014**).

Tableau IV: Plan d'expérience utilisé pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Crataegus monogyna*.

Tests	Temps (min)	Température (°C)	EtOH (%)
1*	30	50	50
2	5	45	50
3	55	50	100
4	30	45	0
5	5	55	50
6	55	55	50
7	30	55	100
8*	30	50	50
9	30	55	0
10	5	50	0
11	55	45	50
12	30	45	100
13	5	50	100
14	55	50	0
15*	30	50	50

*: Points centraux du plant d'expériences

3.3. Extraction des composés phénoliques par ultrasons

Dans cette étude, une méthode d'extraction assistée par ultrasons (EAU) a été employée pour isoler les composés bioactifs présents dans les feuilles de *Crataegus monogyna*. Les ultrasons, qui sont des ondes mécaniques de vibration, présentent des fréquences comprises entre 20 et 100 kHz, et sont couramment utilisés pour l'extraction de composés bioactifs (**Ghitescu et al., 2015**).

3.3.1. Principe

Le principe de l'extraction assistée par ultrasons repose sur la rupture des parois cellulaires sous l'effet de fréquences ultrasonores, favorisant ainsi une meilleure pénétration du solvant au sein de la matière végétale. Cela se traduit par une amélioration significative du rendement d'extraction. Généralement, les fréquences utilisées dépassent les 20 kHz. En milieu liquide, les ultrasons engendrent des cycles de compression et d'expansion des cellules, ce qui conduit à la formation de bulles. La croissance excessive de ces bulles microscopiques à proximité des parois cellulaires entraîne une élévation locale de température et de pression, provoquant l'éclatement des bulles et par conséquent, la désintégration des parois cellulaires (**Wang et al., 2006**).

3.3.2. Protocole expérimental

L'extraction des composés phénoliques totaux de *C. monogyna* a été réalisée à l'aide de la technique d'extraction assistée par ultrasons. Pour cela, 1 g de poudre de feuilles de *C. monogyna* a été placé dans un petit flacon contenant 20 ml d'éthanol, utilisé comme solvant d'extraction. Le mélange a ensuite été immergé dans un bain à ultrasons (Bransonic Ultrasonic, Mexique) (**Figure 5**), selon des conditions précises de température et de durée d'extraction, conformément aux paramètres définis dans le plan d'expérience présenté dans le **Tableau IV**. Après traitement, le mélange est filtré puis centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma 1-14, Allemagne) à 5000 tours/min pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu (l'extrait) est ensuite transféré dans des flacons étiquetés,

hermétiquement fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C afin de prévenir toute dégradation des extraits.



Figure 5: Bain à ultrasons utilisé pour l'extraction des composés phénoliques

3.4. Dosage des polyphénols totaux

3.4.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des composés phénoliques, ce mélange est réduit, formant ainsi des oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la coloration bleue produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Jeganathan *et al.*, 2014**).

3.4.2. Protocole expérimental

La teneur en polyphénols totaux a été estimée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode décrite par **Nabet *et al.* (2019)**. Pour chaque extrait, 30 µl ont été mélangés avec 1800 µl d'eau distillée, puis 150 µl du réactif de Folin-Ciocalteu ont été ajoutés. Après une minute d'agitation, 450 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20 % ont été incorporés, suivis de 570 µl d'eau distillée. Le mélange obtenu a ensuite été incubé pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance

a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Biotech Engineering Management CO. LTD, Vis-7220G, UK).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard (**Annexe 2**), permettant d'exprimer les résultats en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

4. Détermination de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de *C. monogyna* a été réalisée à l'aide de deux tests à savoir le piégeage des radicaux libres DPPH et le piégeage des cations radicalaires ABTS.

4.1. Test de piégeage des radicaux libres DPPH

4.1.1. Principe

Les antioxydants ont la capacité de réduire le diphenylpicrylhydrazyle (DPPH), un radical libre de couleur violette, en une forme réduite de couleur jaune (**voir figure 6**). L'intensité de la coloration violette diminue proportionnellement à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à céder des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

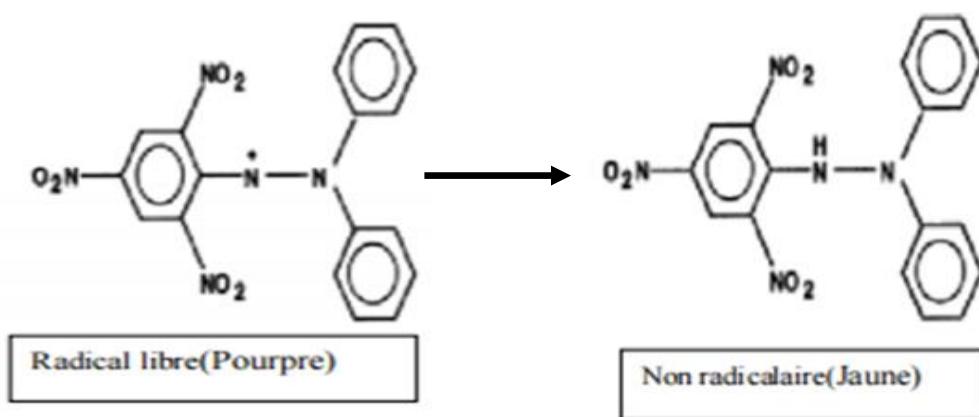


Figure 6: Forme radicalaire et réduite du DPPH (**Mesrane ,2018**)

4.1.2. Protocole expérimental

L’activité antioxydante des extraits de *C. monogyna* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée selon la méthode décrite par **Brand-Williams (1995)**. Une solution de DPPH ($6 \cdot 10^{-5}$ mM) a été préparée avec du méthanol. À 1450 µl de cette solution, ont été ajoutés 50 µl de l’extrait dilué à 1/4. Le mélange a ensuite été incubé à l’abri de la lumière pendant 30 minutes à température ambiante. L’absorbance a été mesurée à 517 nm à l’aide d’un spectrophotomètre UV-Vis (Biotech Engineering Management CO. LTD, Vis-7220G, UK).

Le pourcentage d’inhibition (I%) a été calculé à l’aide de la formule suivante :

$$I\% = \frac{Abs \text{ témoin} - Abs \text{ ech}}{Abs \text{ témoin}} \times 100 ; \text{ Où}$$

Abs témoin : Absorbance du témoin à T = 0 min ;

Abs échantillon : Absorbance de l’échantillon à T = 30 min.

Une courbe d’étalonnage a été réalisée en utilisant l’acide gallique comme standard (**Annexe 4**), et les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents acide gallique par millilitre ($\mu\text{g EAG/ml}$).

4.2. Test de piégeage des radicaux cationiques ABTS⁺

4.2.1. Principe

Le test ABTS⁺ figure parmi les méthodes les plus répandues pour l’évaluation de l’activité antioxydante. Il repose sur la neutralisation du radical cationique ABTS⁺, généré par oxydation en présence de persulfate de potassium (K₂S₂O₈), produisant une solution de couleur bleu-vert (**Prouillac, 2006 ; Jri et al., 2010**). Lorsqu’un antioxydant est ajouté à cette solution radicalaire, il réduit le radical ABTS⁺, ce qui entraîne une diminution de l’absorbance. Cette diminution est directement liée à l’activité antioxydante des composés testés, ainsi qu’au temps d’incubation et à leur concentration (**Re et al., 1999**).

4.2.2. Protocole expérimental

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *C. monogyna* obtenus par extraction assistée par ultrasons a été réalisée selon la méthode décrite par **Re et al. (1999)**. Une solution d'ABTS à 7 mM a été préparée avec de l'eau distillée. Le radical cationique ABTS^{•+} a été généré en mélangeant cette solution avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈), puis en laissant le mélange à l'abri de la lumière, à température ambiante, pendant 16 à 18 heures.

Pour l'analyse, la solution radicalaire d'ABTS^{•+} a été diluée à l'aide d'un tampon phosphate de sodium (5 mM, pH 7,4) jusqu'à obtention d'une absorbance comprise entre 0,68 et 0,72. Ensuite, 2 ml de cette solution ont été mélangés à 20 µl de l'extrait. Le mélange a été incubé pendant 45 minutes à 30°C, puis l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Biotech Engineering Management CO. LTD, Vis-7220G, UK).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant le Trolox comme standard (**Annexe 3**), et les résultats ont été exprimés en millimoles équivalents Trolox par gramme de matière sèche (mmol ET/g MS).

5. Détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut de *C. monogyna*

L'activité antimicrobienne de l'extrait brut des feuilles de *C. monogyna* obtenu dans les conditions optimales d'extraction (52,44 °C; 45,40 min et 62,16 % en EtOH), a été déterminée avec l'utilisation de deux méthodes à savoir la détermination des diamètres de zones d'inhibition avec la méthode des trous sur gélose Mueller Hinton et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches ayant une forte activité antimicrobienne avec la méthode de dilution sur microplaques en utilisant le bouillon Mueller Hinton.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 5 souches de références à savoir deux bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et deux bactéries à Gram négatif *Salmonella enterica* (Clinical strain) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) et une levure *Candida albicans* (Laboratory strain).

5.1. Préparation des cultures microbiennes fraîches (Revivification)

Afin d'effectuer le test de l'activité antimicrobienne une revivification des souches microbiennes cibles est réalisée (repiquage) afin d'obtenir des souches jeunes.

- **Revivification des souches bactériennes**

Les bactéries à tester ont été conservées dans un bouillon nutritif au réfrigérateur. Afin de préparer des cultures jeûnes et viables ces dernières ont été ensemencées sur des boites de Pétri stériles contenant une gélose nutritive à l'aide des pipettes Pasteur, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

- **Revivification de la souche fongique**

La levure *Candida albicans* (**Laboratory strain**) a été cultivée sur gélose Sabouraud, un milieu adapté aux champignons. Le repiquage a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur, suivi d'une incubation à 28 °C pendant 48 heures.

5.2. Standardisation de l'inoculum

La standardisation de l'inoculum microbien a été réalisée selon la méthode de McFarland, par mesure de la densité optique (DO) à 625 nm. La DO visée est comprise entre 0,08 et 0,13, ce qui correspond à une concentration estimée à 8×10^6 UFC/mL . Pour cela, une solution physiologique ou saline a été préparée (9 g de NaCl/L d'eau distillée stérile) et répartie dans des tubes stériles à raison de 9 ml pour chacun. Après avoir resuspendu les souches bactériennes, les suspensions ont été homogénéisées par vortex, puis la DO a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu, UV-1800, Japon). Le même protocole a été établi pour *Candida albicans* (**Laboratory strain**), suivi d'une détection des DO à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu, UV-1800, Japon) (**Elmasry et al., 2023**).

5.3. Détermination des diamètres de zone d'inhibition par la méthode des trous

L'effet antimicrobien (diamètres de zone d'inhibition) de l'extrait brut des feuilles de *C. monogyna* sur les cinq souches étudiées a été évalué par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (méthode des trous).

- **Préparation du milieu gélosé Mueller Hinton**

Ce milieu a été préparé en dissolvant 19 g de la poudre de la gélose Mueller-Hinton dans 500 ml d'eau distillée, puis stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes dans un autoclave (Nuve, Turquie, NC 40M) et enfin coulé dans des boîtes de Pétri. Une fois solidifié, des trous ont été creusés stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur. Quatre trous ont été réalisés par boîte : deux pour les extraits de *C. Monogyna* (1 et 2) (deux répétitions), un pour le contrôle positif (Amoxicilline) qui est un antibiotique à large spectre et un pour le contrôle négatif (Diméthyle Sulfoxyde : DMSO) qui est un solvant organique polaire utilisé pour la reconstitution de notre extrait.

- **ensemencement des boîtes de Pétri**

L'extrait brut de *C. monogyna* obtenu dans les conditions optimales d'extraction préalablement séchés à l'étuve à 40°C, a été reconstitué dans du DMSO à une concentration de 50mg/ml. Le solvant DMSO a été choisi pour sa non-toxicité vis-à-vis des souches testées (pas d'effet antimicrobien). Un volume de 100 µL d'extrait ou de contrôle (positif ou négatif) a été déposé dans chaque trou. Dans le cas de la souche *Candida albicans* (**Laboratory strain**), 100 µL de l'éconazole (antifongique) ont été utilisés comme étant un contrôle positif et le DMSO a servi comme étant un contrôle négatif.

- **Incubation et lecture des résultats**

Les boîtes de Pétri ont été incubées au réfrigérateur (entre 4 et 6 °C) Pendant 3 heures, afin de favoriser la diffusion des extraits et d'arrêter momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées dans une étuve ventilée (Memmert, Allemagne) à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 28 °C pendant 48 heures pour la levure *Candida albicans* (**Laboratory strain**). Après incubation (**Annexe 5**), l'activité antimicrobienne a

été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse, les résultats étant exprimés en millimètres.

6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

6.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est définie comme étant la plus faible concentration d'un extrait dans laquelle aucune croissance bactérienne et fongique visible à l'œil nu, après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C (**Caquet, 2004**).

La CMI de l'extrait de *C. monogyna* a été déterminée avec la méthode de microdilution en utilisant le bouillon M.H dans des microplaques à 96 puits.

La CMI a été déterminée sur les souches microbiennes qui ont démontré une sensibilité vis-à-vis de l'extrait testé à savoir *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Candida albicans* (Laboratory strain).

Sept dilutions : 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 µg/ml ont été préparées à partir d'une concentration de 1 mg/ml (extrait obtenu dans les conditions optimales d'extraction par ultrasons). Ces concentrations ont été utilisées afin de déterminer la CMI de notre extrait.

Dans chaque puits, un volume de 200 µL de la dilution préparée et 10 µL d'inoculum ont été transférés. Un control négatif (bouillon M.H+ extrait) a été utilisé pour chaque microplaquette afin de vérifier que l'extrait seul ne provoquait pas de turbidité (**Figure 7**).

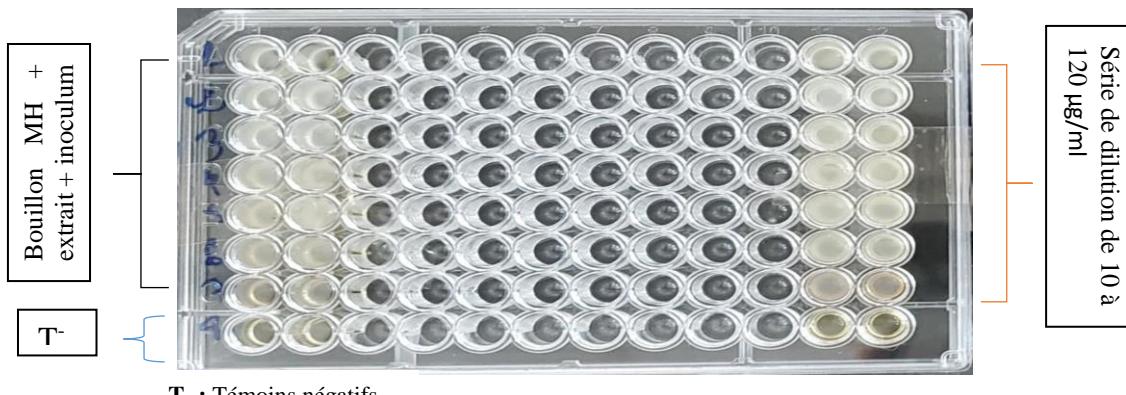


Figure 7: Distribution des concentrations préparées et de l'inoculum au niveau de la microplaqué

Deux microplaques distinctes ont été utilisées : l'une pour les bactéries et l'autre pour la levure. Chaque test a été réalisé en duplicité.

- **Lecture des résultats**

Après une incubation de 24 heures à 37 °C, une confirmation visuelle a été réalisée à l'aide d'un indicateur coloré MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure), un sel tétrazolium initialement jaune, qui est réduit par les enzymes métaboliques des cellules vivantes en formazane, un composé de couleur violette. Ce changement de couleur permet une évaluation colorimétrique de la viabilité microbienne (**Abdmouleh., 2020**).

6.2. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

Pour l'évaluation de l'effet bactéricide ou bactériostatique (fungicide ou fongistatique) de l'extrait de *C. monogyna*, des prélèvements ont été effectués à partir des puits correspondants à la CMI pour chaque espèce et ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les boîtes de Pétri qui montrent un développement bactérien (ou fongique) ce qui signifie un effet bactériostatique (ou fongistatique). Alors que, l'absence de la croissance bactérienne sur les boîtes de Pétri indique un effet bactéricide (ou fungicide).

Chapitre IV :
Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Taux d'humidité

La teneur en humidité de *C. monogyna* est représentée dans la **Figure 8**.

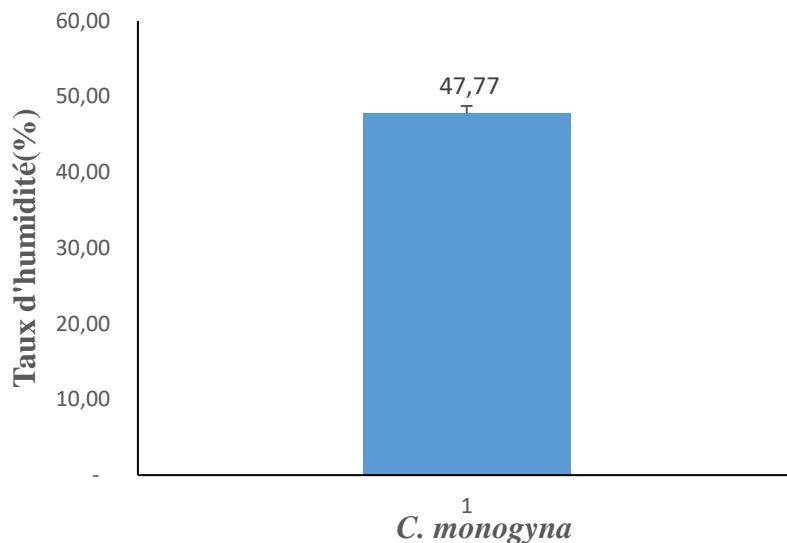


Figure 8: Teneur en humidité de *C. monogyna*.

Le test d'humidité a été réalisé afin d'estimer la teneur en eau présente dans les feuilles de *Crataegus monogyna*.

Les résultats obtenus révèlent un taux d'humidité de $47,77 \pm 1,55\%$ ce qui indique que la matière sèche constitue 52,23 % du poids total des feuilles. Cette teneur en eau relativement élevée souligne l'importance d'un séchage efficace pour assurer une bonne conservation des échantillons, tout en préservant leurs caractéristiques physicochimiques.

Selon l'étude de **Boudraa et al. (2010)**, les teneurs en eau des fruits de *C. monogyna* et *C. azarolus*, récoltés en octobre dans les régions de N'Gaous et d'Aïn Touta (Wilaya de Batna), étaient de $35,52 \pm 8,06\%$ et de $70,22 \pm 3,40\%$, respectivement. Ces variations peuvent s'expliquer par des différences liées à l'espèce, à la partie végétale étudiée, à la période et à la région de récolte, ainsi qu'aux conditions environnementales.

2. Taux de cendres

La teneur en cendres des feuilles de *C. monogyna* est représentée dans la **Figure 9**

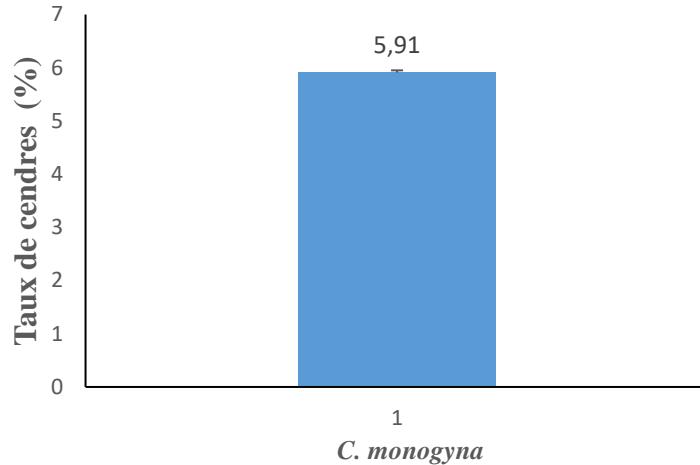


Figure 9: Teneur en cendres de *C. monogyna*

La teneur en cendres reflète la quantité totale de sels minéraux contenus dans les feuilles de *Crataegus monogyna*. Les résultats obtenus indiquent un taux de cendres de $5,91 \pm 0,04\%$, témoignant d'une présence notable de minéraux dans la matière végétale analysée.

Dans une étude menée par **Boudraa et al. (2010)**, les teneurs en cendres des fruits de *C. monogyna* et *C. azarolus*, récoltés en octobre dans les régions de N'Gaous et d'Aïn Touta (Wilaya de Batna), ont été estimées à $4,10 \pm 0,1$ et à $5,00 \pm 0,07\%$, respectivement.

Les différences observées peuvent s'expliquer par divers facteurs, notamment l'espèce de *Crataegus* considérée, la partie étudiée (feuilles ou fruits), la région de prélèvement, ainsi que les conditions environnementales ayant influencé la composition minérale des échantillons (**Boudraa et al., 2010**).

3. Teneur en caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes des feuilles de la plante étudiée est représentée au niveau de la **Figure 10**.

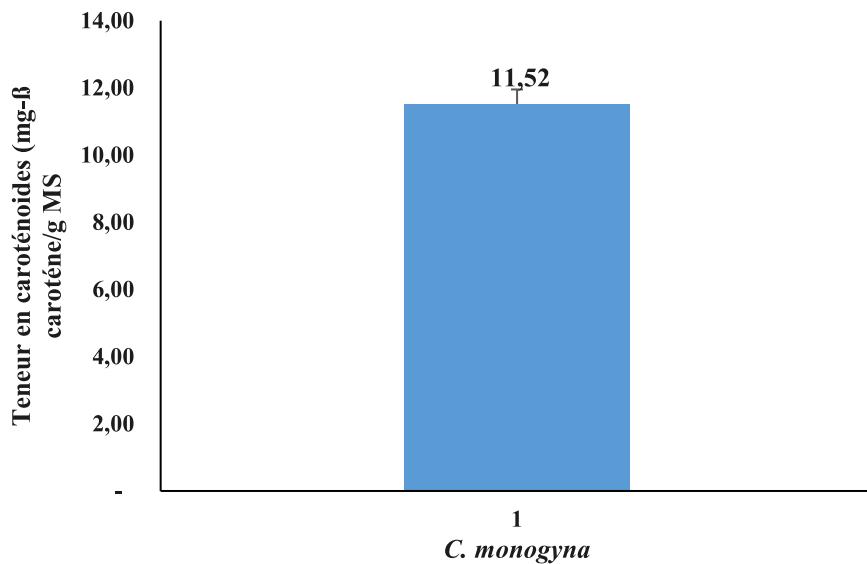


Figure 10: Teneur en caroténoïdes de *C. monogyna*.

L'extrait des feuilles de *Crataegus monogyna* présente une teneur en caroténoïdes de $11,52 \pm 0,43$ mg de β -carotène/g MS. Ce taux révèle une concentration modérée en caroténoïdes, des composés naturels essentiels pour leurs propriétés antioxydantes et leur rôle protecteur contre le stress oxydatif.

À titre comparatif, **Antonion et al. (2015)** ont rapporté une teneur plus élevée au niveau des fruits de *Crataegus mexican* récoltés au Mexique, qui est de $26,4 \pm 0,02$ mg de β -carotène/g de poids frais. De même, **Pérez-Lainez et al. (2019)**, dans une étude menée sur 24 génotypes de *Crataegus* récoltés entre septembre et octobre 2016/2017 au Mexique, ont observé des concentrations maximales atteignant $42,35 \mu\text{g/g}$ de poids frais.

Les variations observées entre les différentes études peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment l'espèce de *Crataegus*, la partie végétale étudiée (feuilles ou

fruits), la méthode d'extraction utilisée, la période de récolte ainsi que les conditions environnementales et géographiques (Antonion *et al.*, 2015 ; Pérez-Lainéz *et al.*, 2019).

4. Optimisation des extraits de *C. monogyna* par ultrasons

4.1. Optimisation séquentielle

4.1.1. Optimisation du temps d'extraction

Le temps d'extraction a été varié de 5 à 60 minutes, le pourcentage en éthanol et le ratio (masse/volume) ont été fixés. Les teneurs en composés phénoliques obtenus par EAU ont été regroupés au niveau de la **Figure 11**.

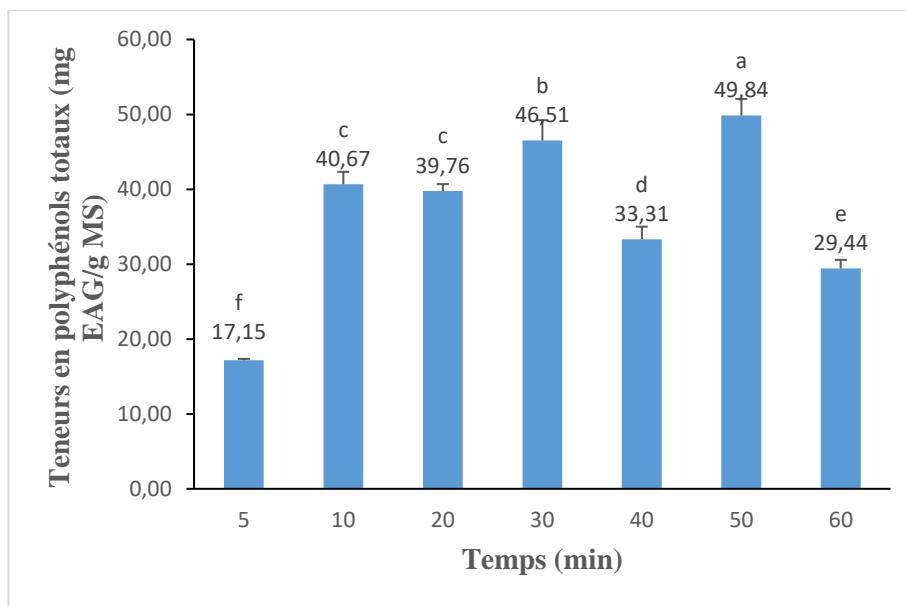


Figure 11: Effet du temps d'extraction sur la teneur en composés phénoliques

(Les différentes lettres a, b, c, d, e et f montrent une différence significative à $p \leq 0,05$).

L'étude statistique (test LSD) montre qu'il existe des différences significatives des teneurs en composés phénoliques totaux lors de la variation du temps d'extraction, exception faite pour les temps d'extraction de 10 et 20 min qui donnent une TPT d'environ 40 mg EAG/g MS.

La plus faible teneur en TPT est obtenue à un temps d'extraction de 5 min, qui est de $17,15 \pm 1,17$ mg EAG/g MS. Alors que, la plus forte teneur en TPT qui est de 49,84 mg EAG/g MS est obtenue à un temps d'extraction de 50 min.

D'après les résultats de l'optimisation du temps d'extraction nous avons fixé les bornes inférieur et supérieur à 5 et 55 min, respectivement.

L'étude expérimentale montre que le temps d'extraction influence significativement la teneur en composés phénoliques totaux (TPT), sauf entre 10 et 20 minutes où les valeurs (~40 mg EAG/g MS) sont similaires. La TPT la plus faible ($17,15 \pm 1,17$ mg EAG/g MS) est obtenue à 5 minutes, tandis que la plus élevée (49,84 mg EAG/g MS) est atteinte à 50 minutes. Ces résultats sont cohérents avec les données bibliographiques, qui indiquent que *Crataegus monogyna* est naturellement riche en composés phénoliques, et que leur extraction est favorisée par un temps prolongé.

4.1.2.Optimisation de la température d'extraction

Le pourcentage en éthanol, le ratio (masse/volume) et le temps d'extraction (50 min) ont été fixés. La température d'extraction a été variée de 25 à 65°C. Les teneurs en composés phénoliques obtenus par EAU ont été regroupés au niveau de la **Figure 12**.

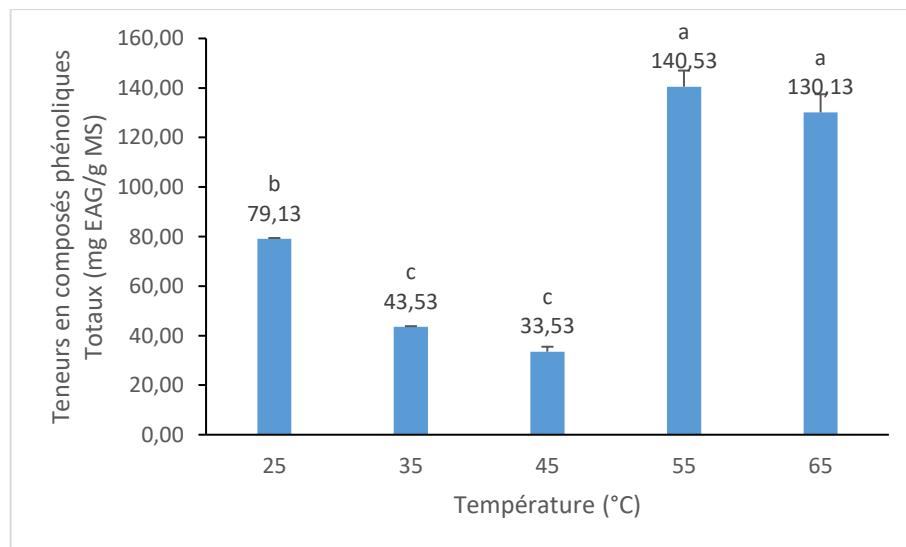


Figure 12 : Effet de la température d'extraction sur la teneur en composés phénoliques

(Les différentes lettres a, b et c montrent une différence significative à $p \leq 0,05$).

L’analyse statistique à l’aide du test LSD révèle des teneurs proches en composés phénoliques totaux (TPT) en fonction de la température d’extraction entre 55 et 65°C et la même chose pour 35 et 45°C, à l’exception de la température de 25 °C, qui présentent des valeurs similaires, autour de 80 mg EAG/g MS.

La teneur la plus faible en TPT, soit $33,53 \pm 5,90$ mg EAG/g MS, est observée à 45 °C. En revanche, la teneur la plus élevée, atteignant 140,53 mg EAG/g MS, est enregistrée à 55 °C.

L’étude montre que la température d’extraction influence significativement la teneur en composés phénoliques totaux (TPT). La teneur maximale (140,53 mg EAG/g MS) est obtenue à 55 °C, tandis que la plus faible ($33,53 \pm 5,90$ mg EAG/g MS) est observée à 45 °C. Des valeurs similaires sont enregistrées entre 25, 35 et 45 °C d’une part, et entre 55 et 65 °C d’autre part. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie, qui indique qu’une température modérée favorise l’extraction des composés phénoliques, tandis qu’une température trop basse ou mal adaptée peut limiter leur libération ou entraîner leur dégradation.

5. Optimisation des extraits de *C. monogyna* par le plan d’expérience

Le **Tableau V** présente le plan d’expérience mis en œuvre pour optimiser les conditions d’extraction par ultrasons, en tenant compte de trois variables indépendantes. Il rassemble également les résultats obtenus pour les trois réponses étudiées à partir des extraits de feuilles *C. monogyna*.

Tableau V: Plan d'expérience et résultats des réponses étudiées pour les extraits de *C. monogyna* obtenus par ultrason.

Tests	Temps (min)	Temp (°C)	EtOH (%)	TPC (mg EAG/g MS)	DPPH (µg/ml)	TEAC (mmol/g MS)
1*	30	50	50	101,89 ± 1,81	240,82 ± 0,73	88,44 ± 2,10
2	5	45	50	76,75 ± 4,94	240,49 ± 0,23	66,20 ± 3,02
3	55	50	100	77,52 ± 0,67	252,46 ± 2,22	60,91 ± 2,18
4	30	45	0	8,35 ± 3,37	129,92 ± 5,31	37,20 ± 2,83
5	5	55	50	81,47 ± 2,81	220,71 ± 0,56	65,82 ± 3,18
6	55	55	50	116,93 ± 7,03	242,92 ± 0,23	84,10 ± 0,85
7	30	55	100	57,41 ± 5,49	223,36 ± 0,00	62,72 ± 3,67
8*	30	50	50	104,43 ± 1,46	242,76 ± 0,35	81,15 ± 1,73
9	30	55	0	11,97 ± 0,00	189,41 ± 3,94	38,34 ± 3,98
10	5	50	0	6,67 ± 0,41	114,56 ± 3,06	37,96 ± 2,07
11	55	45	50	91,65 ± 3,38	227,56 ± 1,42	74,96 ± 2,38
12	30	45	100	39,25 ± 2,55	257,79 ± 0,38	56,15 ± 3,56
13	5	50	100	28,11 ± 3,67	261,19 ± 1,30	38,68 ± 3,43
14	55	50	0	13,20 ± 8,83	180,84 ± 1,83	32,01 ± 3,54
15*	30	50	50	108,91 ± 1,33	242,27 ± 0,20	85,63 ± 1,93

* : Représente les points centraux

5.1. Optimisation de la teneur en polyphénols totaux des extraits de *C. monogyna*

La teneur la plus élevée en polyphénols totaux des extraits de *Crataegus monogyna* a été obtenue sous les conditions d'extraction suivantes : 55 °C, 55 minutes et 50 % d'éthanol, avec une concentration de 116,93 ± 7,03 mg EAG/g de matière sèche.

À l'opposé, la teneur la plus faible a été enregistrée dans le test 10, correspondant à des conditions d'extraction de 50 °C, 5 minutes et 0 % d'éthanol, avec une teneur de 6,67 ± 0,41 mg EAG/g MS (**Tableau V**).

La **Figure 13** représente le diagramme de Pareto des composés phénoliques de *C. monogyna*

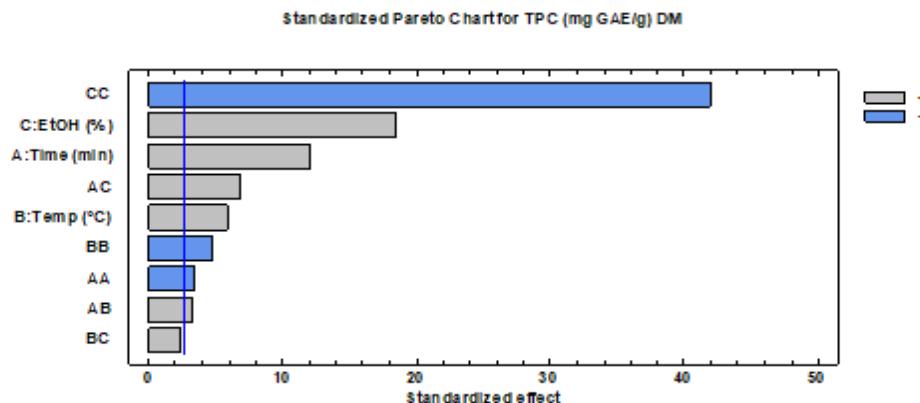


Figure 13 : Diagramme de Pareto des polyphénols de *C. monogyna*

L'étude statistique (**Figure 13**) montre que les trois variables indépendantes (pourcentage en éthanol, temps d'extraction et la température) ont un effet significatif positif sur la TPT. En effet, le % EtOH possède un effet significatif important par rapport à ceux du temps et de la température. De plus, l'effet quadratique du pourcentage en éthanol (CC) possède un fort effet significatif négatif sur la teneur en polyphénols totaux (TPT). Ainsi que l'effet quadratique du temps (BB) et de la température (AA) ont un faible effet significatif négatif.

La meilleure teneur en polyphénols totaux, estimée par le modèle ($R^2 = 99,40 \%$), qui est de 121,28 mg EAG/g MS, obtenue dans les conditions optimales d'extraction : 54,03 °C, 55 minutes et 62,45 % EtOH.

Le modèle mathématique proposé par le logiciel afin d'optimiser la TPT est comme suit :

$$\text{TPT (mg GAE/g) DM} = -736.471 - 1.41346 * \text{Time (min)} + 30.3472 * \text{Temp (°C)} + 2.1441 * \text{EtOH (\%)} - 0.00899733 * \text{Time (min)}^2 + 0.04112 * \text{Time (min)} * \text{Temp (°C)} + 0.008576 * \text{Time (min)} * \text{EtOH (\%)} - 0.310133 * \text{Temp (°C)}^2 + 0.01454 * \text{Temp (°C)} * \text{EtOH (\%)} - 0.0272313 * \text{EtOH (\%)}^2.$$

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent des teneurs relativement élevées en composés phénoliques dans les extraits de feuilles de *C. monogyna*. À titre de comparaison, **Pliszka et al. (2016)** ont rapporté des teneurs en composés phénoliques de $41,8 \pm 9,13$ mg EAG/100 g de poids frais pour l'extrait d'acide citrique et de $17,0 \pm 6,02$ mg EAG/100 g de poids frais pour l'extrait méthanolique à 80 %, issus des fruits de *C. monogyna* récoltés en Pologne.

De leur côté, **Keser et al. (2014)** ont évalué les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits aqueux et éthanoliques des fleurs, feuilles et fruits de *C. monogyna* récoltés à Gaziantep, en Turquie. Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et éthanoliques des fleurs contiennent des TPT de $72,54 \pm 2,58$ mg et $92,69 \pm 1,87$ mg de quercétine/g de poids sec, respectivement. Alors que, les extraits aqueux et éthanolique des feuilles présentent une TPT de $106,24 \pm 3,48$ mg et $86,88 \pm 1,85$ mg de quercétine/g de poids sec, respectivement. Les valeurs obtenues avec l'extrait aqueux corroborent à celles obtenues dans notre étude à 30 min, 50 °C et 50% EtOH (points centraux), tandis que l'extrait éthanolique montre une valeur proche à celle de notre étude obtenue dans les conditions d'extraction de 5 min, 55°C et 50 % EtOH (**Tableau V**). De plus, les extraits aqueux et éthanolique du fruit montrent des teneurs de $70,58 \pm 1,66$ mg et $71,69 \pm 1,45$ mg de quercétine/g de poids sec, respectivement.

Par ailleurs, une étude menée par **Abuashwashi et al. (2016)** sur neuf échantillons des parties aériennes de *C. monogyna* récoltées à Madrid (Espagne), pendant la période de floraison a révélé que les teneurs en composés phénoliques des extraits méthanoliques varient entre $117,72 \pm 0,01$ et $204,29 \pm 0,01$ mg EAG/g d'extrait sec.

Ces différences significatives entre les études peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment la partie de la plante analysée, la méthode et les conditions d'extraction (temps, température, solvant), mais aussi des facteurs liés à l'âge de la plante, à la période de récolte ou aux conditions environnementales (**Abuashwashi et al., 2016 ; Keser et al., 2014 ; Pliszka et al., 2016**).

5. 2.Optimisation de l'effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *C. monogyna*

Les résultats présentés dans le **Tableau V** indiquent que les variables étudiées à savoir le temps, la température et le pourcentage en éthanol (%EtOH) influencent l'activité de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *Crataegus monogyna*.

La capacité antioxydante la plus élevée, exprimée en effet de piégeage du radical DPPH a été obtenue dans les conditions suivantes : 5 minutes d'extraction, 50 °C et 100 % d'éthanol, donnant une valeur de $261,19 \pm 1,30 \text{ } \mu\text{g EAG/ml}$. À l'inverse, l'effet de piégeage du radical DPPH le plus faible a été observé avec l'extrait obtenu après 5 minutes d'extraction, 50 °C et 0 % EtOH, avec une valeur de $114,56 \pm 3,06 \text{ } \mu\text{g EAG/ml}$.

La **Figure 14** représente le diagramme de Pareto pour le test DPPH.

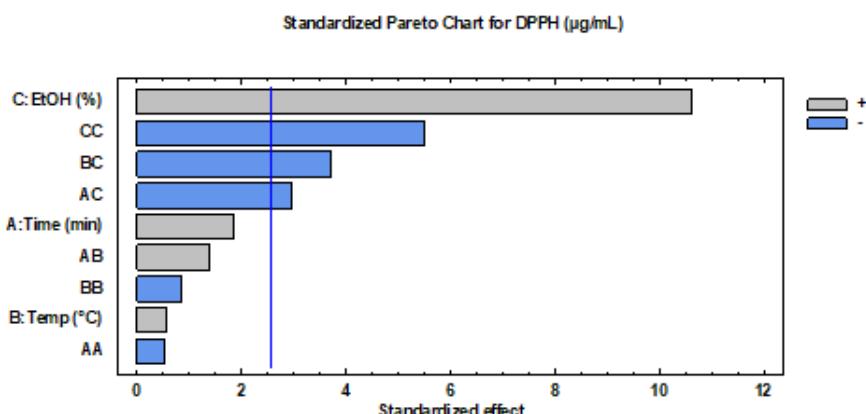


Figure 14: Diagramme de Pareto pour le test DPPH de l'extrait de *C. monogyna*

L'étude statistique montre que seule la variable concentration en éthanol (% EtOH) possède un fort effet significatif positif sur l'effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits de *C. monogyna*. En revanche, les deux autres variables indépendantes étudiées, le temps d'extraction et la température, ne présentent aucun effet significatif sur cette activité (**Figure 14**)

D'autre part, l'effet quadratique de la concentration en éthanol (CC) montre un effet de piégeage du radical libre DPPH significatif négatif, ce qui indique que l'augmentation du % EtOH entraîne une diminution de l'activité antioxydante.

Le modèle obtenu ($R^2 = 97,17\%$) propose que l'activité antioxydante maximale, mesurée par le test DPPH, soit de 284,26 µg EAG/ml, dans les conditions optimales suivantes : 5 min, 45 °C et 100 % d'éthanol.

Le modèle mathématique proposé par le logiciel afin d'optimiser l'effet de piégeage du radical libre DPPH est comme suit :

$$\text{DPPH } (\mu\text{g/mL}) = -593.094 - 2.09915 * \text{Time (min)} + 25.4486 * \text{Temp (°C)} + 7.54598 * \text{EtOH (\%)} - 0.00551 * \text{Time (min)}^2 + 0.07028 * \text{Time (min)} * \text{Temp (°C)} - 0.015002 * \text{Time (min)} * \text{EtOH (\%)} - 0.22345 * \text{Temp (°C)}^2 - 0.09392 * \text{Temp (°C)} * \text{EtOH (\%)} - 0.0144975 * \text{EtOH (\%)}^2$$

Simirgiotis et al. (2013) ont rapporté que l'effet de piégeage du radical libre DPPH (IC50), des extraits de *Crataegus monogyna* est de $3,61 \pm 0,01$ µg/ml pour le fruit et de $3,34 \pm 0,38$ µg/ml pour la partie aérienne. Par ailleurs, **Abuashwashi et al. (2016)** ont étudié neuf échantillons de parties aériennes de la même espèce, récoltés pendant la période de floraison en mai 2011 à Madrid (Espagne), et ont observé des valeurs de l'effet de piégeage du radical libre DPPH (IC50) comprises entre $2,67 \pm 0,14$ µg/ml et $3,76 \pm 0,67$ µg/ml.

Pliszka et al. (2016) ont évalué l'effet de piégeage du radical libre DPPH des extraits d'acide citrique et méthanolique à 80 % de fruit de *C. monogyna*. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH sont de 90 % et 85 %, respectivement.

5.3. Optimisation de la capacité antioxydante équivalente Trolox (TEAC) de *C. monogyna*

L'analyse des résultats (**Tableau V**) met en évidence que la capacité maximale de neutralisation du radical libre ABTS par l'extrait des feuilles de *Crataegus monogyna* est

de 88,44 mmol ET/g de matière sèche (MS), avec des conditions d'extraction de 30 min, 50°C et 50 % d'éthanol.

À l'inverse, l'effet de piégeage du radical libre ABTS le plus faible a été observé dans les conditions d'extraction de 55 min, 50 °C, et 0 % EtOH, avec une valeur de $32,01 \pm 3,54$ mmol ET/g MS (**Tableau II**)

La **Figure 15** représente le diagramme de Pareto pour le test ABTS.

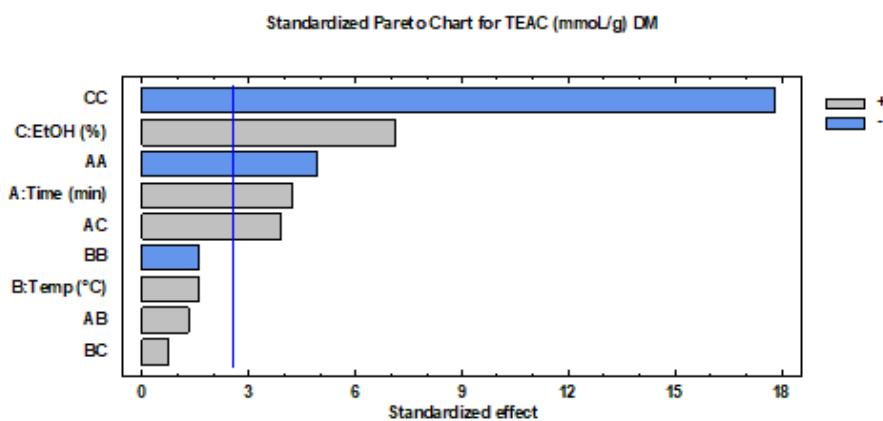


Figure 15: Diagramme de Pareto pour le test ABTS de l'extrait de *C. monogyna*

D'un point de vue statistique, le diagramme de Pareto (**Figure 15**) indique que le %EtOH et le temps ont un effet significatif positif sur l'effet de piégeage du radical libre ABTS. Par conséquent, les effets quadratiques du % EtOH et du temps possèdent un effet significatif négatif sur l'effet de piégeage du radical libre ABTS.

Selon le modèle de régression obtenu ($R^2 = 98,81\%$), les conditions optimales prédites pour un effet de piégeage maximal du radical ABTS (87,70 mmol ET/g MS) sont les suivantes : 40,92 min, 52,75 °C et 59,68 % d'éthanol.

Le modèle mathématique, proposé par le logiciel afin d'optimiser l'effet de piégeage du radical ABTS est comme suit :

TEAC (mmol/g) DM = -251.84 - 0.12844*Time (min) + 11.7507*Temp (°C) + 1.07881*EtOH (%) - 0.0148127*Time (min) ^2 + 0.01904*Time (min)*Temp (°C) + 0.005636*Time (min)*EtOH (%) 0.121817*Temp (°C) ^2 + 0.00543*Temp (°C)*EtOH (%) - 0.0133702*EtOH (%) ^2

Keser et al. (2014) ont rapporté que les extraits aqueux des fleurs, des feuilles et des fruits mûrs de *Crataegus monogyna*, récoltés en Turquie, présentent un effet de piégeage du radical ABTS de $97,50 \pm 0,57\%$, $97,30 \pm 0,82\%$ et $50,76 \pm 0,66\%$, respectivement. Les extraits éthanoliques issus des mêmes parties de la plante montrent également un fort effet de piégeage du radical ABTS, qui est de $97,90 \pm 0,71\%$ pour les fleurs, $97,60 \pm 0,46\%$ pour les feuilles, et $52,50 \pm 0,56\%$ pour les fruits mûrs.

Par ailleurs, **Pliszka et al. (2016)** ont évalué l'effet de piégeage du radical ABTS des extraits de l'acide citrique et méthanolique à 80 % de *C. monogyna*, avec des pourcentages d'inhibition de 52 % et 55 %, respectivement.

5.4. Optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *Crataegus monogyna*

Au niveau du **Tableau VI** sont regroupés les résultats prédictifs les résultats expérimentaux des réponses étudiées obtenus dans les conditions optimales d'extraction de l'extrait de *C. monogyna* par la méthode d'extraction assistée par ultrason qui sont : une température de 52,44°C, un temps d'extraction de 45,40min et un pourcentage de 62,16% en éthanol

Tableau VI: Comparaison des valeurs expérimentales et prédictives des réponses optimisées des extraits de *C.monogyna*

Réponses	Valeurs Obtenues	Valeurs prédictes	%RSD
TPT(mg EAG/g MS)	115,07	116,93	1,13
DPPH (µg EAG/ml)	225,19	252,17	7,99
ABTS (mmol ET/g MS)	84,59	87,35	2,27

Le model propose un facteur de désirabilité de 0,97 % (**Figure 16**) avec une teneur en polyphénols totaux de 116,93mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 252,17 μ g EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 87,35 mmol ET/g MS. Ces teneurs sont proches à celles trouvées dans l'expérimentale. Par conséquent le model proposé par le logiciel Statgraphics (52,44°C, 45,40min et 62,16%EtOH) est validé.

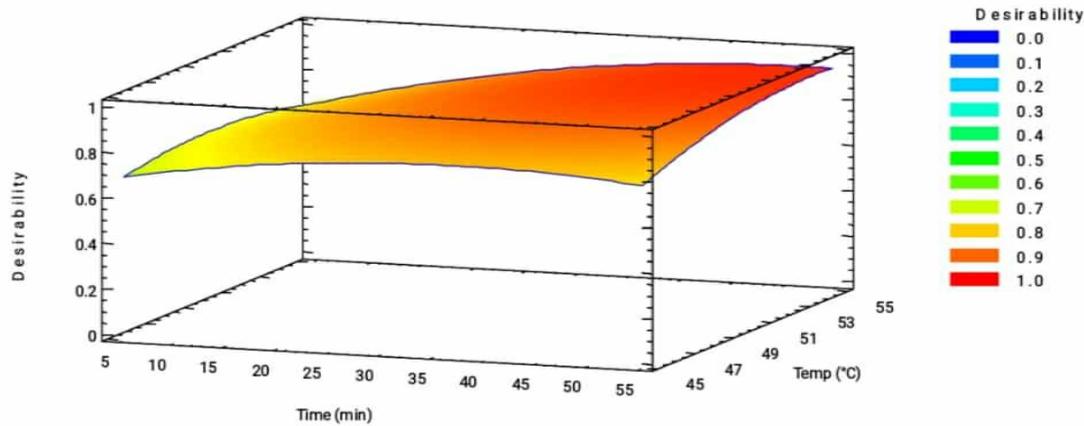


Figure 16: Schéma tridimensionnel de la surface de réponse des effets de temps et de température sur la désirabilité de l'extrait de *C. monogyna* obtenu par extraction assistée par ultrason.

6. Activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut de *C. monogyna*

6.1. Diamètres des zones d'inhibition

L'extrait de feuilles de *C. monogyna* possède un potentiel inhibiteur sur la majorité des souches testées. Les diamètres des zones d'inhibition, de l'extrait de *C. monogyna* sur les souches testées, exprimés en millimètres, sont présentés dans le **Tableaux VII**.

Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibition (DZI) en mm de l'extrait de *C. monogyna* sur les souches testées.

Souches	DZI (mm)	DZI de l'amoxicilline (mm) [5mg / 25ml]	DZI de l'éconazole (mm) [1%]	DZI de DMSO (mm) [100%]
<i>Salmonella enterica</i> (G-)	11±1,41 ^b	35	-	6
<i>Escherichia coli</i> (G-)	13±00 ^a	39	-	6
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	12,5±0,70 ^{a, b}	35	-	6
<i>Enterococcus faecalis</i> (G+)	6±00 ^c	33	-	6
<i>Candida albicans</i>	12,5±0,71 ^{a, b}	-	29	6

Les différentes lettres a, b et c montrent une différence significative à $p \leq 0,05$

G - : Gram négatif ; G + : Gram positif

L'extrait de la plante testée montre des diamètres des zones d'inhibition allant de 11 à 13 mm L'étude statistique réalisée sur les DZI obtenus (test LSD), montre que l'extrait de *C. monogyna* possède le même effet antimicrobien sur *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Candida albicans* (*Laboratory strain*) avec des DZI allant de 12,5 à 13 mm Alors qu'un DZI de 11 mm a été obtenu dans le cas de *Salmonella enterica* (Clinical strain). Par ailleurs, la souche *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) est résistante à l'extrait de *C. monogyna* (**Tableau VII**).

L'amoxicilline (contrôle positif antibactérien) a induit des diamètres de zones d'inhibition importants, variant entre 33 et 39 mm selon la souche bactérienne. Tandis que, l'éconazole (contrôle positif antifongique) a présenté un diamètre de zone d'inhibition de 29 mm à l'égard de *Candida albicans* (*Laboratory strain*). Le solvant DMSO utilisé comme contrôle négatif n'a présenté aucune activité inhibitrice sur toutes les souches testées. Ce qui indique que l'activité antimicrobienne observée est bien due à l'extrait testé.

Les résultats obtenus avec l'extrait brut de *C. monogyna* indiquent une activité antimicrobienne intermédiairement sensible selon l'échelle décrite par **Mebarki (2010)**, qui classe la sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit :

Extrêmement sensible DZI ≥ 20

Sensible $15 \leq \text{DZI} \leq 19$

Intermédiairement sensible $9 \leq \text{DZI} \leq 14$

Non sensible $\text{DZI} \leq 8$

Benguemma et Chellouf (2024), ont trouvé un DZI de 8 mm sur la souche *C. albicans* en utilisant l'extrait chloroformique de *Medicago sativa*. Ce DZI est inférieur à celui trouver dans notre étude sur la même souche.

L'activité antibactérienne pourrait être attribuée à la présence de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Scalbert, 1991** ; **Hatano et al., 2005** ; **Shan et al., 2007**). De plus, plusieurs chercheurs ont rapporté que *C. monogyna* est riche en polyphénols qui peuvent contribuer avec un fort pouvoir antioxydant et antimicrobien (**Hamlaoui et al., 2015** ; **Hamlaoui, 2018**). En effet, l'hyperoside et la quercétine sont les composés phénoliques majoritaires isolés au niveau des extraits de *C. monogyna* (**Seyed et al., 2015**) et qui pourraient jouer un rôle clé dans l'effet antimicrobien de notre extrait. Ces flavonoïdes sont connus pour leur capacité à perturber la membrane cellulaire des bactéries et inhiber leur croissance (**Seyed et al., 2015**).

Enfin, l'effet antimicrobien de l'extrait de *C. monogyna* semble faible par rapport à celui des antibiotiques de référence, mais reste significatif, notamment vis-à-vis de *S. aureus*, d'*E. coli*, et de *Candida albicans* (**Tableau VII**).

D'autres facteurs peuvent influencer l'effet antimicrobien de l'extrait, notamment la concentration utilisée, le protocole d'extraction et la polarité des solvants.

6.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Après une réaction de 15 minutes du réactif MTT, les puits colorés en violet indiquent une croissance microbienne. En revanche, les puits ayant conservé leur couleur jaune indiquent un manque de la croissance microbienne. La CMI a ainsi été déterminée comme la plus faible concentration pour laquelle aucun changement de couleur n'a été observé, c'est-à-dire la concentration la plus proche des cupules violettes, mais restant jaune. Le **Tableau VIII** représente les différentes CMI obtenues.

Tableau VIII: Résultats des concentrations minimales inhibitrices obtenues

Souches	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	60 ^a
<i>S. aureus</i>	60 a
<i>C. albicans</i>	120 b

Les différentes lettres a et b montrent une différence significative à $p \leq 0,05$

La **Figure 17** représente les différentes CMI obtenues sur les souches testées



Figure 17: Concentrations minimales inhibitrices de l'extraits de *C. monogyna* à l'égard de *E.coli*, *S. aureus* et *C. albicans*

L'extrait brut des feuilles de *C. monogyna* a montré une activité antimicrobienne avec des CMI de 60 $\mu\text{g/mL}$ dans le cas d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, et de 120 $\mu\text{g/mL}$ dans le cas de *Candida albicans*.

L'étude de **Chaiebabi et al.** (2011) portant sur les extraits aqueux de *Punica granatum L.* a rapporté une CMI de 780 µg/mL sur *E. coli*. Par ailleurs, **Ayed et al.** (2023), ont rapporté une CMI de 5 mg/mL sur *E. coli*, et une CMI de 40 mg/mL sur *S. aureus*, avec l'utilisation des extraits aqueux et méthanolique de *Rubus fruticosus L.* Selon **Benguemma et Chellouf (2024)** l'extrait chloroformique de la partie aérienne de *Medicago sativa*, montre une CMI de 6,25 mg/ml (soit 6250 µg/ml).

Les différentes CMIs rapportées dans la littérature sont beaucoup plus importantes à celles trouvées dans notre étude. Ce qui indique que l'extrait de *C. monogyna* étudié possède une forte activité antimicrobienne à très faible concentration.

6.3. Effet bactériostatique ou bactéricide

Suite à l'incubation des boîtes de Petri pendant 24h (**Figure 18**), une prolifération des microorganismes a été observée sur toutes les boîtes. Ce qui indique que les CMIs obtenues ont un effet bactériostatique ou fongistatique, c'est-à-dire qu'il inhibe la croissance des micro-organismes momentanément.



Figure 18: Evaluation de l'effet bactériostatique et fongistatique de l'extrait de *C. monogyna*

L'extrait étudié possède un potentiel inhibiteur, mais son efficacité pourrait être améliorée par des tests à doses plus élevées ou une optimisation des méthodes d'extraction.

En effet, l'activité inhibitrice ou bactéricide d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs tels que le mode d'extraction et la concentration en principes actifs (**Wagner, 1993 ; Thangara et al, 2000**).

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que les feuilles de *C. monogyna* est une source considérable en composés phénoliques et présente une forte activité antioxydante ainsi qu'une activité antimicrobienne modérée, ce qui confirme son utilisation dans la médecine traditionnelle.

Les teneurs en humidité, en cendres et en caroténoïdes retrouvées dans les feuilles de *C. monogyna* sont de $47,77 \pm 1,55\%$; $5,91 \pm 0,04\%$ et $11,52 \pm 0,43\text{ mg } \beta\text{-carotène/g MS}$, respectivement.

L'étude préliminaire a permis d'évaluer l'influence de deux paramètres essentiels, le temps et la température d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totaux (TPT) des feuilles de *C. monogyna*. Les résultats montrent que la teneur la plus faible en TPT est de $17,15 \pm 0,20\text{ mg EAG/g MS}$, obtenue après 5 minutes d'extraction, tandis que la teneur la plus élevée atteint $49,84 \pm 2,22\text{ mg EAG/g MS}$ après 50 minutes. Concernant la température, la plus faible teneur est enregistrée à 45°C avec $33,53 \pm 1,98\text{ mg EAG/g MS}$, alors que la valeur maximale de $140,53 \pm 1,13\text{ mg EAG/g MS}$ est observée à 55°C .

Ces résultats ont permis de fixer les limites inférieur et supérieur du temps et de la température qui sont de 5 à 55 min et de 45 à 55°C , respectivement.

La plus forte teneur en polyphénols totaux qui est de $121,28\text{ mg EAG/g MS}$, proposée par le plan d'expérience Box-Benken pour l'extrait de *C. monogyna* dont les conditions optimales sont : $54,03^\circ\text{C}$, 55min et 62,45 % EtOH.

Le plan Box-Benken propose le plus fort effet de piégeage du radical libre DPPH qui est de $284,26\text{ }\mu\text{g EAG /ml}$ de l'extrait de *C. monogyna* dont les conditions optimales sont : 5 min, 45°C et 100 % EtOH.

Le plus fort effet de piégeage du radical libre ABTS de l'extrait de *C. monogyna* est de 87,70 mmol ET/g MS, proposée par le plan d'expérience Box-Benken dont les conditions optimales sont : 40,92 min, 52,75°C et 59,68 % EtOH.

L'optimisation des réponses de surfaces multiples d'extrait de *C. monogyna* permis d'identifier les conditions optimales d'extraction qui sont : 52,44°C, 45,40 min et 62,16% EtOH. Ces dernières permettent d'avoir une teneur en polyphénols totaux de 115,07 mg EAG/g MS, un effet de piégeage du radical libre DPPH de 225,19 µg EAG/ml et un effet de piégeage du radical libre ABTS de 84,59 mmol ET/g MS.

L'extrait de *C. monogyna* montre le même effet antimicrobien sur les souches testés (*E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*) avec des DZI allant de 12,5 à 13 mm. En revanche la souche *E. faecalis* est résistante.

Une CMI de 60 µg/ml est obtenue sur *E. coli*, *S. aureus*, par contre une CMI de 120 µg/ml est obtenue dans le cas de *C. albicans*. De plus, les CMI obtenues montrent un effet bactériostatique et fongistatique sur les souches sensibles à notre extrait.

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

- D'étudier d'autres facteurs et conditions qui pourraient influencer l'optimisation de l'extraction des molécules bioactifs telle que la fréquence des ultrasons,
- Détermination de la composition chimique de l'extrait optimisé de *C. monogyna* par LC/MS,
- Utilisation d'autres méthodes d'extraction (micro-onde),
- Utilisation d'autres solvants d'extraction (méthanol),
- Etudier d'autres parties de la plante (fleur, fruit, tige, racine),
- Etudier d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire, insecticide, anticancéreux...),
- Enrichir certaines denrées alimentaires avec les extraits de ce fruit et l'évaluation de leurs effets sur la conservation et la qualité nutritionnelle des aliments.

Références bibliographiques

A

Abdelguerfi, A (2003). Évaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante par l'agriculture -Bilans des expertises - Plan d'action et stratégie nationale sur la biodiversité. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Algérie.

Aberkane M.C. (2006). Etude photochimique de la plante *Publicaria laciniata*. (Thèse de doctorat).Université de Batna, 163p.

Abuashwashi, M. A., Palomino, O. M., & Gómez-Serramillos, M. P. (2016). Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2708-2713.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1179769>

Alirezalu, A., Ahmadi, N., Salehi, P., Sonboli, A., Alirezalu, K., Khaneghah, A. M., Barba, F. J., Munekata, P. E. S., & Lorenzo, J. M. (2020). Physicochemical characterization, antioxidant activity, and phenolic compounds of hawthorn (*Crataegus spp.*) fruits species for potential use in food applications. *Foods*, 9(4), 436.
<https://doi.org/10.3390/foods9040436>

Anonyme 1. (2025). Les références nutritionnelles en vitamines et minéraux. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
<https://www.anses.fr/fr/content/les-references-nutritionnelles-en-vitamines-et-mineraux>. (Consulté le 10-03-2025)

Anonyme 2. (2012). Les éléments minéraux : les macroéléments et oligoéléments.
<https://www.nestle.fr/nutri-pro/mineraux>. (Consulté le 25 mars 2025).

Antonion, B. T. G., Margarita, C. R., & Daniel, M.I. (2015). Biological properties and antioxidant activity of hawthorn *Crataegus mexicana*. Journal of Pharmacogenomids & Pharmacoproteomic, 6(4), 1.

Aryal, S. (2023). Introduction to carbohydrates. Microbe Notes.
<https://microbenotes.com/introduction-to-carbohydrates/>

Ayed, W., Mouhamadi, R., Ayedi, I. (2023). Etude de l'activité antibactérienne et insecticide d'une plante médicinale de la région de Guelma. Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie.

Aymonin, G.G. (1993). Guide des arbres et des arbustes. Sélection du Reader's Digest ,Paris, 351p.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, 117(4), 426– <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

B

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. Arzneimittel-Forschung, Nov ; 46(11):1086-9. PMID : 8955870.

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research, 2,83-94.

Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung, 46(11): 1086-1089.

Bahorun, T., Trotin, F., Pommery, J., Vasseur, J., & Pinkas, M. (1994). Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Medica*, 60(4), 323–328.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-959493>

Benguesmia, I. B., & Chellouf, I. (2024). Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aériens et racinaires de la plante *Medicago sativa* (Mémoire de Master). Université Constantine 1 Frères Mentouri, Algérie.

Boudraa, S., Hambaba, L., Zidani, S., & Boudraa, H. (2001). Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous-exploitées en Algérie : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L.* et *Zizyphus lotus L.* *Fruits* 65, 75–84. <https://doi.org/10.1051/fruits/20010003>

Boudraa, S., Hambaba, L., Zidani, S., Boudraa, H. (2010). Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L.* et *Zizyphus lotus L.* *Fruits* 65, 75–84. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/20010003>

Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 48-55.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.11.001>

Bouzid, W. (2009). Étude de l'activité Biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna Jacq.* Mémoire de Magister. Université Elhadj Lakhder – Batna, Algérie.

Brand –Williams, Cuvelier, M.E., & Bercet, C. (1995). Use of à free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Brosse, J. (2000). Larousse des arbres et des arbustes. Larousse (Ed). Canada, 576p.

Bruneton, J. (1996). Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales (2e éd.)Paris , Lavoisier.

C

Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, 14(3), 303-311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-r](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-r)

Chang, Q., Zuo, Z., Harrisson, F., & Chow, M. S. (2002). Hawthorn. J. Clin. Pharmacol, 42, 605-612. <https://doi.org/10.1177/00970002042006003>

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chemistry, 92, 491-497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.035>

Chebaibi, A., Rhazi Filali, F., Amine, A., & Zerhouni, M. (2011). In vitro bactericidal effect of aqueous extracts of Moroccan pomegranate leaves (*Punica granatum L.*) against multidrug-resistant bacteria. Phytothérapie, 9, 158-164. <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-011-0626-5>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound-assisted extraction of food and natural products. Ultrasonics Sonochemistry, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 18(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

Colmar, N. (2007). Étude de la voie de biosynthèse des fucoumarines : Qualité des fruits et métabolisme secondaire, technologie plante à traiter [Rapport de recherche, UMR INPL-ENSAIA / INRA Agronomie et Environnement].

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>

D

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Davies, J. R. (2000). Hawthorn. Element Books Limited, Boston, MA.

Degenring, F. H., Suter, A., Weber, M., & Saller, R. (2003). A randomised double-blind placebo-controlled clinical trial of standardised extract of fresh Crataegus berries in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. Phytomedicine, 10, 363-369. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00312>

Dinesh, K., Vikrant, A., Zulfiqar, A. B., Nisar, A. K., & Deo, N. P. (2012). The genus Crataegus: chemical and pharmacological perspectives. Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy). <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000094>

Djahira, A.B. (2014). Etude photochimique et activité antimicrobienne, antioxydant, anti hépatotoxique du marrube blanc ou Marrubium vulgare L. thèse : Doctorat en Biologie Végétale : Université Badji Mokhtar, Annaba.

Djerroumi, A., & Nacef, M. (2004). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Palais du Livre (p.51-108).

Dou, D., Leng, P., & Sun, Y. (2015). Comparative study of antioxidant compounds and antiradical properties of the fruit extracts from three varieties of *Crataegus pinnatifida*. Journal of Food Science and Technology, 52(1), 430–436.

<https://doi.org/10.1007/s13197-013-0954-6>

E

Edin, H., & Nimmo, M. (1999). Contrôle des denrées alimentaires. Laboratoire CANTONAL (Ed). Paris, 66p.

F

Falleh, H., Hafsi, C., Mohsni, I., & Ksouri, R. (2021). Évaluation de différents procédés d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale : *Verbena officinalis*. Biologie Aujourd'hui, 215(3-4), 133-142. <https://doi.org/10.1051/jbio/2021009>

Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité Chimique (novembre-décembre), 108-115.

Fichtner, A. & Wissemann, V. (2021). Biological Flora of the British Isles: *Crataegus monogyna*. Journal of Ecology, 109(1), 541–571. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13554>

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, 408(6809), 239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>

Fong, H. S., & Bauman, J. L. (2002). Hawthorn. Journal of Cardiovascular Nursing, 16(4), 1-8.

G

Garcia, M. D., Saenz, M. T., Ahumada, M. C., & Cert, A. (1997). Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. Journal of Chromatography, 76(7), 340-342.

Ghitescu, R. E., Wolf, I., Carausu, C., Bühlmann, A. M., Gilca, I. A. et Popa, V. I. (2015): Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood

bark. Ultrasonics Sonochemistry. 22, 535–541.

<https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2014.07.013>

Girre, L. (2000). Les plantes médicinales. Ouest-France (Ed). Rennes, 30p.

Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. Food Antioxidants, 1, 1-18.

Gourguillon, L., Destandau, E., Lobstein, A., & Lesellier, E. (2016). Comparison of different ways to extract dicaffeoylquinic acids from a halophytic plant. Comptes rendus chimie. ; 19(9):1133-41. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.009>

H

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd ed.). Clarendon Press.

Hamlaoui, M. (2018). Valorisation biochimique et comportement germinatif de *Crataegus monogyna Jacq.* du mont de Tessala (Algérie occidentale) [Thèse de doctorat, Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès]. Université Djillali Liabès. <http://cket.theses-algerie.com>

Hamdaoui, M., Mehdadi Z., & Chalane, F. (2015). "Evaluation quantitative de quelques polysaccharides pariétaux et polyphénols chez l'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna Jacq.*) du Mont de Tessala (Algérie Occidentale)". European Journal of Scientific Research, 128: 233-244. <http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C0415012>

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. Journal of Gerontology, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>

Hatano, T., Kusuda, M., inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya ,T., Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ,*Phytochemistry*, 66:2047-2055. <http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C0415012>

HE, J. & GIUSTI, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>

Hidayat, M. T., Koentjoro, M. P., & Prasetyo, E. N. (2023). Antimicrobial activity test of medicinal plant extract using antimicrobial disc and filter paper. *The Bioscientist*, 11(1). <https://e-journal.undikma.ac.id/index.php/bioscientist/article/view/7544>

Himed, L., Merniz, S., Monteagudo-Olivan, R., Barkat, M., & Coronas, J. (2019). Antioxidant activity of the essential oil of Citrus Limon before and after its encapsulation in amorphous SiO₂. *Scientific African*, 6, e00181. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00181>

J

Jeganathan, P. M., Venkatachalam, S., Karichappan, T & Ramasamy, S. (2014). Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box–Behnken design. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(1), 56-67. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.791629>

Joshi, L. S., & Pawar, H. A. (2015). Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research*, 3, 1-8. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6836.1000170>

Kashyap, C., Arya, V., & Thakur, N. (2012). Ethno medicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn. – A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, S1194–S1199. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60383-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60383-9)

Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, Ö. & Turkoglu, I. (2014). The investigation of some bioactive compounds and antioxidant properties of hawthorn (*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* Jacq). Journal of intercultural ethno pharmacology, 3(2), 51.
[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60383-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60383-9)

Kim, M., Ahn, J. W., Song, K., Paek, K. H., & Pai, H. S. (2002). Forkhead-associated domains of the tobacco NtFHA1 transcription activator and the yeast Fhl1 forkhead transcription factor are functionally conserved. Journal of Biological Chemistry, 277(41), 38781–38790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201559200>

Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V. S., Singh, L., & Kumar, S. (2021). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. Ultrasonics Sonochemistry, 70, 105325.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

L

Lakshmi, P. B., Mahesh, M., & Deepthi. (2012). Development and Validation of Nabumetone by isocratic RP-HPLC method. International Research Journal of Pharmaceutical, 2(2), 92-98.

Lazli, A., Beldi, M., Ghouri, L., & Nouri, N. E. H. (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous : (Parc National d'El Kala, Nord-Est Algérien). Bull. Soc. Roy. Sc. de Liège, 22–43. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.8429>

Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., Londoño, A.M., 2006. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rainforest of Colombia. Food Chemistry 95, 644– 652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.003>

Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., & Li, X. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molécules*, 21(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>

M

Maria, A., Vera, V., Juan, A., Monotoya, S., Calva, G., Emma, G., & Raminrez, R. (2005). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectin methylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. 5, 2-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.003>

Martinelli, F., Perrone, A., Yousefi, S., Papini, A., Castiglione, S., Guarino, F., & Salami, S. A. (2021). Botanical, phytochemical, anti-microbial pharmaceutical characteristics of hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq.*), Rosaceae. *Molecules*, 26, 72-66.
<https://doi.org/10.3390/molecules26237266>

Mathé, A. (2015). Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, pp.1-12.

Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255–O266.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>

Mebarki N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus Fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de Magister. Université M'Hahmed Bougara Boumardes. Algérie.

Mitchell, A. (1991). Tous les arbres de nos forêts. Bordas (Ed). Paris, 414p.

N

Nabet, N., Gilbert-Lópezb, B., Madani, Kh., Herreroc, M., Ibáñezc, E., & Mendiola, J.A.(2019). Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. Industrial Crops &Products, 129, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.032>

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Ngargueudedjim, K., Ngarmaïm, N., Bassa, B., Allarabeye, N., Annouar, D., AbdelRahim, M., Fotsing, B.S., Fogue, M. (2015). Caractéristiques physiques du bois Rônier (*Borassus aethiopum* Mart., Arecaceae) du Tchad / Afrique Centrale [Physical characteristics of tall-palm (*Borassus Aethiopum* Mart., Arecaceae) of Chad / Central Africa] 13 (3), 553. <http://www.ijias.issr-journals.org/>

Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Archives of Dermatological Research, 302(2), 71-83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>

Nohynek, L. J., Alakomi, H. L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. Nutrition and Cancer, 54(1), 18-32. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_4

O

Oueslati, K. (2017). Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande. Thèse de doctorat. Université Clermont Auvergne. France.

Öztürk, N., & Tunçel, M. (2011). Assessment of phenolic acid content and in vitro antiradical characteristics of hawthorn. Journal of Medicinal Food, 14(6), 664–669.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0063>

P

Perez-Lainez, M.D., Corona-Torres, T., García-Mateos, M.D.R., Winkler, R., Barrientos-Priego, A.F., Nieto-Ángel, R., Aguilar-Rincon, V.H., García- Velázquez, J.A. (2019). Metabolomic study of volatile compounds in the pigmented fruit from Mexico *Crataegus* genotypes. Journal of Applied Botany and Food Quality, 15-23.

Picó, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 43, 84-99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005>

Pittler, M. H., & Schmidt, K. (2003). Hawthorn extract for treating chronic heart failure. American Journal of Medicine, 114(8), 665-674. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(03\)00131-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(03)00131-1)

Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, G., & Wierzbicka, E. (2016). Effects of solvents and extraction methods on the content and antiradical activity of polyphenols from fruits *Actinidia arguta*, *Crataegus monogyna*, *Gaultheria procumbens* and *Schisandrachinensis*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia alimentaria, 15(1), 57-63.
<http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.6>

Pradal, D. (2016). Extraction assistée par ultrasons de composés bioactifs : application aux anthocyanes issues de co-produits de l'industrie agroalimentaire. Thèse de Doctorat en Ingénierie des Fonctions Biologiques, Université Lille 1, France.

Prouillac, C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organique et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France.

Q

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységú, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>

R

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Panala A., Yanh M., ET Rice-Evans C. (1999). Antioxydant activity applying and inapoved ABTS radical cation decolorization assay free radical biology and medicine, 26: 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

S

Saadoudi, M. (2007). Étude de la fraction glucidique des fruits de *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L.* et *Ziziphus lotus L.* Mémoire de Magister, Université de Batna.

Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 8:121-137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>

Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International* 38, 1023–1029. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.014>

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30:3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)

Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003>

Simirgiotis, M. J. (2013). Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*, 18(2), 2061-2080.
<https://doi.org/10.3390/molecules18022061>

Sparska, T. H., & Martin, T. (1999). Yields of hawthorn (*Crataegus monogyna*) berries under different hedgerow management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 72, 107-110. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(98\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(98)00165-0)

Svedstroma, U., Vuorela, H., Kostiainen, R., Leak, I., & Hiltunen, R. (2006). Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids, and flavonoids prior to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11(12), 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.080>

T

Tao, Y., & Sun, D.-W. (2015). Enhancement of food processes by ultrasound: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 570-594.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.667849>

Thangara J.H.S., Adjei O., Allen B. W and Portaels F., 2000. In-vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoterap*, p : 45 (2), 231-233.
Vidal. (2017, 22 décembre). *Phytothérapie* : Aubépine. VIDAL.
<https://doi.org/10.1093/jac/45.2.231>

V

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169. [https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j;ifset.2007.04.014)

W

Wagner, H. (1993). Pharmazeutische Biologie. Drogen und irhe inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verfag. SStuttgart-New-York, p: 50.

Wang L, Weller CL. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology. 17 (6):300-12.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

Y

Yalçın Dokumacı, K., Uslu, N., Haciseferogulları, H., & Örnek, M. N. (2021). Determination of some physical and chemical properties of common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq. var. *monogyna*). Erwerbs-Obstbau, 63, 99–106.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10341-021-00545-x>

Z

Zhang, D. L., Zhang, Y. T., Yin, J. J., & Zhao, B. L. (2004). Oral administration of Crataegus flavonoids protects against ischemia-reperfusion brain damage in gerbils. Journal of Neurochemistry, 90, 211-219. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02480.x>

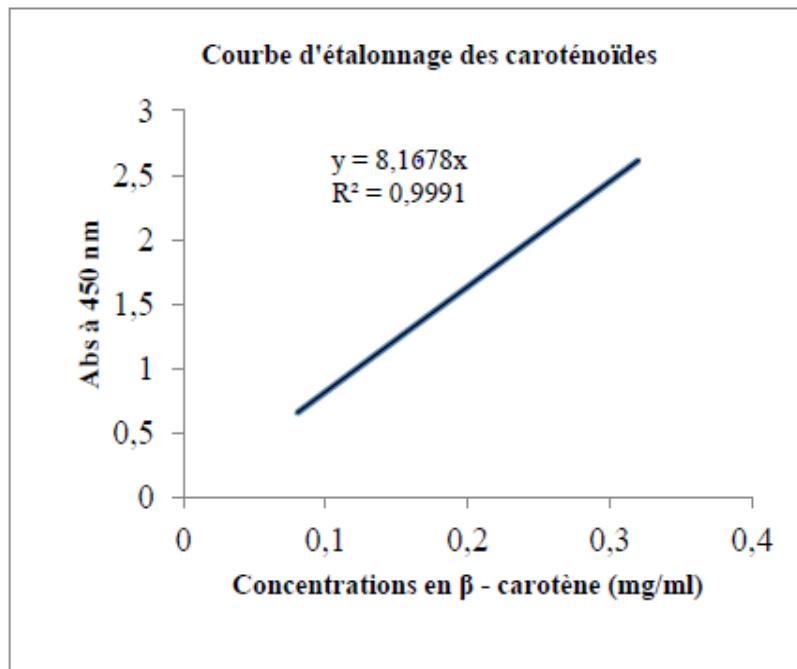
Zhang, X. (2002). WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 2. World Health Organization, 69-329.

Zhang, Z., Ho, W. K. K., Huang, Y., James, A. E., Lam, L. W., & Chen, Z.-Y. (2002). Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high-cholesterol diet. Journal of Nutrition, 132(1), 5-10. <https://doi.org/10.1093/jn/132.1.5>

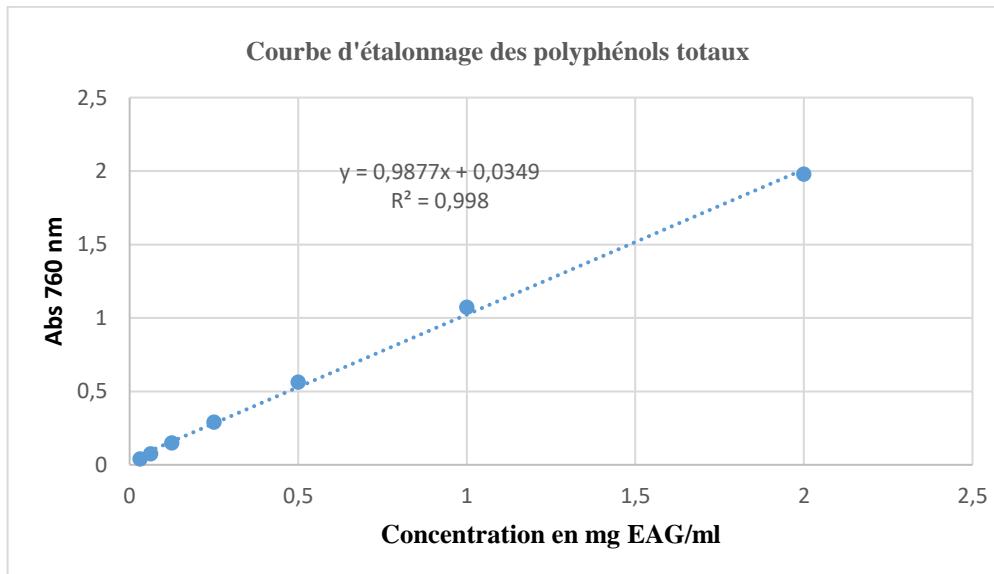
Zielonka, J., & Kalyanaraman, B. (2018). Small-molecule luminescent probes for the detection of cellular oxidizing and nitrating species. Free Radical Biology and Medicine, 128, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.032>

Annexes

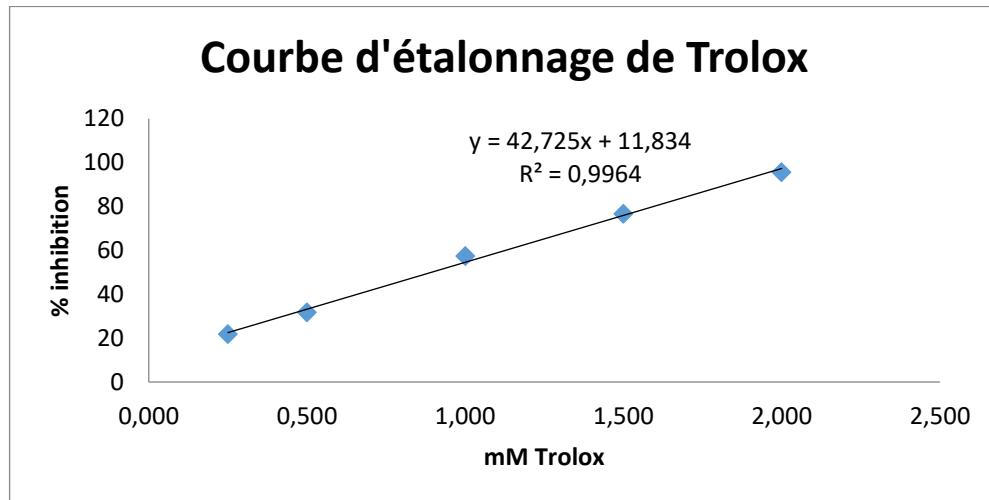
Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes



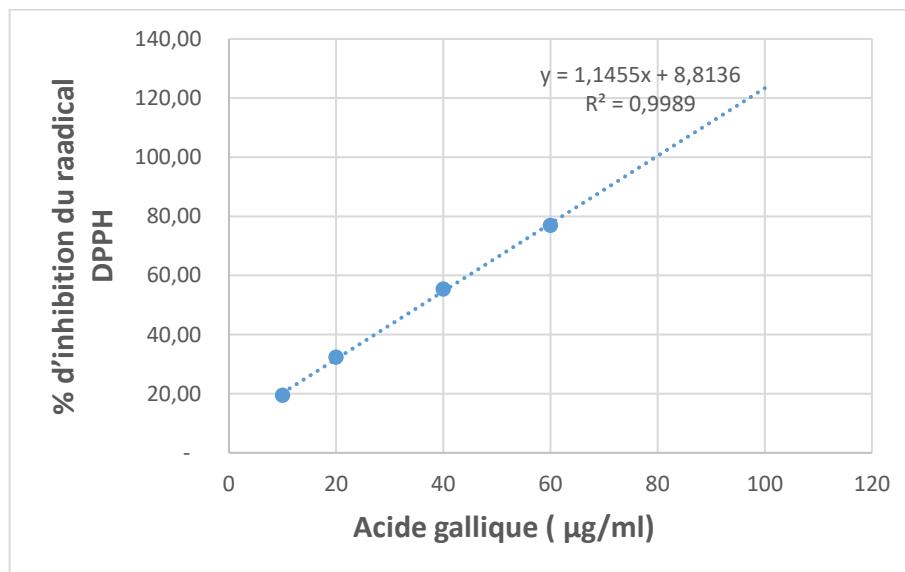
Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour la détermination des teneurs en polyphénols totaux



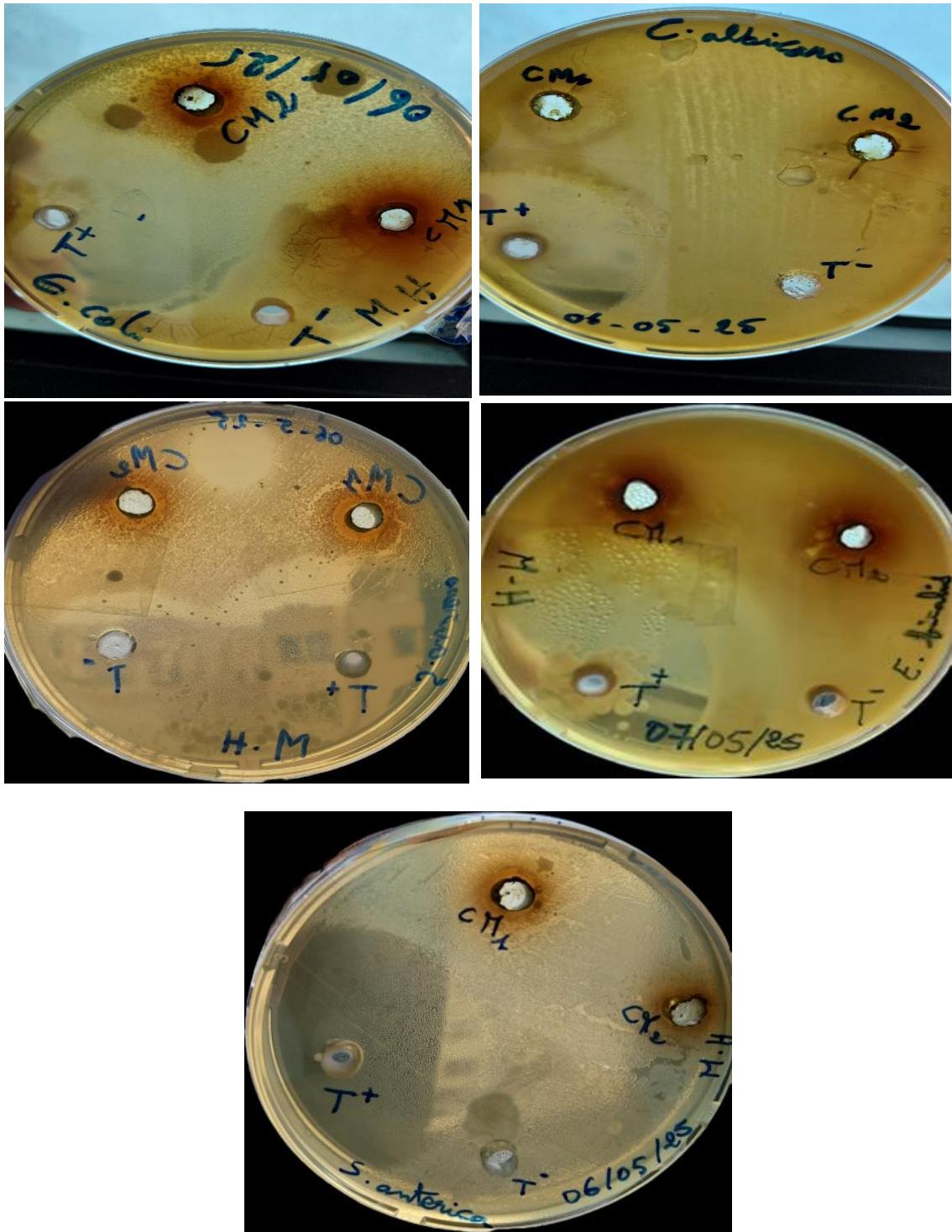
Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de piégeage des radicaux libres ABTS



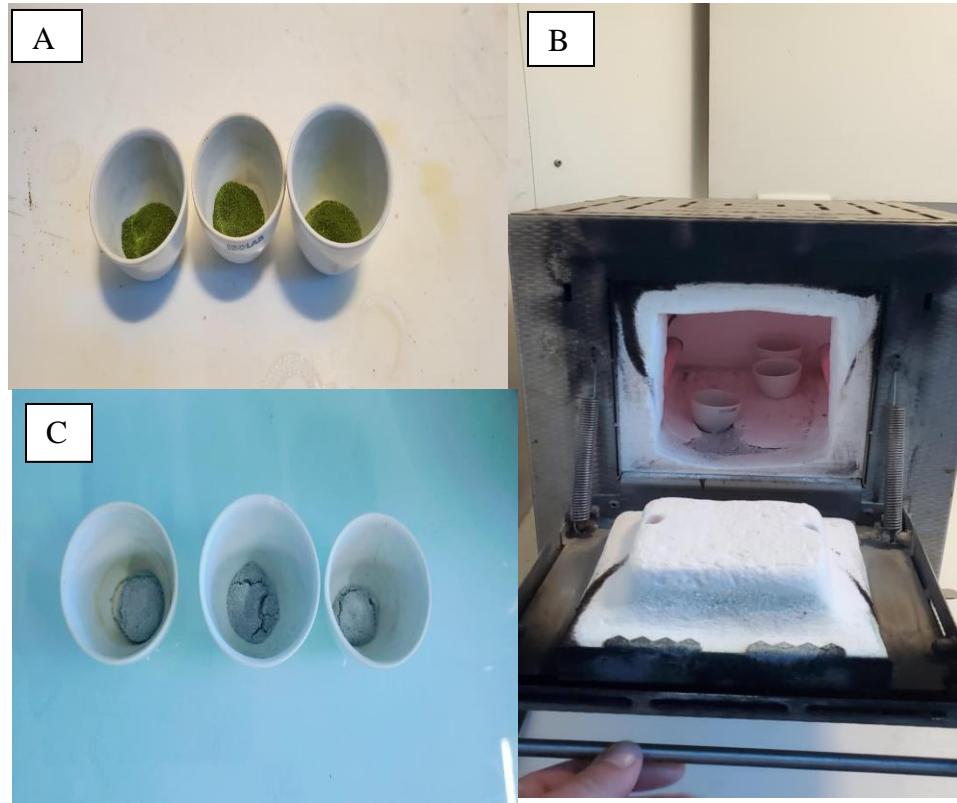
Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de piégeage des radicaux libres DPPH



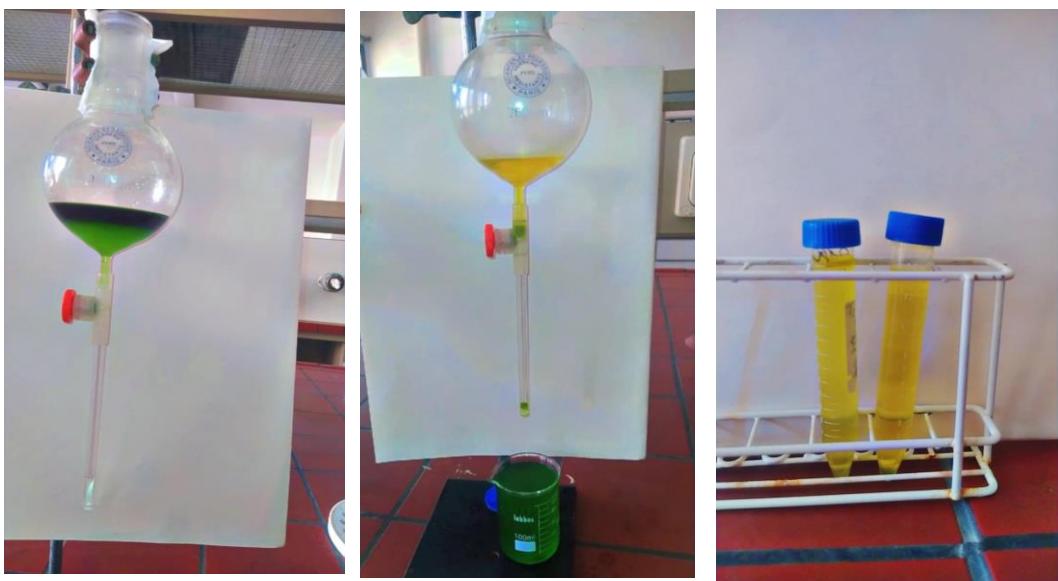
Annexe 5 : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait des feuilles de *C. monogyna* sur les souches testées.



Annexe 6 : Étapes de la détermination du taux de cendres : Les photos montrent les creusets contenant les échantillons avant (**A**) et après incinération (**C**), ainsi que l'utilisation du four à moufle pour la calcination (**B**).



Annexe 7 : Extraction des caroténoïdes et leur séparation



Résumé : Le but de ce travail est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante des feuilles de *Crataegus monogyna*, en utilisant une méthode d'extraction assistée par ultrasons combinée à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Afin de déterminer les bornes inférieures et supérieures des variables indépendantes une étude préliminaire a été effectuée. Trois variables indépendantes ont été testées : la température (45, 50 et 55°C), la concentration en éthanol (0, 50 et 100 %) et le temps d'extraction (5, 30 et 55 min). Trois réponses la teneur en polyphénols totaux (TPT), le piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS ont été déterminées. Par ailleurs, les taux d'humidité, de cendres et la teneur en caroténoïdes ont été déterminés. L'activité antimicrobienne de l'extrait de *C. monogyna* obtenu dans les conditions optimales d'extraction a été étudiée sur quatre bactéries : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella enterica* (Clinical strain), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et une levure *Candida albicans* (Laboratory strain) avec la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, ainsi sept concentrations de 10 à 120 µg/ml de l'extrait ont été utilisées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches sensibles. Le taux d'humidité, de centres et la teneur en caroténoïdes des feuilles de *C. monogyna* obtenus sont $39,64 \pm 1,47\%$; $7,65 \pm 0,28\%$ et $14,08 \pm 2,01$ mg de β-carotène/g MS, respectivement. L'optimisation des réponses des surfaces multiples des extraits de *C. monogyna* a permis d'obtenir les conditions optimales d'extraction suivantes : 52,44 °C, 45,40 min et 62,16 % en éthanol. Ces paramètres ont permis d'obtenir des TPT de 115,07 mg EAG/g MS ; un effet de piégeage du radical libre DPPH de 225,19 µg EAG/ml et un effet de piégeage du radical cationique ABTS de 84,59 mmol ET/g MS. L'extrait de *C. monogyna* montre un faible effet antibactérien sur toutes les souches testées avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 11 à 13 mm. En revanche, *Enterococcus faecalis* n'a montré aucune sensibilité vis-à-vis de l'extrait testé. Une CMI de 60 µg /ml a été obtenue sur les deux souches *E. coli* et *S. aureus*. Alors qu'une CMI de 120 µg /ml a été obtenue dans le cas de *C. albicans*. Par ailleurs, les CMIs obtenues indiquent un effet bactériostatique et fongistatique.

Mots clés : ABTS, Activité antimicrobienne, Caroténoïdes, *Crataegus monogyna*, Concentration minimale inhibitrice (CMI), DPPH, Extraction assistée par ultrasons (EAU), Optimisation, Plan d'expérience (RSM) et Polyphénols.

Abstract: The aim of this study was to optimize the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from *Crataegus monogyna* leaves using ultrasound-assisted extraction (UAE) method combined with response surface methodology (RSM). A preliminary study was conducted to determine the lower and upper bounds of the independent variables. Three independent variables were tested: temperature (45, 50, and 55 °C), ethanol concentration (0%, 50%, and 100%), and extraction time (5, 30, and 55 minutes). Three responses were measured: total phenolic content (TPC), DPPH free radical scavenging activity, and ABTS radical cation scavenging activity. Furthermore, the moisture content, ash content, and carotenoid content were determined. The antimicrobial activity of the *C. monogyna* extract obtained under optimal extraction conditions was evaluated against four bacterial strains :*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* (Clinical strain), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and one yeast strain: *Candida albicans* (laboratory strain) using the Mueller-Hinton agar diffusion method. Seven extract concentrations ranging from 10 to 120 µg/mL were tested to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the sensitive strains. The moisture, ash, and carotenoid contents of *C. monogyna* leaves were found to be $39.64 \pm 1.47\%$, $7.65 \pm 0.28\%$, and 14.08 ± 2.01 mg β-carotene/g dry matter (DM), respectively. Optimization of the multiple surface responses yielded the following optimal extraction conditions: 52.44 °C, 45.40 minutes, and 62.16% ethanol. Under these conditions, the extract showed a TPC of 115.07 mg GAE/g DM, a DPPH scavenging capacity of 225.19 µg GAE/mL, and an ABTS scavenging activity of 84.59 mmol TE/g DM. The *C. monogyna* extract exhibited weak antibacterial activity against all tested strains, with inhibition zone diameters ranging from 11 to 13 mm. However, *Enterococcus faecalis* was not sensitive to the extract. MICs of 60 µg/mL were obtained for *E. coli* and *S. aureus*, and 120 µg/mL for *C. albicans*. These MICs values suggest a bacteriostatic and fungistatic effect of the extract.

Keywords: ABTS, Antimicrobial activity, Carotenoids, *Crataegus monogyna*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), DPPH, Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), Optimization, Response Surface Methodology (RSM), Phenolic compounds.