

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

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologique
Spécialité : Science Alimentaires
Option : Bioprocédés et Technologie Alimentaire



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude des conditions d'extraction des polyphénols
d'*Erica multiflora* par un plan d'expérience**

Présenté par :

IAMARENE Baya & MEKHAZNI Linda

Soutenu le : **16 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M ^{elle} Brahmi F	MAA	Président
M ^{me} Bouchefa-Gendouze N	MAA	Encadreur
M ^{me} Adrar S	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le Bon Dieu pour sa Bienveillance, de nous avoir donné la force, la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire et nous a guidé au chemin du savoir.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements

A Mme Guendouze Naima d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir conseillé et guidé et pour les efforts qu'elle a consenti tout au long de la réalisation de ce modeste travail, et pour l'aide et l'intérêt qu'elle nous a apporté.

Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles.

Nos sincères remerciements vont aussi :

A Mme Brahmi d'avoir accepté la présidence du jury,

A Mme Adrar d'avoir accepté, d'examiner et d'évaluer notre travail.

Sans oublier les personnes de laboratoire d'analyse instrumentale Mme Yalaoui D, Mr Kherbache Y et la doctorante Akila et,

À tous les étudiants de magistère de la promotion 2016.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Merci



Dédicaces

Je dédie ce travail

Tout d'abord et spécialement à mes parents pour leurs encouragements, tendresse, disponibilité et leurs sacrifices durant toutes mes années d'étude, c'est grâce à eux que je suis arrivée à cette étape de ma vie merci ma mère, merci mon père.

Mes frères Farouk et Hakim

Mes sœurs Nabila et sa famille, Sabrina et sa famille, Saida et Habiba

Et à toutes ma grande famille pour leur soutien morale et physique.

À Mme Allili Samira pour ces conseils et ces encouragements

Mes oncles et leur famille

Mes cousins et cousines

À toutes mes amies « Saida, Dalila, Linda, Saloua, Hania et Radia »

À ma binôme Linda et sa famille

À toute la promotion 2016

À tous ceux qui nous ont aidés pour réaliser ce travail de près ou de loin.

Baya





Dédicaces

Je dédie ce travail

Je dédie ce travail à toutes celle et tous ceux qui ont eu la volonté de devenir un jour des vrais professionnels dans le domaine des sciences et de la recherche.

(Et que dieu nous vienne en aide dans la voie du savoir et de la connaissance).

Mes chers parents, pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites

Mes chers grands-pères et grands-mères

Mon frère Rochdi et Mes Bou frère A-Hamid et Farès

Mes sœur Amel, Kahina, Souhila et Lydia.

Mes très chère Nièces Maria et Aya

Tous mes proches

Mes amis

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire

QUE DIEU NOUS PROTEGENT

Linda



Liste des figures

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Répartition mondiale des Ericacées.	2
2	Photographie d' <i>Erica multiflora</i> .	3
3	Structure du noyau phénol.	5
4	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.	6
4	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.	6
5	Structure générale des flavonoïdes.	6
6	Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotannin.	7
7	Formation des espèces oxygénées activées (EOA).	9
8	Action des enzymes antioxydantes sur la cascade radicalaire.	10
9	Photographie d' <i>E. multiflora</i> .	12
10	Principe de la réduction du réactif de Folin Ciocalteu.	15
11	Schéma représentatif du protocole de dosage des polyphénols.	16
12	Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.	16
13	Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des flavonoïdes.	17
14	Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des tanins.	18
15	Schéma représentatif du protocole expérimental de la méthode au phosphomolybdate d'ammonium.	19
16	Réaction de réduction du DPPH.	20
17	Schéma représentatif du protocole de détermination de l'activité antioxydante par test au DPPH.	20
18	Variation de la teneur en composés phénoliques selon l'organe de la plante.	22
19	Effet du type de solvant sur l'extraction des polyphénols.	23
20	Effet du type du ratio du solvant sur l'extraction des polyphénols.	24
21	Effet de la quantité de la poudre de plante sur la teneur en polyphénols.	25
22	Effet du temps de macération sur la teneur en polyphénols.	25
23	Plan de prédiction réelle d' <i>Erica multiflora</i> .	28
24	Surface de réponse de l'interaction (quantité de poudre de plante-temps d'extraction).	29
25	Teneur en polyphénols totaux.	31
26	Teneur en flavonoides.	32
27	Teneur en tanins.	33
28	Activité antioxydante de l'extrait et de l'acide gallique par le phosphomolybdate d'ammonium.	34
29	Effet scavenger de l'extrait et de l'acide gallique vis-à-vis du DPPH°.	35

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Les noms vernaculaires d' <i>Erica multiflora</i> L.	2
II	Classification botanique d' <i>Erica multiflora</i> .	3
III	Propriétés biologiques des composés phénoliques.	8
IV	Niveaux des variables choisis pour les essais	26
V	Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience composite centré.	27
VI	Analyse de la variance (ANOVA).	29

Liste des abréviations

Liste des abréviations

- A_{ext}** : Absorbance de l'extrait.
- AG** : Acide Gallique.
- ANOVA**: Analyse de variance.
- ATP** : AdénosineTriPhosphate.
- BSA** : Sérum Albumine Bovine.
- CAT** : Catalase.
- DPPH** : 1,1-DiPhényle-2-PicrylHydrazyl.
- EAG** : Equivalant Acide Gallique.
- EAT** : Equivalant Acide Tannique.
- EC** : Equivalant Catéchine.
- EQ** : Equivalant Quercétine.
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.
- Flav** : Flavonoides.
- GP_x** : Glutathion Peroxydase.
- GSH** : Glutathion réduit.
- GSSG** : Glutathion oxydé.
- H₂O₂**: Peroxyde d'hydrogène.
- IC₅₀**: Concentration Inhibitrice de 50% d'un radical.
- MS** : Matière Sèche.
- OH** : Radical libre hydroxyle.
- ¹O₂** : Oxygène singulet.
- PT** : Polyphénols Totaux.
- SOD**: SuperOxyde Dismutase.
- SDS**: Sodium Dodecyl Sulfate.
- TEA**: TriéthanolAmine.

Table des matières

Table de matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

I. Généralités sur la plante *Erica multiflora* 2

I.1. Présentation de la famille des Ericacées 2

I.2. Présentation du genre *Erica* 2

I.3. Présentation de l'espèce *Erica multiflora* 2

I.3.1. Noms vernaculaires 2

I.3.2. Aspect botanique 3

I.3.3. Position systématique 3

I.3.4. Habitat 4

I.3.5. Répartition géographique 4

I.3.6. Composition chimique

I.3.7. Usage traditionnel et propriété thérapeutiques 4

II. Généralités sur les polyphénols 5

II.1. Définition 5

II.2. Biosynthèse des polyphénols 5

II.3. Classification des polyphénols 5

II.3.1. Polyphénols simples 6

II.3.1.1. Acides phénoliques 6

II.3.1.2. Flavonoïdes 6

II.3.1.3. Polyphénols complexes (tanins) 7

II.4. Propriétés des polyphénols 7

III. Activité antioxydante 9

III.1. Radicaux libres 9

III.2. Stress oxydant 9

III.3. Mécanisme de l'oxydation 10

III.4. Système antioxydant 10

	3
I.3.3.Position systématique	3
I.3.4.Habitat	4
I.3.5.Répartition géographique	4
I.3.6.Composition chimique	
I.3.7.Usage traditionnel et propriété thérapeutiques	4
II. Généralité sur les polyphénols	5
II.1.Définition	5
II.2. Biosynthèse des polyphénols	5
II.3. Classification des polyphénols	5
II.3.1. Polyphénols simples	6
II.3.1.1. Acides phénoliques	6
II.3.1.2. Flavonoïdes	6
II.3.1.3. Polyphénols complexes (tanins)	7
II.4. Propriétés des polyphénols	7
III. Activité antioxydante	9
III.1.Radicaux libres	9
III.2.Stress oxydant	9
III.3. Mécanisme de l'oxydation	10
III.4. Système antioxydant	10
III.4.1. Système antioxydant enzymatique	10
III.4.2.Système antioxydant non enzymatique	11
III.4.2.1.Vitamine C	11
III.4.2.2.Vitamine E	11
III.4.2.3. Caroténoïdes	11
III.4.2.4. Composés phénoliques	11
Partie expérimentale	
III. Matériel végétal	12
III.1. Description du matériel végétal	12
III.1.1. Récolte des échantillons	
III.1.2. Traitement des échantillons	12

III.1.3. Extraction	13
III.2. Optimisation de l'extraction des polyphénols	14
III.2.1. Analyse phytochimique	15
III.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux	15
III.2.1.2. Dosage des flavonoïdes	16
III.2.1.3. Dosage des tanins	16
III.2.2. Détermination de l'activité antioxydante	18
III.2.2.1. Test au molybdate d'ammonium	19
III.2.2.2. Test au DPPH	19
III.3. analyse statistique	20
IV. Résultats et discussions	22
IV.1. Optimisation et condition d'extraction des polyphénols	22
IV.1.1. Etude préliminaire	22
IV.1.2. Plan d'expérience composite centré	26
IV.1.3. Validation du model	27
IV.1.4. Coefficient de corrélation	27
IV.1.5. Effet des facteurs (coefficients)	27
IV.1.6. Effet d'interaction	28
IV.1.7. Model mathématique	29
IV.2. Analyse phytochimique de l'extrait optimisé	30
IV.2.1. Dosage des polyphénols	30
IV.2.2. Dosage des flavonoides	32
IV.2.3. Dosage des tanins	33
IV.3. Détermination de l'activité antioxydante	33
IV.3.1. Test au phosphomolybdate d'ammonium	33
IV.3.2. Test utilisant le radical DPPH°	34
Conclusion	36
Références bibliographiques	37
Annexes	



Introduction

Introduction

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Elles sont utilisées aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie ; elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus [Larousse. \(2001\)](#).

Les composés phénoliques sont comptés parmi ces principes actifs. Ils suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes [Rock. \(2003\)](#).

L'importance des antioxydants d'origine naturelle ne cesse de croître ces derniers temps. Ces antioxydants, en tant que constituants alimentaires, semblent contribuer de manière significative à la prévention de certaines maladies comme, le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses [Berger. \(2006\)](#). Les mécanismes d'action de l'activité antioxydante sont divers. Ils impliquent la neutralisation des radicaux libres, la complexation d'ions, des métaux de transition et la réduction des phénomènes oxydatifs et du vieillissement cellulaire [Djeridane et al. \(2006\)](#).

Vue leur grande diversité structurale, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié pour l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante [Nacz et Shahidi. \(2006\)](#).

Le présent travail porte sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora* par le plan d'expérience. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle locale pour soigner les brûlures et les blessures.

Cette étude est divisée en deux parties :

- Une synthèse bibliographique comportant des généralités sur la plante étudiée, les composés phénoliques et l'activité antioxydante.
- Une étude expérimentale incluant l'optimisation de l'extraction d'*Erica mutliflora*, dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoides et tanins) et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait optimisé.

Partie bibliographique

I.1. Présentation de la famille des Ericacées

Les Ericacées sont une grande famille cosmopolite représentée par 4100 espèces regroupées dans 124 genres [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#). Elles sont rencontrées dans les régions froides et tempérées des deux hémisphères, ainsi que dans les montagnes des régions tropicales [Brosse et al. \(2010\)](#). La diversité la plus élevée est présentée dans la région méditerranéenne [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#) (figure 1). Cette famille comprend des arbustes ou des arbrisseaux, et rarement de petits arbres. Elles sont caractéristiques des terres pauvres, acides et sablonneuses [Brosse et al. \(2010\)](#).

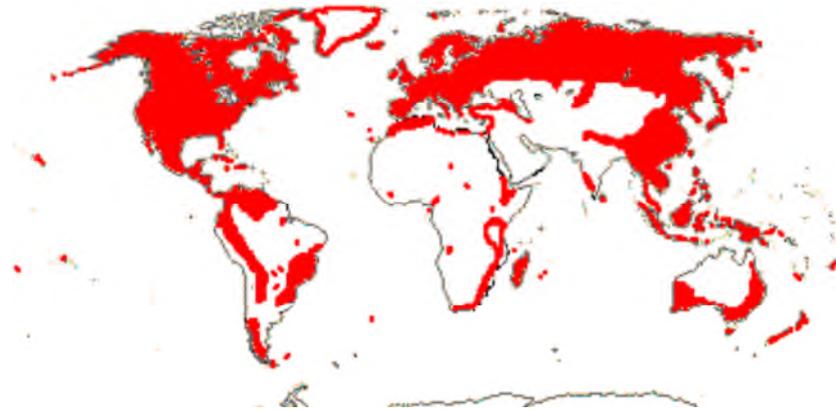


Figure 1: Répartition mondiale des Ericacées [Lhuillier. \(2007\)](#).

I.2. Présentation du genre *Erica*

Ce genre renferme environ 500 espèces de bruyères dites « cendrées » ([Brosse, 2010](#)). Chez les bruyères proprement dites (genre *Erica*), la corolle rose est nettement en forme de grelot et les sépales petits et verts [Guignard. \(2001\)](#) ; leur feuillage est persistant; aciculaire, à bords révolutes, et verticillé [Brosse. \(2010\)](#).

I.3. Présentation de l'espèce *Erica multiflora*

I.3.1. Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires d'*Erica multiflora* L sont présentés dans le tableau I.

Tableau I: Les noms vernaculaires d'*Erica multiflora* L [Ait Youssef. \(2006\)](#).

Langue	Noms
Arabe et berbère	Khlenj, halenj, buheddad, ariga, nuwarasamal, khleng, chendak.
Français	Bruyère multiflore ou bruyère a fleurs nombreuses.
Anglais	Mediterranean Heath.

I.3.2. Aspect botanique

Erica multiflora appelée aussi « bruyère à nombreuses fleurs », est un arbuste assez petit de moins de 1m, densément ramifiée et de couleur sombre. Sa floraison est automnale et hivernale, d’Août à Janvier. Elle possède des feuilles longues et à inflorescence, caractérisée par des fleurs regroupées en manchon situé non loin de l’extrémité d’un rameau mais surmonté d’une partie feuillée dépourvue de fleurs. Les fleurs sont de couleur rose, pédonculées, a belles corolles ovale, à anthères sans appendice mais dépassant très nettement la corolle [Boucher et Doux. \(2011\)](#) (figure 2).



Figure 2: Photographie d'*Erica multiflora* [Bayer et al. \(1990\)](#).

I.3.3. Position systématique

La classification taxonomique d'*Erica multiflora* est présentée dans le tableau II.

Tableau II : Classification botanique d'*Erica multiflora* [Guignard. \(2001\)](#).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétale
Embranchement	Spermaphytes
Sous- Embranchement	Angiospermes
Classe	Astéridées
Ordre	Ericales
Famille	Ericacées
Genre	<i>Erica</i>
Espèce	<i>Erica multiflora</i>

I.3.4.Habitat

Erica multiflora présente un habitat caractérisée généralement par une faible disponibilité en nutriments, un faible taux de matières organiques et souvent une période de sécheresse [Lhuillier. \(2007\)](#). Elle ne peut pas tolérer un substrat dont le pH est inférieur à 6, mais elle s'accommode à des pH supérieur à 8 [Bellarmin et Tabani. \(1992\)](#).

I.3.5.Répartition géographique

E. multiflora est présente au Maroc, en Tunisie et en France. En Algérie, elle est commune sur tout le littoral ; elle pousse surtout dans les garrigues et elle est très rare en petite Kabylie [Ait Youssef. \(2006\)](#).

I.3.6. Composition chimique

L'étude phytochimique d'*Erica multiflora* a montré qu'elle contient plusieurs principes actifs tels que les flavonoïdes, les tanins, les proanthocyanidines, les coumarines, les triterpénoïdes et les huiles essentielles [Akkol. \(2007\)](#) ; [Harnafi et al. \(2007\)](#).

Les tanins, les proanthocyanidols et les flavonoïdes représentent les principaux composés des fleurs [Bruneton. \(1987\)](#).

Selon [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#), les parties fleuries d'*Erica multiflora* renferme des flavonoïdes comme le kaempférol, la quercétine et la naringine, et des acides phénoliques comme l'acide caféique et l'acides p-coumarique.

I.3.7. Usage traditionnel et propriétés thérapeutiques

Erica multiflora est souvent utilisée en tant qu'outil thérapeutique alternative à traiter l'hypertension inflammatoire. Elle est également utilisée dans la médecine traditionnelle comme un agent diurétique et antiseptique [Kawano et al. \(2009\)](#). Les sommités de leur fleurs sont employés pour traiter l'hyperlipidémie [Harnafi et al. \(2007\)](#).

Cette espèce est utilisée pour soigner l'athérosclérose et le cancer de la prostate [Ait Youssef. \(2006\)](#). Elle est aussi considérée comme un agent curatif de blessure, sédatif, et astringent [Rios et al. \(1987\)](#).

II. Généralités sur les polyphénols

II.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des végétaux qui disposent d'une extrême variété de structures et d'activité biologiques [Bouayed. \(2008\)](#). Ils sont présents dans toutes les parties des plantes [Boubekri. \(2014\)](#) ; [Mohammedi. \(2006\)](#).

Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés. [Salta et al. \(2007\)](#) ; [Japon-Lujan et al. \(2008\)](#). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction [Omar. \(2010\)](#) ; [karabourniotis et Fasseas. \(1996\)](#) (figure 3). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 [Boubekri. \(2014\)](#) ; [Harbone. \(1993\)](#).

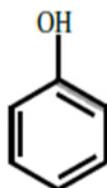


Figure 3: Structure du noyau phénol. [Sarni-Manchado et Cheynier. \(2006\)](#).

II.2. Biosynthèse des polyphénols

[Brich et Donovan. \(1953\)](#) ont apporté la première confirmation de la possibilité de formation de noyau aromatique à partir d'une unité acétate. Alors que [Davis. \(1955\)](#) a démontré la formation de composés aromatiques à partir des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique.

[Chavez. \(1996\)](#) et [Richter. \(1993\)](#) ont décrit la biosynthèse de phénols naturels des plantes par deux voies majeures: la voie shikimate et la voie acétate, ou leur combinaison.

II.3. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Il y a deux catégories de composés: les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [Clifford. \(1999\)](#) ; [D'Archivio et al. \(2007\)](#).

II.3.1. Polyphénols simples

I.3.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes, les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) (figure 4 (a)) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3) (figure (b)) Bruneton. (1999) ; Liu. (2004).

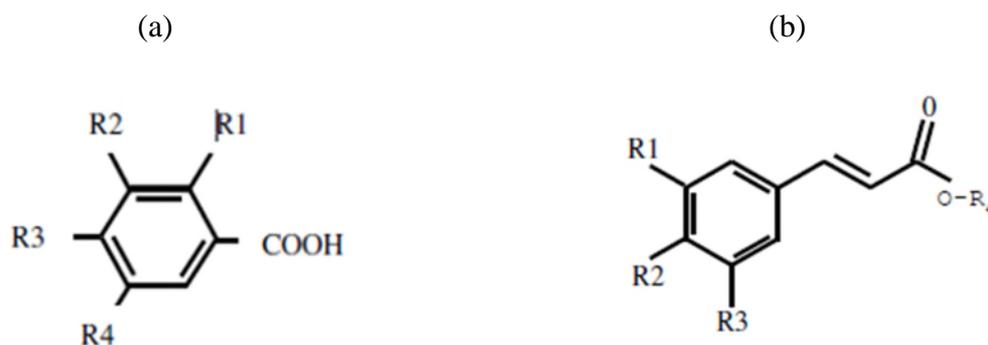


Figure 4 : Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (a) et Structure chimique des acides hydroxycinnamiques (b).

II.3.1.2. Flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Ils constituent un groupe de plus de 4000 composés naturels et sont des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux Agrawal et Markham. (1989) ; Lhuillier. (2007).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés en une configuration C6-C3-C6 Belyagoubi-Benhammou. (2012) ; Bruneton. (1999) (figure 5).

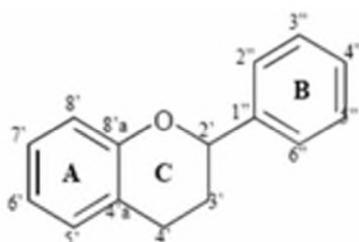


Figure 5 : Structure générale des flavonoïdes Balasundram et al. (2005).

II.3.1.2. Polyphénols complexes (tanins)

Le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, d'où leur capacité à tanner le cuir [Rodrigues. \(2008\)](#). Ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons, les tanins sont caractérisés par une saveur astringente [Belyagoubi-Benhammou. \(2011\)](#), dépourvus de toxicité et sont utilisés en tant que remède dans certains cas d'empoisonnement [Buchala. \(2007\)](#).

Il y a deux groupes de tanins différents par leur structure et leur origine biogénétique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les premiers sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés (figure 6 (a)), et les seconds sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (figure 6 (b)) [Rezaire. \(2012\)](#).

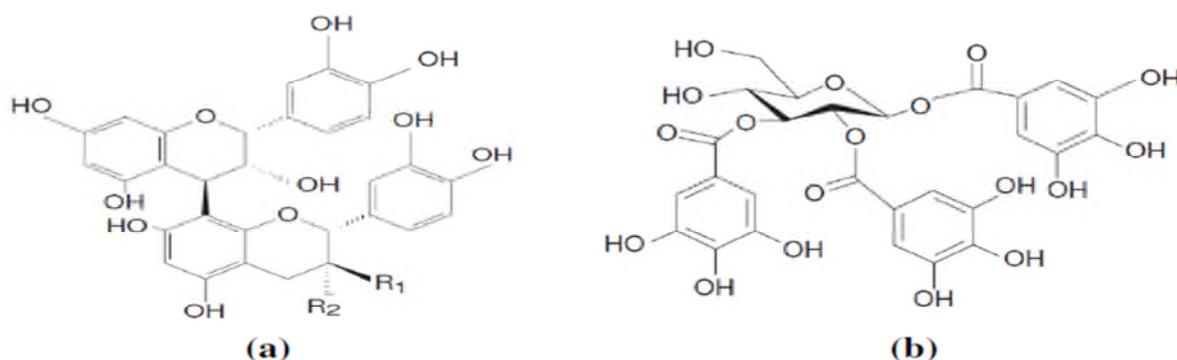


Figure 6 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin [Ribereau-Gayon. \(1968\)](#).

II.4. Propriétés des polyphénols

Les recherches sur les composés phénoliques sont en générale très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques [Belyagoubi-Benhammou. \(2012\)](#) (tableau III).

Tableau III: Propriétés biologiques des composés phénoliques.

Composé phénolique	Propriétés biologiques	Références
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	<ul style="list-style-type: none"> - Antibactériens - Antifongiques - Antioxydants 	Bahorun (1999) Bruneton (1999) Leitao (2011)
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Antitumorales - Anticarcinogènes - Anti-inflammatoires - Hypotenseurs et diurétiques - Antioxydants - Antibactériens - Antivirales Antiallergique 	Bahorun (1999) Bruneton (1999) Bylka et al. (2004) Decloitre (1993) Hertog (1996) Leitao (2011) Marfak (2003) Nkhili (2009)
Proanthocyanidines	<ul style="list-style-type: none"> - Effets stabilisants sur le collagène - Antioxydants - Antitumorales - Antifongiques et antibactérien - Anti-inflammatoires - Antidiarrhéique - Effet vasoconstricteur 	Bahorun (1999) Bruneton (1999) Leitao (2011) Max et Robert (2003) Rezaire (2012) Zeghad (2008)
Tanins galliques et catéchiqes	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydants 	Leitao (2011)

III. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules du corps contre les dommages causés par les radicaux libres [Mokrani et al. \(2009\)](#). Ils rentrent en compétition avec d'autres substrats oxydables et retardent ainsi ou empêchent l'oxydation de ces substrats [Ladoh et al. \(2014\)](#). Ils jouent un rôle important dans la prévention des maladies telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer [Meddour et al. \(2011\)](#).

III.1.Radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries [Muanda. \(2010\)](#). L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) [Favier. \(2003\)](#) (figure 7).

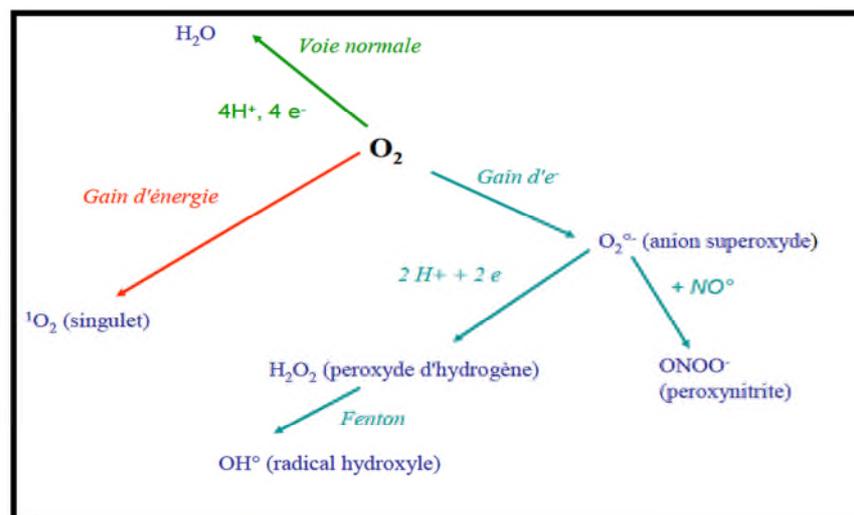


Figure 7 : Formation des espèces oxygénées activées [Obame Engonga. \(2009\)](#).

III.2.Stress oxydant

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [Obame Engonga. \(2009\)](#).

Les dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules [Ghedadha et al. \(2015\)](#).

III.3. Mécanisme de l'oxydation

L'oxydation est un phénomène complexe qui met en jeu des espèces moléculaires très réactives et qui se traduit par le rancissement de graisses, la rouille des métaux et la flétrissure des fruits et légumes [Judde. \(2004\)](#) ; [Rolland. \(2004\)](#). Elle est initiée par la lumière, la chaleur, ou les traces de métaux lourds (Cu^{2+} et Fe^{3+}). Cette réaction est au départ très lente, puis s'accélère de façon exponentielle. Elle se déroule en trois étapes : initiation, propagation et terminaison [Bouras \(2004\)](#). Les réactions radicalaires sont d'autant plus destructrices qu'elles se propagent en chaîne : les molécules déstabilisées par un électron célibataire deviennent à leur tour des radicaux libres [Manach et al. \(2004\)](#).

III.4. Système antioxydant

Afin de contrer les effets néfastes des ERO, notre organisme possède des molécules à activité antioxydante de nature enzymatique ou non enzymatique [Tabart. \(2011\)](#).

III.4.1. Système antioxydant enzymatique

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de O_2^- et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire [Lehucher-Michel et al. \(2001\)](#) (figure 8).

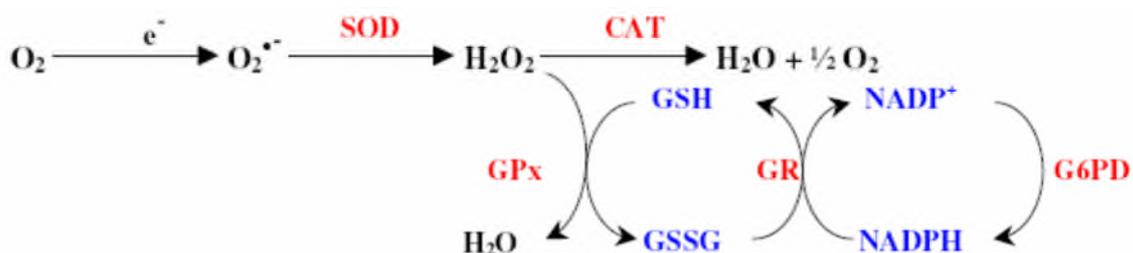


Figure 8 : Action des enzymes antioxydantes sur la cascade radicalaire [Lehucher-Michel et al. \(2001\)](#).

III.4.2. Système antioxydant non enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation [Kanoun. \(2011\)](#).

Les meilleurs antioxydants exogènes sont la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols [N'Guessan et al. \(2009\)](#).

III.4.2.1. Vitamine C

C'est un antioxydant puissant. Elle fonctionne avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour arrêter des radicaux. Elle est largement présente dans les fruits et légumes frais. Elle est instable à la chaleur et à la lumière UV [Cheick-Traoré. \(2006\)](#).

III.4.2.2. Vitamine E

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. Elle est retrouvée dans les huiles végétales, les amandes, les graines, le lait, les œufs, les légumes à feuilles vertes [Muanda. \(2010\)](#).

III.4.2.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes font partie des micronutriments qui participent à la défense de l'organisme contre les espèces réactives de l'oxygène, et par conséquent, contribuent à prévenir diverses pathologies. Ce sont essentiellement des piègeurs de l'oxygène singulet; mais ils peuvent également neutraliser les radicaux libres [Armand. \(2009\)](#).

III.4.2.4. Composés phénoliques

Les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, en pharmacie et en cosmétique [Bougandoura, Bendimerad. \(2012\)](#).

Partie expérimentale

III. Matériel végétal

III.1. Description du matériel végétal

E. multiflora est un arbrisseau qui n'atteint pas 60 cm de long, ses feuilles sont verticillées, de 4 à 7 mm de longueur, alors que ses fleurs sont d'un rose très foncé et les graines sont de couleur marron (figure 9).



Figure 9 : Photographie d'*E. multiflora*.

III.1.1. Récolte des échantillons

Les échantillons ont été récoltés en décembre 2015 dans la région d'Ait Guendouze dans la commune de Boukhelifa dans la wilaya de Bejaia. Ce site est une montagne de 1297 m où les conditions climatiques favorisent sa croissance.

[Kool et Laruelle. \(1964\)](#) préconisent la récolte le matin pour éviter les effets de la rosée et des grandes chaleurs.

Chaque individu fait l'objet d'un prélèvement au hasard sur plusieurs arbrisseaux.

III.1.2. Traitement des échantillons

Un nombre de traitements initiaux sont nécessaires en vue d'obtenir des extraits de plante sur lesquels différentes analyses seront réalisées. Le dosage de quelques types de polyphénols (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) et l'étude de l'activité antioxydante. Avant de procéder à ces analyses, plusieurs extractions ont été réalisées en vue de déterminer l'extrait qui présente la plus grande quantité de polyphénols totaux.

Les échantillons récoltés ont été nettoyés avec de l'eau, puis séchés à l'air libre pendant quelques jours. Ensuite, un triage a été réalisé en vue de séparer les différents organes de la plante : tiges, feuilles, fleurs et graines.

Chaque organe de la plante et la plante entière ont été broyés séparément à l'aide d'un moulin à café. Les poudres obtenus sont conservées dans des flacons en verre bien fermés jusqu'à l'utilisation ultérieure.

III.1.3. Extraction

Ce travail vise l'optimisation des paramètres d'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora*, en faisant varier le solvant d'extraction, la durée de l'extraction, le ratio échantillon/solvant utilisée. Cette optimisation a été réalisée par le plan d'expérience.

La méthode consiste à faire macérer une quantité de poudre de plante dans un solvant sous agitation magnétique pendant une certaine durée. Après macération, les solutions obtenues ont été filtrées à l'aide d'un papier filtre. Ces dernières sont conservées au froid à 4°C afin de les utiliser dans les différentes analyses.

➤ Effet de l'organe de la plante

1,25 g de poudre de chaque organe de plante (tige, feuilles, fleurs, graines), ainsi que des mélanges équimolaires de poudres de deux organes (tige-graine, tige-feuille, tige-fleur, graine-feuille, graine-fleur, feuille-fleur) ont été macérés dans 25 mL de méthanol, ensuite porter à l'agitation magnétique pendant 30 minutes.

➤ Effet du solvant

La poudre qui a donné le taux le plus élevé en composés phénoliques dans la première extraction a été utilisée pour faire une deuxième extraction en faisant varier le solvant d'extraction. Les solvants utilisés sont : le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le chloroforme, l'hexane et l'acétate d'éthyle.

1,25 g de poudre de plante a été macéré dans 25 mL de solvant, le mélange est ensuite porté à l'agitation magnétique pendant 30 minutes.

➤ Effet de la concentration du solvant

Le solvant d'extraction qui a donné le meilleur taux de composés phénoliques a été utilisé pour réaliser la troisième extraction, qui consiste à faire varier la concentration du solvant. Les ratios utilisés sont : 0, 20, 40, 60, 80 et 100%.

1,25 g de poudre de plante a été macéré dans 25 mL de solvant, le mélange est ensuite porté à l'agitation magnétique pendant 30 minutes.

➤ **Effet du ratio Echantillon/solvant**

Le ratio du solvant d'extraction qui a donné la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été utilisée pour faire la quatrième extraction. Cette dernière repose sur la variation des quantités de poudre de plantes utilisées. Ces quantités sont : 0,04, 0,07, 0,1, 0,3, 0,6, 0,8, 1 et 1,4 g. Chacune des quantités pesées ont été macérées dans 25 mL du solvant sélectionné dans l'étape précédente et porter à l'agitation pendant 30 minutes.

➤ **Effet du temps de macération**

La quantité de poudre de plante qui a donné la meilleure teneur en composés phénoliques a été utilisée pour faire la cinquième extraction. Cette dernière repose sur la variation des durées de macération. La poudre de plante pesée a été macérée dans 25 mL de méthanol et laisser agiter pendant : 1, 2, 5, 10, 20, 30 minutes, 1, 2, 4, 8, 16 et 24 heures.

III.2. Optimisation des conditions de l'extraction

L'optimisation des conditions de l'extraction a été faite selon le model classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres.

L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques a été réalisée à partir de la plante selon la méthode de surface de réponse (RMS), un modèle mathématique a été développé, le type du model choisi est le plan composite centré [Goupy. \(2006\)](#).

Deux facteurs (X_1 et X_2) à trois niveaux (-1, 0 et +1) sont utilisés pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la plante étudiée (tableau IV).

Tableau IV: Niveaux des variables choisis pour les essais [Goupy. \(2006\)](#).

X_1 Rapport échantillon/solvant	X_2 Temps d'extraction (minutes)
(-1) 0,05	(-1) 5
(0) 0,1	(0) 10
(+1) 0,15	(+1) 15

Le plan composite centré comprend 11 essais dont l'essai centré (0, 0, 0) est répété trois fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction.

III.2.1. Analyse phytochimique

III.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

L'estimation quantitative des polyphénols est réalisée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [Ribéreau-Gayon. \(1968\)](#) (figure 10). La coloration bleu produite, dont l'absorption maximale est enregistrée entre 725 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [Boizot et Charpentier. \(2006\)](#).

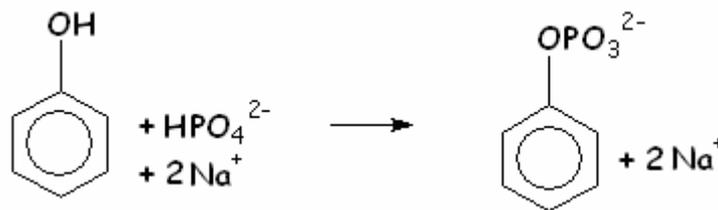


Figure 10 : Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu [Fkih. \(2007\)](#).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode décrite par [Singleton et Rossi. \(1965\)](#) (figure 11).

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (annexe 1). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

La lecture des absorbances pour toutes les analyses a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de marque UV-9200.

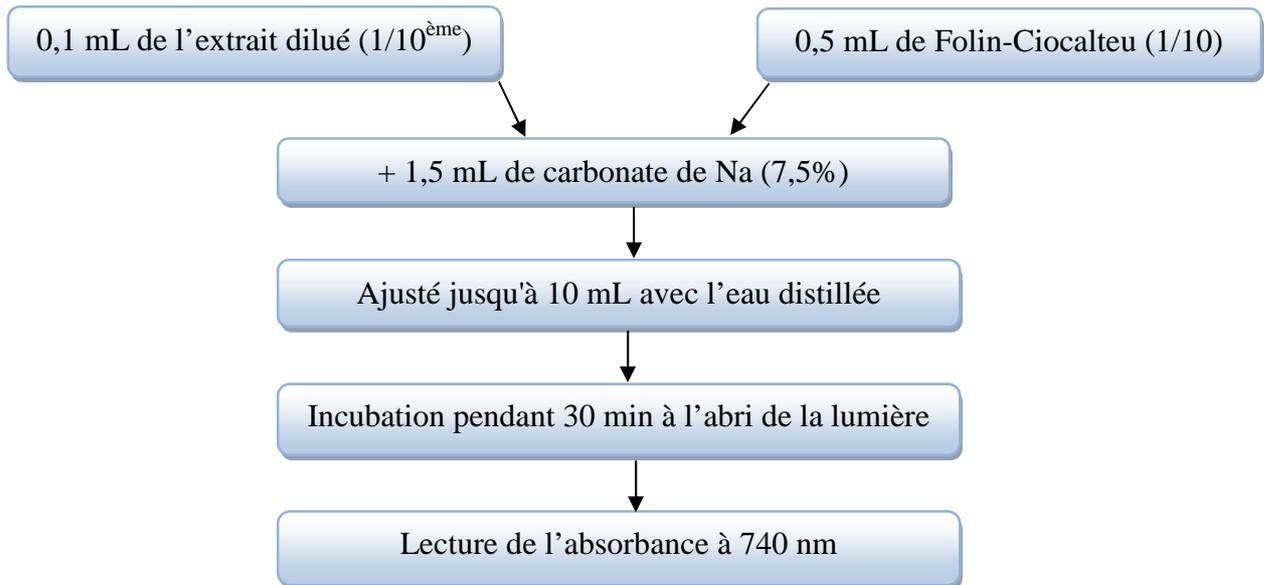


Figure 11 : Schéma représentatif du protocole de dosage des polyphénols [Singleton et Rossi. \(1965\)](#).

III.2.1.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium [Bendimerad et Bougandoura. \(2012\)](#).

Les flavonoïdes contiennent certains groupements structuraux susceptibles de former par chélation des complexes jaunâtres avec les métaux notamment le fer et l'aluminium. L'ion métallique intervenant dans la formation de complexe sous forme de M^{++} s'uni a des oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons [Ribereau Gayon. \(1968\)](#) (figure 12).

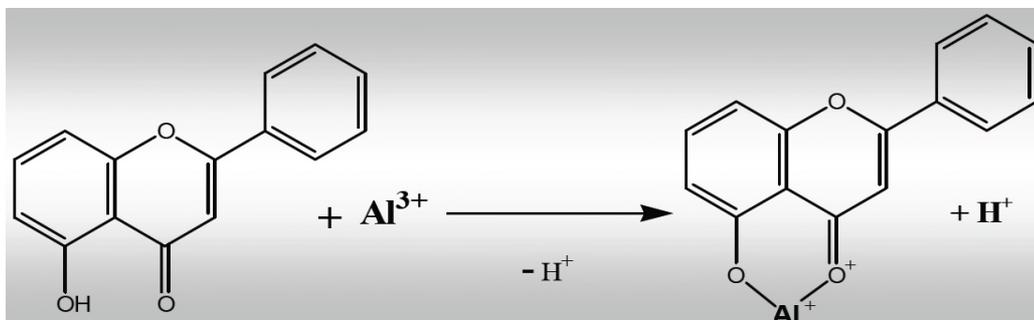


Figure 12 : Mécanisme de réaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes [Ribereau-Gayon. \(1968\)](#).

- **Mode opératoire**

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode de AlCl_3 de Lamaison et Carnet. (1990) (figure 13).

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (annexe 1). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

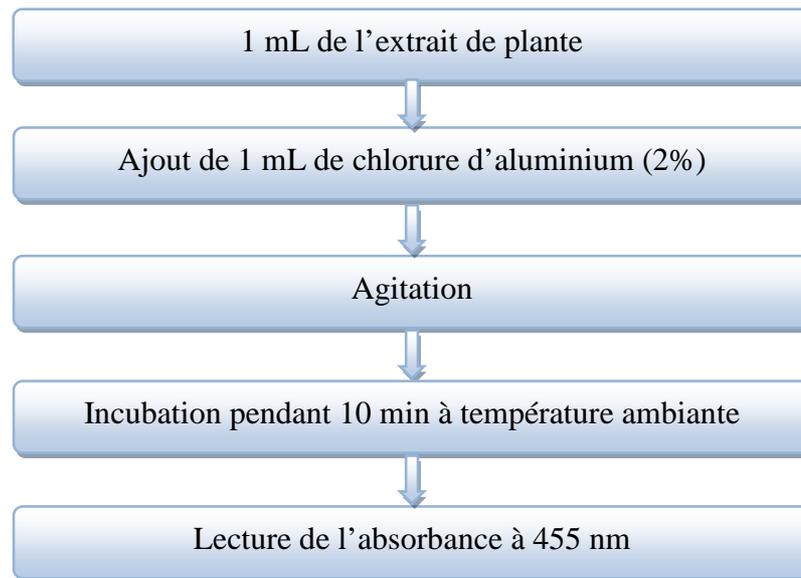


Figure 13 : Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des flavonoïdes Lamaison et Carnet. (1990).

III.2.1.3. Dosage des tanins

- **Principe**

La méthode repose sur la formation d'un complexe tanins-BSA. Les tanins précipités sont mesurés par spectrophotométrie à 510 nm, après formation du complexe ion ferrique-polyphenols dans une solution alcaline contenant la solution SDS/TEA. Cette dernière est utilisée pour dissoudre le complexe obtenu. Le chlorure ferrique réagit avec les tanins pour former des chélates de couleur violette Hagerman et Butler. (1978).

La centrifugation à 14000 tr/min a pour but d'isoler le complexe insoluble protéine-tanins Ribéreau-Gayon. (1968).

- Mode opératoire

La teneur des tanins dans l'extrait méthanolique est déterminée selon la méthode d'[Hagerman et Butler. \(1978\)](#) (figure 14). La concentration des tanins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide tannique (annexe 1).

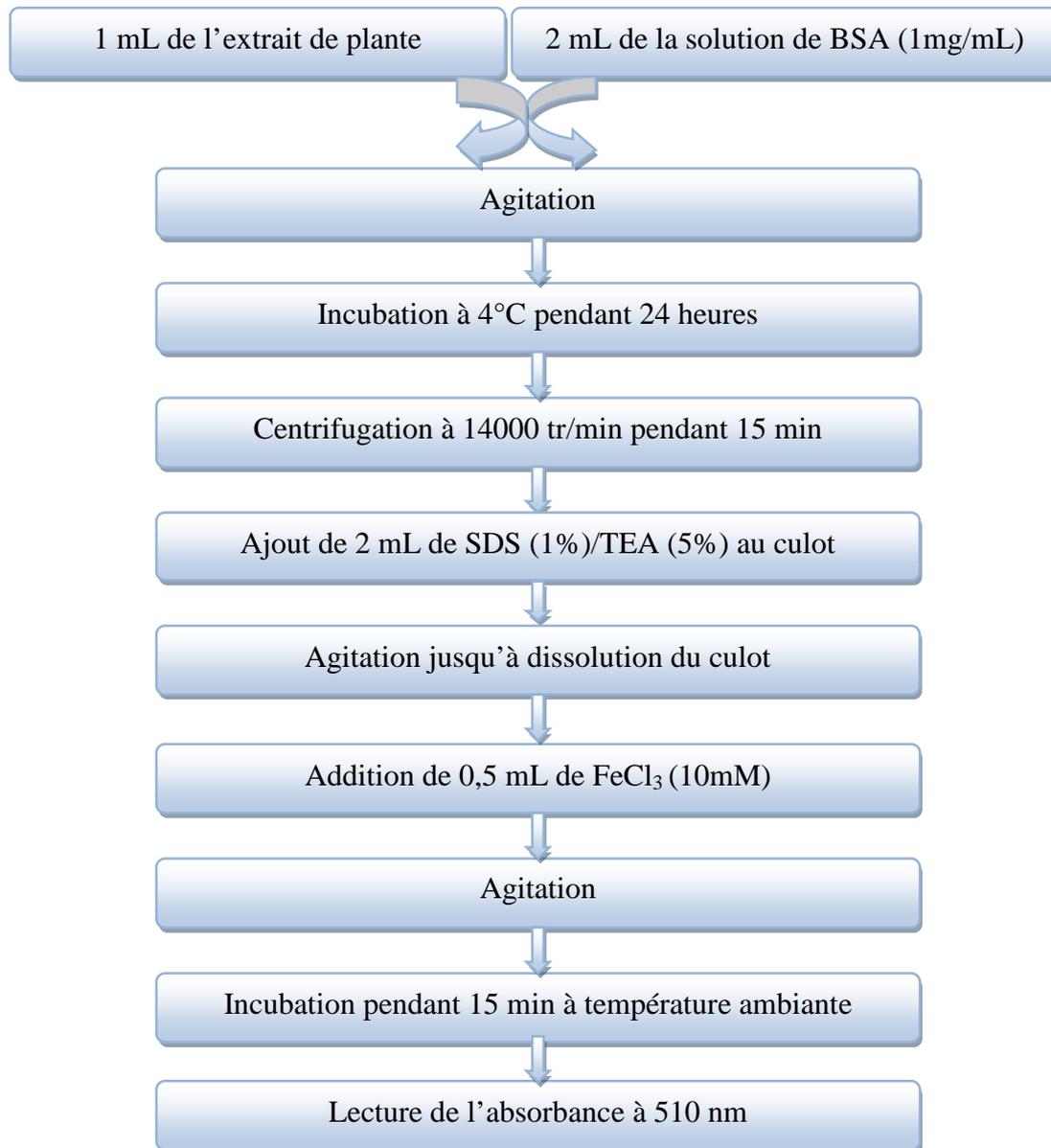


Figure 14 : Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des tanins [Hagerman et Butler. \(1978\)](#).

III.2.2. Détermination de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait optimisé, deux méthodes différentes ont été utilisées à savoir : le pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium et le test antiradicalaire au DPPH[•].

III.2.2.1. Test au molybdate d'ammonium

- **Principe**

Le test du pouvoir réducteur du molybdate d'ammonium repose sur la réduction du molybdate sous la forme Mo^{6+} vers la forme Mo^{5+} par des substances organiques antioxydantes. En milieu acide, il y a formation d'un complexe phosphate- Mo^{5+} qui se traduit par une coloration verte et dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en antioxydants [Bougatef et al. \(2009\)](#).

- **Mode opératoire**

La détermination de l'activité antioxydante en utilisant le molybdate d'ammonium est réalisée selon la méthode décrite par [Silici et al. \(2010\)](#) (figure 15).

Un solvant réactif, formé de phosphomolybdate d'ammonium (4 mM), phosphate de sodium (28 mM) et d'acide sulfurique a été utilisé.

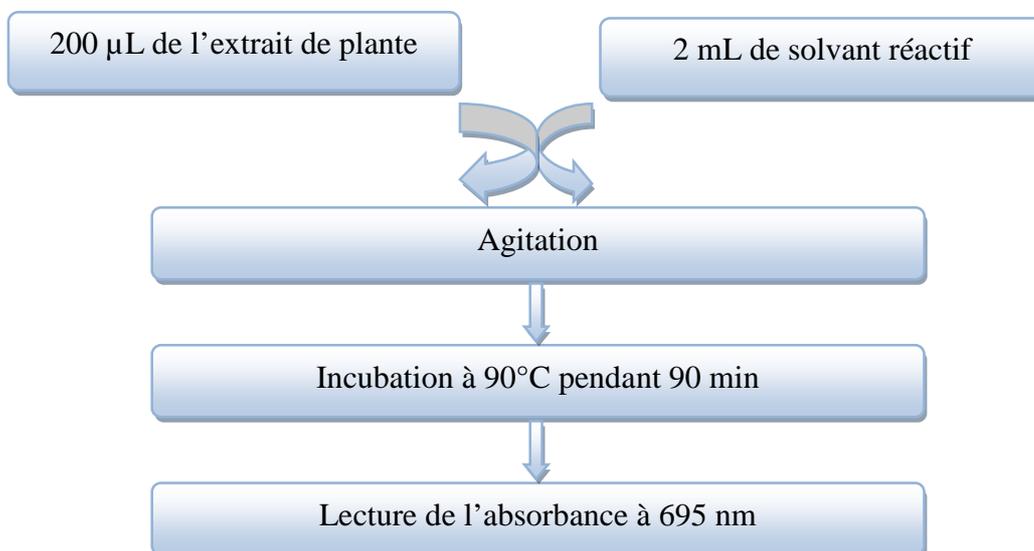


Figure 15 : Schéma représentatif du protocole expérimental du pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium [Silici et al. \(2010\)](#).

III.2.2.2. Test au DPPH

- Principe

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon [Chaabi. \(2008\)](#) (figure 16).

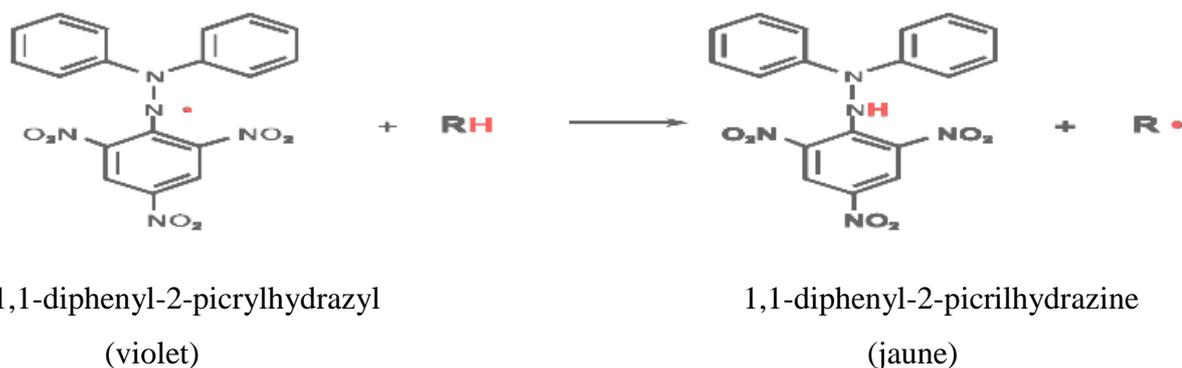


Figure 16 : Réaction de réduction du DPPH[•] [Molyneux. \(2004\)](#).

- Mode opératoire

La détermination de l'activité antioxydante par le test au DPPH[•] est réalisée selon la méthode de [Bougatef et ses collaborateurs. \(2009\)](#) qui est décrite dans la figure 17.

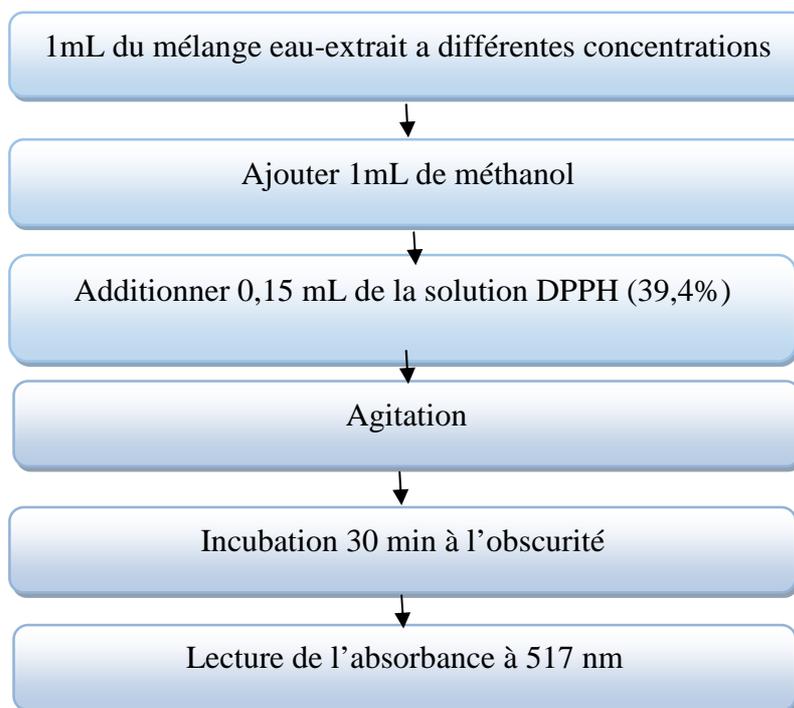


Figure 17 : Schéma représentatif du protocole du test au DPPH [Bougatef et al. \(2009\)](#).

III.3. Analyse statistique

Toutes les déterminations ont été effectuées en triple essais. La moyenne et l'écart type pour chaque test ont été calculés par Microsoft Excel 2013. Les différents résultats obtenus pour les trois extraits ont été comparés par une analyse de la variance (ANOVA) effectuée avec le logiciel Statistica 5.5 et les valeurs P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives. L'optimisation a été réalisée à l'aide du logiciel JMP.7.

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

IV.1. Optimisation et conditions d'extraction des polyphénols

L'extraction utilisée dans le présent travail est de type solide-liquide, c'est-à-dire que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et le soluté sortira. La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par diffusion [Ribéreau-Gayon, \(1968\)](#).

IV.1.1. Etude préliminaire

IV.1.1.1. Choix de la partie de la plante

Différents organes de plante (tige, feuilles, fleurs, graines), ainsi que des mélanges équimolaires de poudres de deux organes (tige-graine, tige-feuille, tige-fleur, graine-feuille, graine-fleur, feuille-fleur) ont été utilisés pour évaluer la partie ou le mélange le plus riche en polyphénols totaux. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 18.

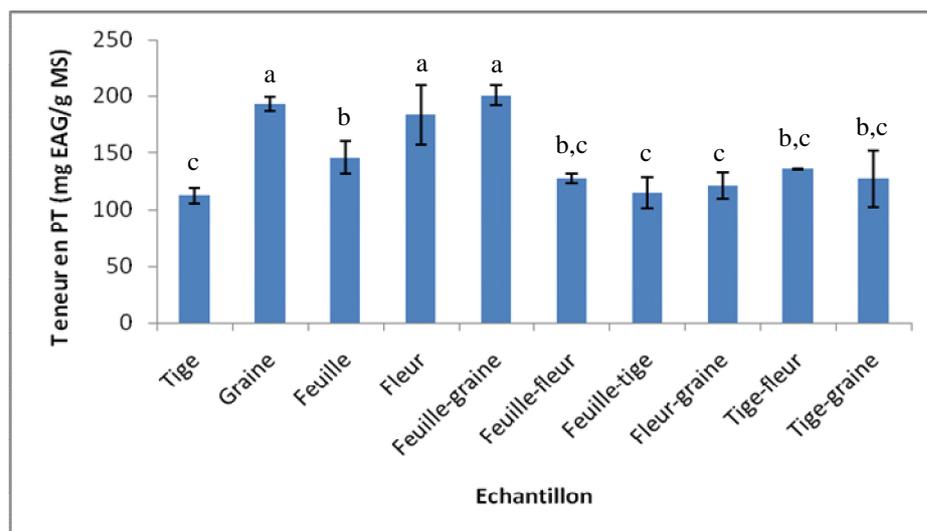


Figure 18 : Variation de la teneur en composés phénoliques selon l'organe de la plante (les lettres a, b et c montrent qu'il y a une différence significative entre les extraits $P < 0,05$).

D'après les résultats de la figure 18, la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistrée pour le mélange feuille-graine, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée pour la tige.

IV.1.1.2. Choix du solvant d'extraction

Afin d'extraire les polyphénols, six types de solvant ont été utilisés à savoir : le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'hexane, l'acétate d'éthyl et le chloroforme. Les résultats obtenus de sont présentés dans la figure 19.

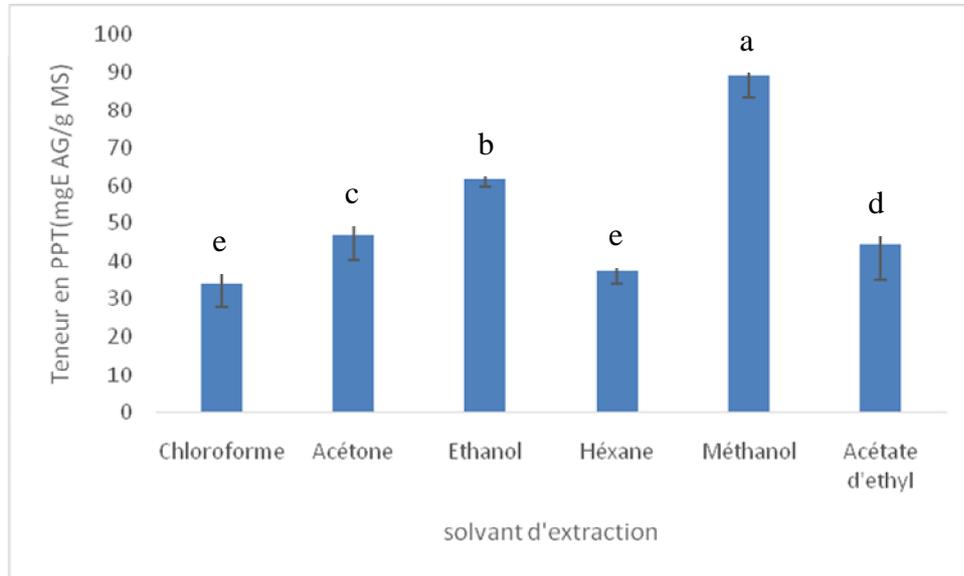


Figure 19 : Effet du type de solvant sur l'extraction des polyphénols. (les lettres a, b, c, d et e montrent qu'il y a une différence significative entre les extraits $P < 0,05$).

L'analyse statistique indique que la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistrée pour le méthanol, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée pour l'hexane.

IV.1.1.3. Choix du pourcentage du solvant d'extraction

Afin d'extraire le maximum de polyphénols, différents ratios de méthanol ont été utilisés : 0, 20, 40, 60, 80 et 100%. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 20.

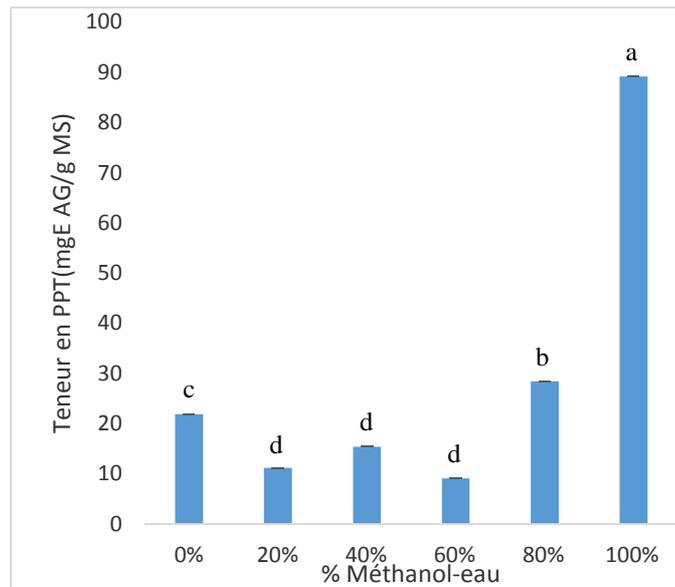


Figure 20 : Effet du type de la concentration du solvant sur l'extraction des polyphénols (les lettres a, b c et d montrent qu'il y a une différence significative entre les extraits $P < 0,05$).

D'après les résultats de l'analyse statistique, la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistrée pour le méthanol 100%, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée pour le méthanol 60%.

IV.1.1.4. Choix de la quantité de poudre de plante

Afin d'extraire le maximum de polyphénols, différentes quantités de poudre de plante ont été utilisées : 0,04, 0,07, 0,1, 0,3, 0,8, 1 et 1,4 g. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 21.

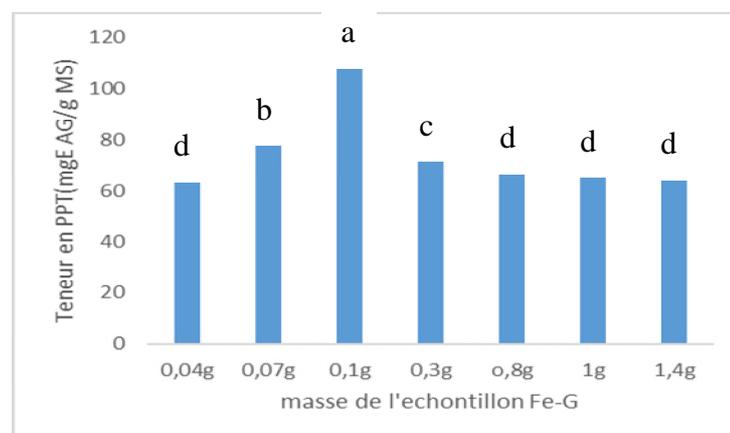


Figure 21 : Effet de la quantité de la poudre de plante sur la teneur en polyphénols. (les lettres a, b, c et d montrent qu'il y a une différence significative entre les extraits $P < 0,05$).

L'analyse statistique indique que la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistré pour la quantité de poudre de plante de 0,1g, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée pour 1,4 g.

IV.1.1.5. Choix du temps de macération

Afin d'extraire le maximum de polyphénols, différents temps de macération ont été adoptés : 1, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h et 24h. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 22.

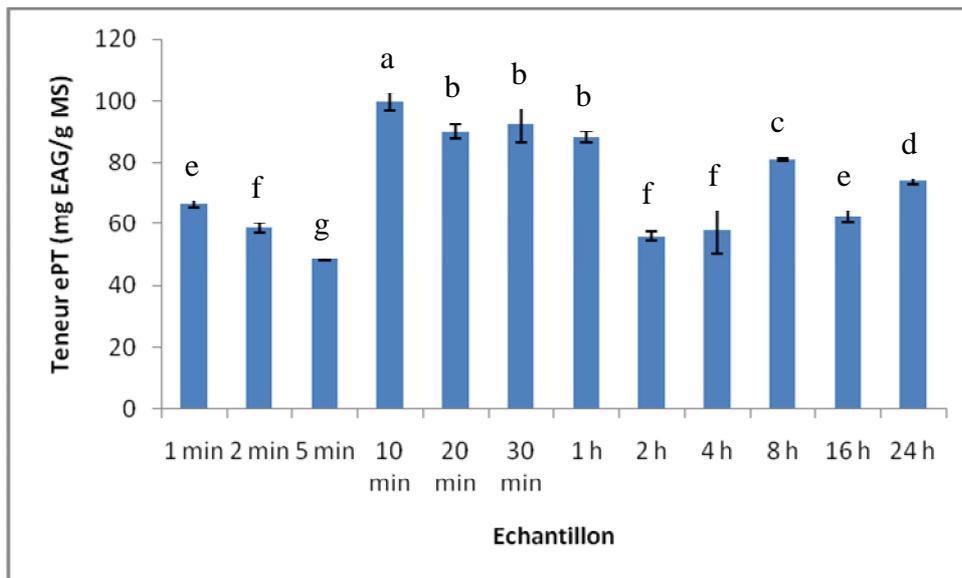


Figure 22 : Effet du temps de macération sur la teneur en polyphénols totaux. (les lettres a, b, c, d, e, f et g montrent qu'il y a une différence significative entre les extraits $P < 0,05$).

L'analyse statistique indique que la teneur la plus élevée en composés phénoliques a été enregistrée pour le temps de macération de 10 minutes, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée pour 5 minutes.

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique qui peut varier de substances simples aux substances très hautement polymérisées. Il y a une possibilité d'interaction des composés phénoliques avec les autres composés de la plante tels que les hydrates de carbones et les protéines. Ces interactions peuvent conduire à la formation de complexes qui peuvent être insolubles [Nacz et Shahidi, \(2006\)](#). La solubilité des composés phénoliques est aussi affectée par la polarité du (s) solvant utilisé [Marston et Hostettmann in Anderson et al. \(2006\)](#) ; [Nacz et Shahidi, \(2006\)](#). Ainsi, la récupération

des polyphénols à partir du matériel végétal est aussi influencée par la durée de l'extraction, le ratio du solvant à l'échantillon, la taille des particules de l'échantillon et les conditions de préparation de l'échantillon. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié pour l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante Hayouni et al. (2007); Nacz et Shahidi, (2006) ; Ribereau-Gayon, (1968).

Keller-Didier (2004) note que les vertus thérapeutiques peuvent varier avec la partie de la plante utilisée ou encore selon le type de plantes associées entre-elles.

IV.1.2. Plan d'expérience composite centré

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols, comme la méthode d'extraction, la nature et la concentration du solvant, la température et le temps d'extraction Silva et al. (2007).

Deux facteurs (X_1 et X_2) à trois niveaux (-1, 0 et 1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir d'*Erica multiflora*. Les facteurs choisis sont :

- La quantité de la poudre de plante (X_1) ;
- Le temps d'extraction (X_2).

L'analyse des résultats est présentée dans le tableau V.

Tableau V : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience composite centré.

N°	Variables		PT (mg EAG/g MS)	
	X_1 -Rapport échantillon/solvant	X_2 -Temps (min)	Valeurs expérimentales	Valeurs prédite
1	0,05	5	960	912,85
2	0,05	10	836,67	877,78
3	0,05	15	750	786,03
4	0,1	5	517,5	608,56
5	0,1	10	603,33	635,30
6	0,1	10	775	635,30
7	0,1	10	603,33	635,30
8	0,1	15	590,67	575,36
9	0,15	10	331,66	366,30
10	0,15	10	331,66	366,30
11	0,15	15	358,88	368,16

Les résultats de la présente étude montrent que la teneur en composés phénoliques varie de 321,66 à 960 mg EAG/g MS. Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps et quantité de poudre de plante) sur la teneur des polyphénols totaux.

IV.1.3. Validation du model

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

IV.1.4. Coefficient de corrélation

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 Chan *et al.* (2009).

Dans le présent travail, la valeur de R^2 est de 0,92, ce qui signifie qu'uniquement 8% des variations ne sont pas expliquées par le model (figure 23).

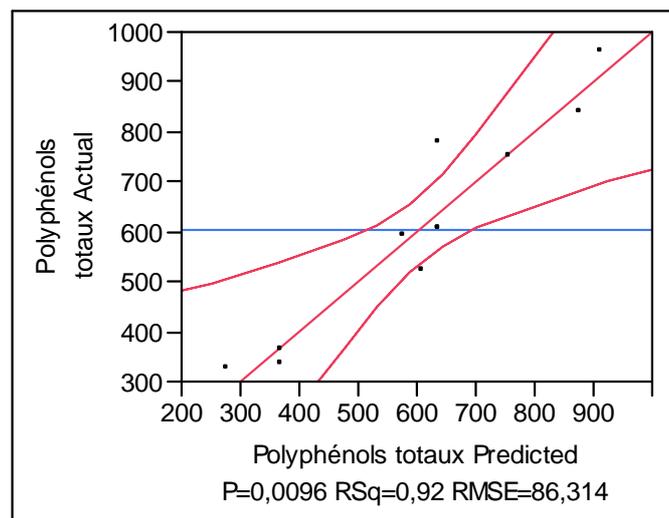


Figure 23 : Plan de prédiction réelle d'*Erica multiflora*.

L'analyse de la variance de la régression montre que le model est très hautement significatif, $P < 0,001$, ce qui confirme que le model est satisfaisant.

IV.1.5. Effet des facteurs

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables X_1 et X_2 afin de déterminer le degré d'influence des facteurs (temps et quantité de poudre de plante) sur l'extraction des substances bioactives.

Les valeurs P sont utilisées comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les valeurs P les plus petites présentent la plus grande signification du facteur correspondant Liu et al. (2010). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Analyse de la variance (ANOVA)

Source	Ddl	Somme des carrés	Ratio- F	Valeur- P
Modèle	5	415798,96	11,16	0,01
X1 – rapport	1	392426,21	52,67	00,00
X2- temps	1	1653,80	0,22	0,66
X1X2	1	15279,43	2,05	0,21
X1 ²	1	445,58	0,06	0,82
X2 ²	1	4759,35	0,64	0,46
Residuel	5	37250,15		
Coefficient d'ajustement	3	17603,86	0,60	0,67
Erreur	2	19646,30		
Cor total	10	453049,11		
		$R^2 = 0,92$		

IV.1.6. Effet d'interaction

Les résultats obtenus indiquent que l'interaction (quantité de poudre de plante-temps d'extraction) est significative sur l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora* (figure 24).

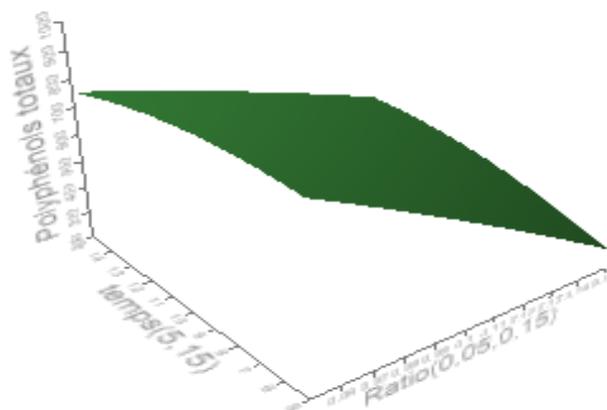


Figure 24 : Surface de réponse de l'interaction (quantité de poudre de plante-temps d'extraction).

D'après les résultats du tableau VI et de la figure 24, les conditions finales sélectionnées correspondent aux valeurs maximales choisies pour définir le domaine expérimental.

Les résultats du présent travail montre que le facteur qui possède une influence hautement significative sur l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora* étudiée est la quantité de la poudre de plante (rapport échantillon/solvant) (X_1) avec une probabilité $P = 0,00077$. Cependant, l'impact est significatif pour le temps d'extraction (X_2).

Les résultats obtenus montrent que l'interaction (rapport échantillon/solvant-temps d'extraction) n'est pas significative avec une probabilité $> 0,05$.

IV.1.7. Model mathématique

Lorsque les facteurs sont clairement identifiés et la réponse est connue, un plan d'expérience avec une liste d'expériences à réaliser est proposé afin de cerner au mieux le phénomène étudié.

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques

sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux) [Tinsson, \(2010\)](#).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan d'expérience utilisé pour deux facteurs est un modèle du premier degré qui est volontairement simplifié par élimination des effets d'interaction jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression. Le modèle mathématique opté dans la présente étude est représenté par l'équation suivante :

$$Y = 635,30 - 255,75 X_1$$

Cette étude montre que la teneur en polyphénols totaux est affectée principalement par la quantité de la poudre de plante utilisée.

Pour avoir une quantité en polyphénols totaux de 913,20 mg EAG/g MS pour *Erica multiflora*, il faut utiliser 0,05 g de la poudre de plante qu'il faut laisser macérer dans du méthanol pendant 5 minutes.

IV.2. Analyse phytochimique de l'extrait optimisé

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Après l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium, une couleur bleue est obtenue dont l'intensité varie en fonction de la concentration phénolique de l'extrait de plante.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont portés dans la figure 25.

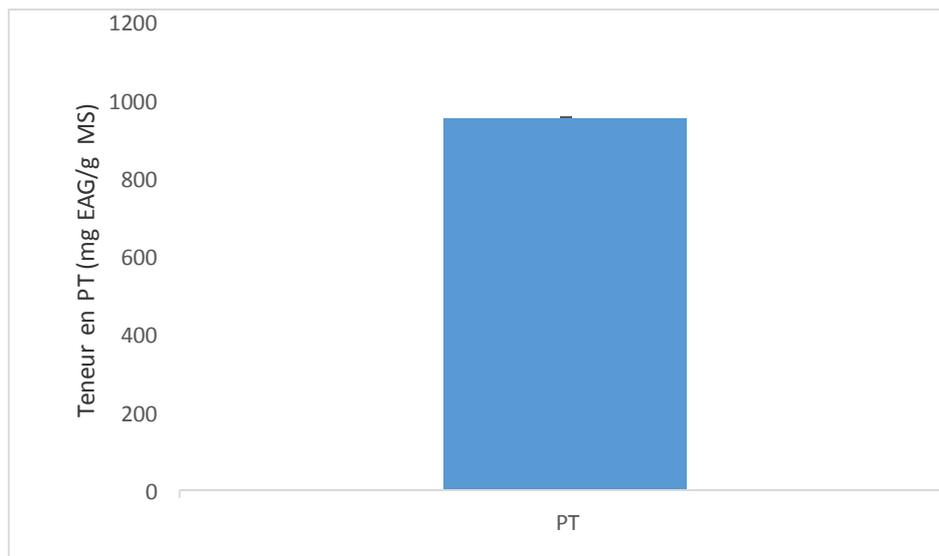


Figure 25 : Teneur en polyphénols totaux (**PT** : polyphénols totaux, **EAG** : Equivalent Acide Gallique).

La figure 25 montre que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait optimisé est de $960 \pm 13,23$ mg EAG/g MS.

Selon [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#), la teneur en polyphénols totaux des parties fleuries d'*E. multiflora* est de $68,2 \pm 3,2$ mg EAG/g MS qui est plus faible que celle trouvée dans le présent travail. Cette différence pourrait être expliquée par la différence dans les conditions d'extraction et la partie de plante utilisée.

[Harnafi et al. \(2007\)](#) ont trouvé que les fleurs d'*E. multiflora* (récolté au Maroc) contiennent une teneur en composés phénoliques totaux de 105 mg EC/g de fleurs séchées.

Chez *Erica arborea*, une autre espèce du genre *Erica*, [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#) ont trouvé que les parties fleuries de cette espèce renferment $70,8 \pm 2,5$ mg EAG/g MS.

[Leclerc \(1994\)](#) a noté que les substances actives contenues dans les végétaux varient dans des proportions considérables suivant l'âge de la plante, la période de la récolte, la nature du sol et le climat. Selon [Skerget et al. \(2005\)](#), le temps d'incubation influe sur la quantité de composés phénoliques à une température de 50°C. Ainsi, la plus grande quantité d'acide gallique, utilisé comme standard, est déterminée après 5 minutes et une incubation supplémentaire provoque sa diminution, probablement due à la

décomposition des phénols. D'autres facteurs peuvent être à l'origine de l'augmentation du taux des composés phénoliques dans les plantes.

Selon Athamena *et al.* (2010), le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

IV.2.2. Dosage des flavonoides

Après l'addition du chlorure d'aluminium, un complexe jaune verdâtre est formé. L'intensité de cette coloration est en fonction de la concentration de l'extrait.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont portés dans la figure 26.

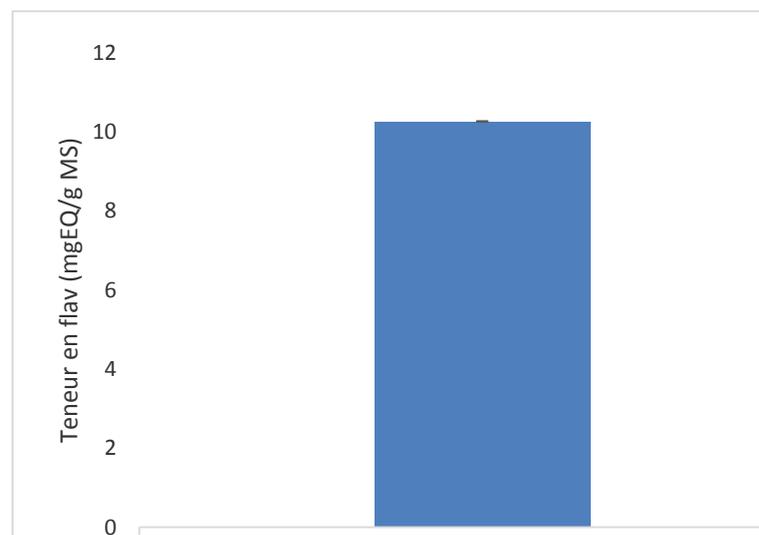


Figure 26 : Teneur en flavonoides (**flav:** flavonoides, **EQ :** Equivalent Quercétine).

Les résultats du dosage des flavonoides montrent que l'extrait optimisé contient $10,27 \pm 1,7$ mg EQ/g MS.

Guendouze-Bouchefa *et al.* (2015) ont trouvé que la teneur des flavonoides dans l'extrait méthanolique des parties fleuries d'*Erica multiflora* est de $6,5 \pm 0,3$ mg EQ/g MS, alors que celle d'*Erica arborea* est de $9,5 \pm 0,1$ mg EQ/g MS.

Pour l'extrait méthanolique des fleurs d'*Erica multiflora*, Harnafi *et al.* (2007) ont rapporté une teneur de 0,13 mg EQ /g MS. Le standard utilisé étant le quercétol.

Les raisons de ces différences ne sont pas claires, mais comme l'a déclaré Xia *et al.* (2014), les conditions géographiques et climatiques peuvent entraîner des différences importantes dans les concentrations des deux composés bioactifs (polyphénols totaux et flavonoïdes) dans les plantes et leur bioactivité pour la santé humaine.

IV.2.3. Dosage des tanins

Les tanins sont des composés phénoliques capables de précipiter les protéines. Le chlorure ferrique réagit avec les tanins pour former un complexe de couleur violette. La teneur en tanins d'*Erica multiflora* a été déterminée en équivalent acide tannique (figure 27).

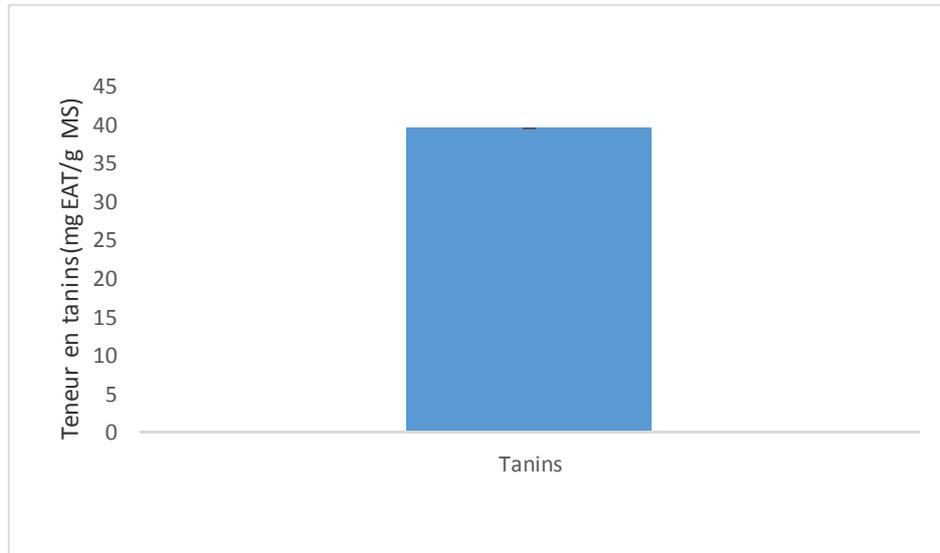


Figure 27 : Teneur en tanins (EAT : Equivalent Acide Tannique).

D'après la figure 27, la teneur en tanins de l'extrait est de $63,13 \pm 14,58$ mg EAT/g MS. Cette valeur est plus élevée que celle trouvée par [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#) qui est de $21,26 \pm 2,3$ mg EAT/g MS. Chez *Erica arborea*, ces auteurs ont trouvé une teneur de $16,29 \pm 1,74$ mg EAT/g MS.

Dans leur étude, [Harnafi et al. \(2007\)](#) ont trouvé une teneur de $51,33 \pm 6,36$ mg EC/g de MS qui est supérieure à celle trouvée dans la présente étude pour *E. multiflora*.

Nous notons une différence dans le standard, la méthode et aussi l'organe de plante utilisés.

IV.3. Détermination de l'activité antioxydante

IV.3.1. Test au phosphomolybdate d'ammonium

La capacité antioxydante s'exprime par la réduction de l'ion Mo^{6+} en ion Mo^{5+} . La complexation de ce dernier avec le phosphate abouti à une couleur verte dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait [Prasad et al. \(2009\)](#).

L'absorbance de l'acide gallique et de l'extrait d'*Erica multiflora* augmente avec la concentration (figure 28).

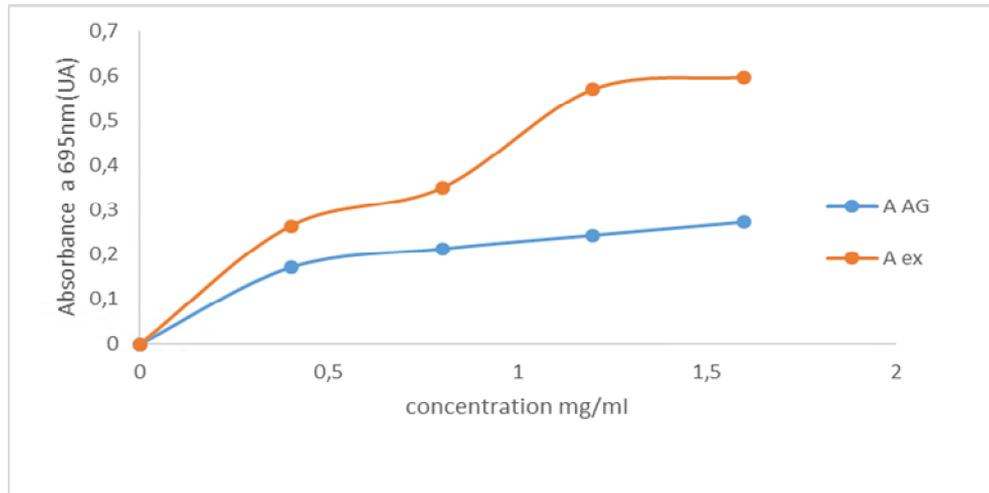


Figure 28 : Activité antioxydante de l'extrait et de l'acide gallique par le phosphomolybdate d'ammonium (**AAG** : Absorbance de l'Acide Gallique, **Aext** : Absorbance de l'extrait).

D'après la figure 28, l'extrait présente une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide gallique.

La détermination de l'IC50 a été faite à partir de la courbe des tendances présentées dans l'annexe 3, sa valeur est de 4,6 mg/L.

IV.3.2. Test utilisant le radical DPPH[•]

La couleur du radical DPPH[•] change du pourpre au jaune en présence d'antioxydants. Le degré de décoloration indique que le potentiel de l'effet scavenger de l'extrait est dû à l'aptitude de l'antioxydant à céder un hydrogène au radical libre [Ajila et al., \(2007\)](#).

Plus la concentration augmente plus l'effet scavenger de l'extrait de plante est important (figure 29).

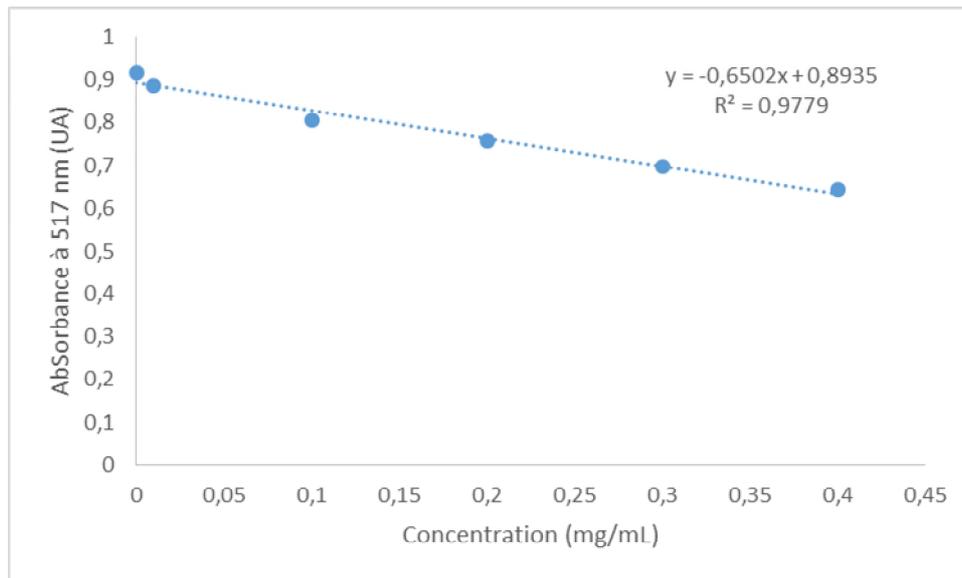


Figure 29 : Effet scavenger de l'extrait vis-à-vis du DPPH[•].

La figure 29 montre que plus la concentration de l'extrait augmente, plus son effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH[•] est important.

Ces résultats peuvent être exprimés en terme de valeurs IC₅₀. IC₅₀ signifie la concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH[•] [Andrade et al. \(2009\)](#).

La valeur de IC₅₀ trouvée pour l'extrait est de 10mg/L. Cette valeur est proche de celle trouvée par [Guendouze-Bouchefa et al. \(2015\)](#) pour l'extrait méthanolique des parties fleuries d'*Erica multiflora* qui ont trouvé une valeur de IC₅₀ de $10,2 \pm 0,3$ mg/L. Ces mêmes auteurs ont trouvé une IC₅₀ de l'extrait méthanolique des parties fleuries d'*Erica arborea* de $5,7 \pm 0,08$ mg/L.

D'après [Jayaprakasha et al. \(2008\)](#), l'activité antioxydante des extraits peut être attribuée à leurs composants chimiques tels que les phénols, l'acide ascorbique et les caroténoïdes.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La méthode de surface de réponse est employée pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir d'*Erica multiflora*.

Le coefficient de régression et les valeurs de P ont indiqué que la durée de macération et la quantité de poudre utilisée sont les facteurs les plus significatifs affectant l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora*.

Les conditions expérimentales optimales permettant une maximisation de l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora* sont : le solvant (méthanol) à une concentration de 100% (v/v) et la quantité de poudre de plante de 0,05 g pour une durée de macération de 5 minutes.

Le taux des composés phénoliques retrouvé sous les conditions optimales est de l'ordre de $960 \pm 13,23$ mg EAG/g MS qui s'aligne dans l'intervalle de prévision du plan d'expérience composite centré estimé à $913,20$ mg EAG/g MS.

Le présent travail montre que les teneurs en flavonoïdes et tanins de l'extrait optimisé sont respectivement de $10,27 \pm 1,7$ mg EQ/g MS, et $63,13 \pm 14,58$ mg EAT/g MS.

Les résultats du pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium et du pouvoir antiradicalaire de l'extrait étudié vis-à-vis du DPPH[•] de l'extrait étudié ont révélé que l'extrait présente une activité antioxydante avec des IC_{50} qui sont respectivement de 4,6 et 10 mg/L.

Il est souhaitable de compléter le présent travail par :

- D'optimiser d'autres paramètres influençant l'extraction des polyphénols tels que la granulométrie ;
- Identification des différents antioxydants de l'extrait par des techniques plus avancées : le dichroïsme circulaire, HPLC, CG-MS et RMN ;
- Détermination de l'activité antioxydante par d'autres méthodes.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographique

A

- Agrawal, P.K., et Markham, K.R., 1989.** Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier. Amsterdam.
- Ait Youssef, M., 2006.** Plantes médicinales de kabylie. Edition Ibis Press, Paris. pp. 37–38.
- Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G., Prasada, Rao, U.J.S., 2007.** Bioactive compounds and antioxidant potential of Mango peel extract. *Food Chemistry* **105**, 982-988.
- Akkol, E.K., Yeşilada, Güven, C.A., 2007.** Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. *Journal Ethnopharmacologie* **116** (2), 251-257.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, Barl, B., Weil, J.A., 2004.** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry* **84**, 551-562.
- Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., Fougrach, H., 2013.** Évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire d'*Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie, Biologie* **61** (6), 254–258.
- Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, J.S., 2005.** Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. *Animal. Food Science and Technology* **119**, 323–331.
- Amzal, H., 2010.** Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de doctorat. Université Mohammed V Agdal Faculté des Sciences (Rabat). 89 p.
- Andersen O. M., Markham K. R. 2006.** Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. Edition. Taylor et Francis group, LLC New York. pp 1-142.
- Andersen O. M., Markham K. R. 2006.** Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. Edition. Taylor et Francis Group, LLC New York. pp 1-142.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009.** Bioactive extracts from citrus ladanifer and arbutus unedo L. In press.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010.** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminumcyminum* L. *Lebanese Science Journal* **11** (1), 69-81.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M., 2000.** Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *Journal of Food composition and analysis*, **13**: 171-177.

B

- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dinet, T., Lucks, M., vasseur, J., Gazin, M., Cazin, J.G., Pinkas, M., 1999.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceuticals preparations *Arzeimittelforschung* **46** (11), 1086-1089.
- Balasundram, N., Sundram, K., Sammam, S., 2005.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry* **99**, 191-203.
- Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X., Grau, J., 2005.** Guide de la flore méditerranéenne (caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces). Edition. Delachaux et Niestlé, Paris. pp. 22-23.
- Belarmin, et Tabani., 1992.** Etude de la pollinisation chez deux espèces d'Ericacées dans le secteur algerois: *Arbutus unedo* et *Erica arborea* L. Caractéristiques biologiques et écologiques. Thèse magister. Institut national agronomique. El-Harrach (Alger).
- Belyagoubi-Benhammou. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen, 12.
- Bendimerad, N., et Bougandoura, N., 2012.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/Juin 2013. Pages 14-19.
- Berger, M.M., 2006.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **20** (1), 48-53. Biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande.
- Birch, A. J., and Donovan, F.W., 1953.** Studies in relation to biosynthesis I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol. *Australian J Chem.* **6**, 360.
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Dicko, A., Soulimani, R., 2008.** Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie* (2008) **6**: 71-74.
- Bouba, A. A., 2009.** Contribution à l'étude du développement d'un aliment fonctionnel à base d'épices du Cameroun : Caractérisation physico-chimique et fonctionnelle. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de lorraine et l'université de Ngaoundéré. 191 p.
- Boubekri, C., 2014.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques, Université mohamed khider – Biskra, 25-27.
- Boucher, C., Doux, Y., 2011.** Guide des arbres et arbustes de Méditerranée. Edition. Delachaux et Niestlé, Paris. 320 p.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M., 2009.** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chem* **114**, 1198-1205.

- Bouras, A. D., 2004.** L'oxydation des lipides in Biochimie alimentaire. Edition. OPU, Alger. pp. 69-72.
- Bruneton, J., 1987.** Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Edition. Lavoisier, Paris. 136 p.
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition. Médicales Internationales-Tec et Doc. Paris, pp 370-401.
- Bylka, W., Mathawska, I et Pilewski, N. A., 2004.** Naturalflavonoidasanti-microbialagents.Journalofthe AmericanNutraceuticalAssociation.,7(2):24-26.

C

- Chaabi Mehdi., 2008.** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *euphorbiastenocladabaill.* (euphorbiaceae), *anogeissusleiocarpusguill.* &perr. (combretaceae), *limoniastrumfeei*(girard) batt. (plumbaginaceae). Thèse de doctorat.
- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Aida, W.M., et Ho, C.W., 2009.** Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from limaupurut (*citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal.* **16**: 203-213.
- Cheick Traoré, M., 2006.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au mali. Ministère de l'éducation national. Université de Bamako (Mali). 133 p.
- Clifford, M.N.1999.** Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida.* **41** (5): 393-397.

D

- Davis, B.D., 1955.** Biosynthese of the aromatic amino acides *In*'A symposium on amino acide métabolisme (W. D. McElroy and B. Glasse, eds). Johns hopkins presse, Baltimore, Maryland. Pp: 799-811.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. et Masella, R., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità.* **43**(4) :348-361.
- Decloitre, F., 1993.** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. Cahiers de Nutrition et de diététique, **28**(2) : 85-95.
- Diabate, D. M., 2006.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques d'une recette traditionnelle utilisée dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate au Mali. Thèse de doctorat. Faculte de medecine de pharmacie et d'odonto – stomatolog (Mali). 116 p.
- Djeridane,A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P.,Vidal, N., 2006.** Antioxi-dant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* **97** (4), 654-660.

E

Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X., Grau, J. 1990. Guide de la flore méditerranéenne: caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. Paris. Ed : Delachaux et Niestlé. 287p.

F

Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

FKIH S., 2007. Etude de l'effet de l'irradiation ionisante sur certains polyphénols alimentaires et résidus pesticides.

G

Ghedadha, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M.C., Bousselfa, H., Oueld-Mokhtar, S.M., 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé, *Phytothérapie* (2015) **13**:118-129,

Gingnard, J.L., 2001. Botanique systématique moléculaire. 12^{ème} Edition. Masson, Paris. 290 p.

Goopy, J., 2006. Introduction aux plans d'expérience. 3ème édition. Technique et ingénierie : série gestion industrielle. Paris. Donod. 324p

Guendouze-Bouchefa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhloufa, L., Hauchard, D., Kiendrebeogod, M., Stévigny, C., Okusa, P.N., Duez, P., 2015. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products* **70**, 459–466.

H

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

Harbone, J.B., Baxter, Herbert., 1993. Photochemical dictionary: a hand book of bioactive compounds from plants. [S.I]: Taylor. Francis. 791p.

Harnafi, H., Bouanani, N.H., Aziz, M., Caid, H.S., Ghalim, N., Amrani, S., 2007. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* L. flowers extract in triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology* **190** (1), 156–160.

Hayouni, E., Abebrabba, M., Bouix, M., Hamd, M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* **105**, 1126–1134.

Hertog, M.G., 1996. Epidemiological evidence on potential health proprieties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society*. **55** (1B): 385-397.

Hinneburg, I., Dorman, H.J., Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* **97**, 122-129.

J

Jacques Brosse et al, 2010. Larousse des arbres, Edition : Janine Faure et Véronique Taho 2eme édition, Espagne. Page : 176.

Jacques Brosse., 1979. Arbustes d'Europe occidentale, Edition : Bordas, page : 217.

Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B., Patil, B.S., 2008. Antioxidant capacity of pummelo and navel orange: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT* **41**: 376–384.

Japon-Lujan, R., Janeiro, P., Luque de Castro, M.D., 2008. Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultra soundassisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 7231–7235.

Judde, A., 2004. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? *Oléagineux corps gras lipides journal* **11**, 414-418.

K

Kanoun., 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtuscommunis*L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). P : 30-48.

Karabourniotis, G., Fasseas, C. 1996. The dense indumentum with its polyphenols content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany*. **74**: 347–351.

Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J., and Traore, S.A., 2005. Antioxydant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. **4(8)**: 823-828.

Kool, D., Laruelle, R., 1964. La belladone dans les cultures médicinales en Belgique. *Journal de Pharmacie de Belgique* **19** (5-6), 271-280.

L

LadohYemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., LentaNdjakou, B., MpondoMpondo, E., Yinyang, J., Wansi, J.D., 2014. Activité antioxydante des extraits méthanoliques de phragmantheracapitata (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*, *journal of applied biosciences* **84**:7636– 7643.

Lamaison, J.L.C., Carnet, A., 1990. Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs de *cratageusmonogyna* Jacq et de *cratageuslaevigata* (Poiret D.C.) en fonction de la végétation. *Pharmaceutic Acta Helvetiae*. **65**, 315–320.

Larousse Andrew, C., 2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales (identification, préparations et soins). 2eme Edition .VUEF. Paris.335 p.

Leclerc, H., 1994. Précis de phytothérapie. Edition. Masson, Paris. 363 p.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.

Leitao, C., 2011. Etude de composés à intérêts technologique et fonctionnel dans la bière. Thèse de doctorat. Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, Université de Strasbourg. 133 p.

Lhuillier, A., 2007. Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria sallicifolia* Hook. F. Ex olivier, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericacées*), *Tambourissatrichophylla* Baker (*Mininiaceae*) et *Embeliaconcinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse (France). 200 p.

Liu, Q.M., Yang, X.M., Zhang, L., et Majetich, G., 2010. Optimization of ultrasonic assisted extraction of chlorogenic acid from Folium eucommiae and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of medicinal plants research*. **23**: 2503-2511.

Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of nutrition* **134**, 3479-3485.

Lizcano, L.J., Bakkali, F., Ruiz-Larrea, M.B, Ruiz-Sanz, J.I., 2010.Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry* **119**, 1566–1570.

M

Manach, C., Scalbert, A., Moraud, C., Remesy, C., Jameney, L., 2004. Polyphenols sources and biovariability. *American journal of cilinical nutrition*. **79**, 727-747.

Marfak, A., 2003. Les flavonoïdes : radiolaire se gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issu des alcools ; formation des pépsides. Thèse de doctorat. Université de limoges.

Max, W et Robert, A., 2003. Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinal, science et thérapeutique. Ed.2. Paris. Pp : XXXIX.

Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi, A., 2011. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparisspinosal*. *Lebanese science journal*, Vol. 14, No. 1, 2013, p : 50-60.

Mohammedi, Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoidesde quelque plantes de la région du Tlemcen. Thèse magistère. Université Abou Bakr belkaid Tlemcen.

Mokrani, A., Mindjou, S., Bachir-Bey, M., et Louaileche, H., 2009. Evaluation du pouvoir antioxydant de quelques variétés d'ail. Université Abderrahmane MIRA de Béjaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences Alimentaires et Département de biologie physico-chimique. Route de Targa-Ouzemour, 06000, Béjaia.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*. **26** (2), 211-219.

Muanda, F., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat. Université de Paul Verlaine-Metz. 216 p.

N

Nacz, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **41**, 1523-1542.

N'Guessan, J.D., Boni, A.R., Zirihi, G.N., Djaman, A.J., 2009. Relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols de six plantes de la pharmacopée ivoirienne. Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR biosciences, Université de Cocody-Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Nkhil, Z., 2009. Polyphénols de l'alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Université D'avignon et des Pays de Vaucluse Ecole Doctorale 306 – Spsa, Montpellier (Marrakech). 310 p.

O

Obame Engonga, L., 2009. Etude Phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Université D'Ouagadougou unité de formation et de recherche sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT) P : 201.

Omar, S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. **78**: 133–154.

P

Pélagie, Y., Alexis, T., Koudoro, Y., Agbangnan, P., Ndahischimiye, V., Djènantin T. S., Wotto, D., Eni-Coffi, A., and Sohounhloue, D., 2015. Comparative study of phenolic compounds and radical-scavenging activity of the extracts of seeds of *Garcinia kola* (Guttiferae) and *Cucumeropsis edulis* (Cucurbitaceae) of Benin. *International journal of innovation and scientific research*. ISSN 2351-8014 Vol. 15 No. 1 May 2015, pp. 217-227.

Prazad, K.N., Yang, B., Yang, S., Chen, Y., Zhao, M., Ashraf, M., Jiang, Y., 2009. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antyrosinase activities From Litchi (*Litchi Sinensis* Sonn) seeds. *Food Chemistry*, **116**: 1-7.

R

- Rezaire, A., 2012.** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpusbataua* (patawa). Thèse de doctorat. École doctorale pluridisciplinaire : Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques. Université des Antilles et de la Guyane. 186 p.
- Ribéreau-Gayon, P., 1968.** Les tannins, les composés phénoliques des végétaux. Paris. Ed Dunod.173-201.
- Richter, G., 1993.** Composés phénoliques. Métabolismes des végétaux : physiologie et biochimie. Edition. Press polytechnique et Universitaire, Rommand. pp. 319-339.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1987.** Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *Journal of Ethnopharmacology* **21**,139–152.
- Rock, E., 2003.** Stress oxydant, Micronutriments et santé. INRA-CRNH, Unité des maladies métaboliques et micronutriments. Université d'été de Nutrition. Pp, 37-42.
- Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., Fernandes, F.A.N., 2008.** Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocosnucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. **15** (1): 95-100.
- Rolland, Y., 2004.** Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux corps gras lipides journal **11** (6), 419-424.

S

- Sadki, C., Hacht, B., Amrani, S., Atmani, F., 2010.** Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers and cynodondactylon rhizomes extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **128** (2), 352–356.
- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007.** Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*. **13**: 413–421.
- Sarni-Manchado, P., et Cheynier, V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. Pp : 02-11.
- Silva, E. M., Rogez, H., etLarondelle, Y., 2007.** Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and purification technology*. **55**: 381-387.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16** (3), 144–158.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89**, 191–198.
- Soares, A.A., Marques de Souza, C.G., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Gomes da Costa, S. M., Peralta, R.M., 2009.** Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricusbrasiliensis* (*Agaricusblazei*Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry* **112** (4), 775–781.

T

Tabart, J., 2011. Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et étude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Thèse de doctorat. Faculte des sciences académie Universitaire Wallonie-Europe. 175 P.

Tinsson, W., 2010. Plants d'expérience: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et application 67, DOI 10.1007/978-3-642-11472-41,c-Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 532p.

X

Xia, X., Cao, J., Zheng, Y., Wang, Q., Xiao, J., 2014. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Industrial Crops and Product* **58**, 91–98.

Z

Zeghad, N., 2008. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale) Option : Biotechnologie végétale.

Annexes

Annexe 1 :

Courbes d'étalonnage des différents dosages

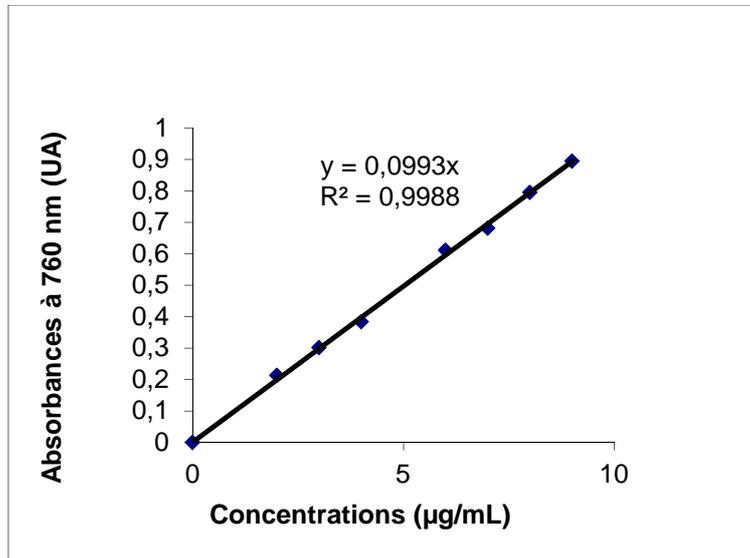


Figure 1: Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux.

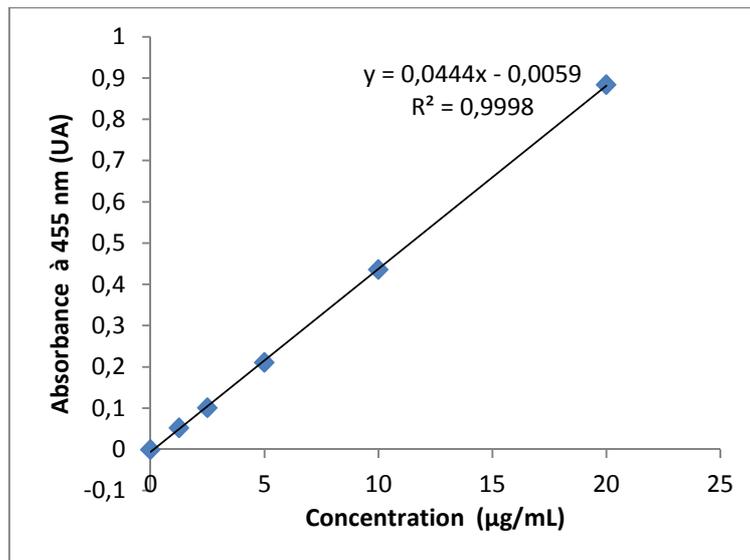


Figure 2: Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoides.

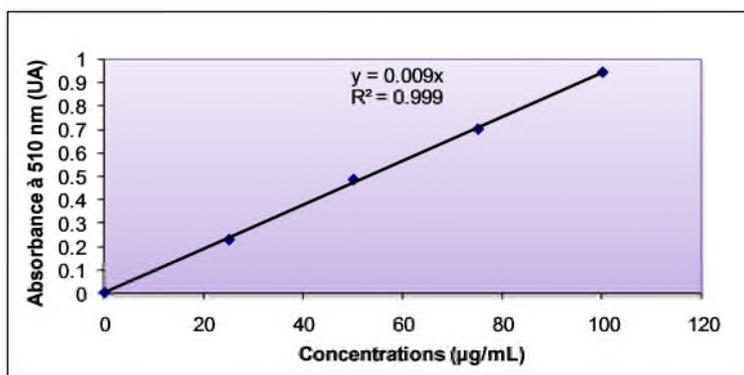


Figure 3: Courbe d'étalonnage de dosage des tanins.

Annexe 2 : Glossaire

Aciculaire : Se dit des feuilles en forme de pointe.

Alzheimer : Est une affection du cerveau dite « neuro-dégénérative », c'est-à-dire qu'elle entraîne une disparition progressive des neurones.

Angiospermes : Plantes à graines dont l'ovule fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique se transforme en un fruit clos.

Anticarcinogènes : Qui empêche le développement d'un cancer.

Antifongiques : Médicament utilisé dans le traitement des mycoses.

Anti-inflammatoires : Qui fait dégonfler et diminuer l'irritation.

Antivirales : Médicament utilisé dans le traitement des maladies virales.

Antiallergique : Qui est utilisé dans le traitement ou la prévention des allergies.

Antiseptique : Produit utilisé pour lutter contre les germes de la peau et des muqueuses.

Anthères : Partie supérieure fertile de l'étamine des fleurs où se forment les grains de pollen, et qui s'ouvre à maturité par déhiscence en libérant ces derniers.

Astringente : Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus et peut faciliter leur cicatrisation

Athérosclérose : Maladies dégénératives des artères, due à l'athérome et comportant un épaississement et un durcissement de leur paroi gênant la circulation sanguine.

Arbrisseaux : Petit arbre ramifié à la base.

Collagène : Protéine la plus abondante du corps humain responsable de la cohésion des tissus.

Cosmopolite : Se dit d'une espèce animale ou végétale présente dans toutes les parties du monde.

Corolles : Partie d'un périanthe d'une fleur constituée par l'ensemble des pétales.

Curatif : Propre à la guérison ou au traitement d'une maladie.

Diurétique : Substance qui entraîne une augmentation de la sécrétion urinaire.

Garrigues : Formation végétale méditerranéenne des sols calcaires constituée de chênes, kermès, d'arbustes aux feuilles persistantes et coriaces et de quelques herbes annuelles.

Grelot : petite boule de métal creuse et percée de trous renfermant un morceau de métal qui la fait résonner dès qu'elle est agité.

Hypertension : Augmentation anormale de la pression à l'intérieur d'une cavité ou d'un vaisseau.

Hyperlipidémie : Taux trop élevé de lipides dans le sang.

Hypotenseurs : Médicament qui diminue la tension artérielle.

Rancissement : Est une oxydation des acides gras en acide butyrique et radicaux peroxydes.

Rouille : Produit de corrosion des métaux ferreux, constitué principalement d'hydroxyde ferrique

Scavenger : Terme anglo-saxon qui signifie piéger.

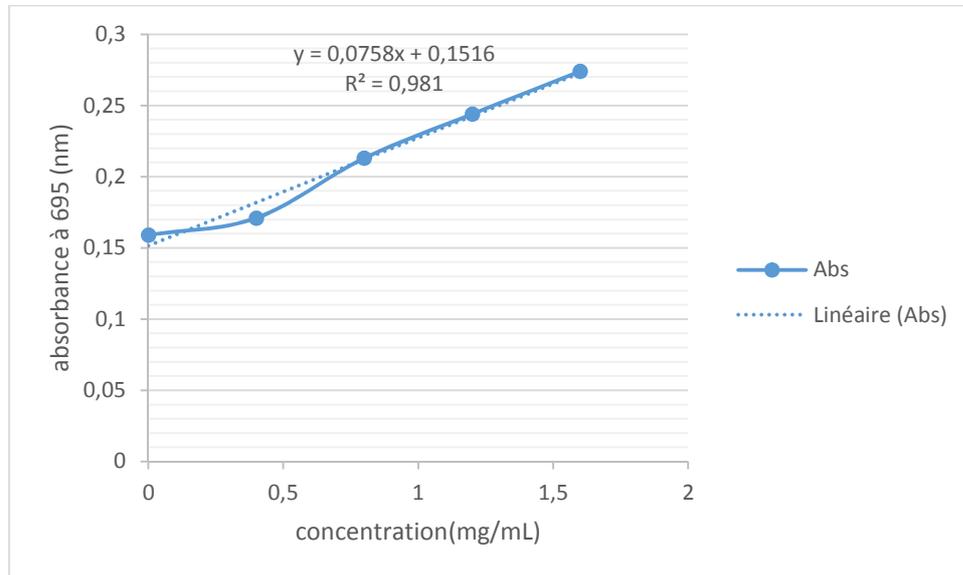
Sédatif : Se dit d'une substance qui agit contre la douleur, l'anxiété, l'insomnie ou qui modère l'activité d'un organe.

Sépales : Chacune des pièces du calice d'une fleur.

Spermaphytes : Nom d'embranchement donné aux plantes supérieures à graines.

Vasoconstricteur : Médicament qui diminue le calibre des vaisseaux en provoquant la contraction de leurs fibres musculaires.

Annexe 3



Figuer 4 : Courbe de phospholybdate d'ammunieme

Tableau I : Solvant et réactifs utilisés au cours du travail.

Nom du produit	Formule chimique	Marque	Masse molaire (g/mol)	Pays de fabricant
Acide gallique monohydrate	$C_7H_6O_2 \cdot H_2O$	BIOCHEM Chemopharma	188,14	Quebec
Acide sulfurique à 96-98%	H_2SO_4	BIOCHEM Chemopharma	98,07	Quebec
Carbonate de sodium decahydrique à 7,7 %	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	SIGMA-ALDRICH	286,14	Germany
Chloroforme	$CHCl_3$	BIOCHEM Chemopharma	119,35	Quebec
Chlorure d'aluminium à 2%	$AlCl_3$	BIOCHEM Chemopharma	133,341	USA
DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	SIGMA-ALDRICH	1235,86	Germany
Folin-Ciocalteu 1/10	-	BIOCHEM Chemopharma	-	France
Ethanol	C_2H_6O	SIGMA-ALORICH	46,07	Germany
Hexane	C_6H_{14}	BIOCHEM Chemopharma	86,18	Quebec
Méthanol à 99%	CH_3OH	GPR RECTAPUR	32,00	France
Molybdate d'ammonium tetrahydrique	$H_{24}MO_7N_6O_{24} \cdot 4H_2O$	BIOCHEM Chemopharma	1235,86	Quebec
Phosphate de sodium	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	BIOCHEM Chemopharma	1561,01	Quebec
Acétone	C_3H_6O	BIOCHEM Chemopharma	58,08	Quebec
Acétate d'éthyle	$C_4H_8O_2$	VWR Prolabo	88,11	Rrance
Sodium dodecyl sulfate	$C_{12}H_{23}Na \cdot H_2SO_4$	BIOCHEM Chemopharma	288,38	Georgia,USA
Triéthanolamine	$C_6H_{15}O_3N$	Prolabo	149,19	-
Chlorure ferrique	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	BIOCHEM Chemopharma	270,33	Engletair
Sérum d'albumine bovine	-	BIOCHEM Chemopharma	-	Unite Kingdom

Tableau II : Le matériel utilisé au cours du travail.

Matériel	Les appareils
<ul style="list-style-type: none">✓ Béchers✓ Burette graduée✓ Cuve en verre✓ Eprovettes graduées✓ Pipettes graduée✓ Tubes à essais✓ embouts✓ erlenmeyer	<ul style="list-style-type: none">✓ Bain-marie (RAYPA)✓ Balance de précision (SUMSUNG)✓ Micropipettes✓ Plaque magnétique agitatrice (VELP SCIENTIFICA)✓ Réfrigérateur (SAMSUNG)✓ Spectrophotomètre (UV-Vis Spectrophotomètre, Spectro Scan 50)✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA)✓ Centrifugeuse

Résumé

La méthode de surface de réponse développée par le plan d'expérience composite centré est utilisée dans le présent travail afin d'optimiser les paramètres d'extraction des polyphénols totaux d'*Erica multiflora*, utilisée traditionnellement pour soigner les brûlures et les blessures. Les conditions expérimentales optimales permettant une maximisation de l'extraction des polyphénols d'*Erica multiflora* sont : le solvant (méthanol) à une concentration de 100% (v/v) et la quantité de poudre de plante de 0,05 g pour une durée de macération de 5 minutes. Les teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins de l'extrait optimisé sont respectivement de $960 \pm 13,23$ mg EAG/g MS, $10,27 \pm 1,7$ mg EQ/g MS et $63,13 \pm 14,58$ mg EAT/g MS. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par deux tests différents, le pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium et le test antiradicalaire au DPPH[•]. La valeur des IC₅₀ sont de 10 et 4,6 mg/L respectivement pour le DPPH[•] et le pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium.

Mots clés : Optimisation, composite centré, extraction, polyphénols, activité antioxydante.

Abstract

The method of surface of answer developed by the composite experimental design centered is used in this work in order to optimize the parameters of extraction of total polyphenols of *Erica multiflora*, used traditionally to treat scalds and wounds. The optimal experimental conditions allowing a maximization of the extraction of polyphenols of *Erica multiflora* are: the solvent (methanol) with a concentration of 100% (v/v) and a quantity of powder of plant of 0,05 g for a period of 5 minute of maceration. The contents of phenolic compounds, flavonoïdes and tannins of the optimized extract are respectively of $960 \pm 13,23$ mg EAG/g MS, $10,27 \pm 1,7$ mg EQ/g MS and $63,13 \pm 14,58$ mg EAT/g MS. The evaluation of the antioxydant activity was carried out by two different tests, the reduction with the ammonium phosphomolybdate and the test antiradicalaire with the DPPH[•]. The value of the IC₅₀ are 10 and 4,6 mg/L respectively for the DPPH[•] and reduction with the ammonium phosphomolybdate.

Key words: Optimization, centered composite, extraction, polyphenols, antioxydant activity.