

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie physico-chimique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Fondamentale



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :.....

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

MASTER

**Etude de l'effet de quelques paramètres
d'extraction sur la teneur en composés
phénoliques et l'activité antioxydants
d'une plante médicinale en utilisant le
plan de l'expérience (Box-Behnken).**

Thème

Présenté par :

MERNACHE Khaled & MOUHLI Nadjim

Soutenu le : 25 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Mme ABDERRAHIM S.	MCA	Présidente
Mme Amir H.	MCA	Promotrice
Mme Yous F.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciements

Avant tout, nous transmettons notre gratitude envers le bon Dieu qui nous a accordé le courage, la patience et la volonté nécessaire pour mener à bien ce modeste travail.

Nos remerciements les plus sincères vont à notre promotrice, Mme AMIR Hassiba, pour son accompagnement et sa direction tout au long de ce travail, ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordé.

Nous remercions également les membres du jury, Mme ABDERRAHIM et Mme YOUS, qui nous ont fait l'honneur de présider et d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude envers le binôme ABDOUNE Hanane et DJAMA Katia pour leur précieuse contribution à la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements au Doctorant, M. Nabil DRIS, pour tous les efforts fournis et pour avoir eu confiance en nous. Ses conseils judicieux tout au long de notre parcours ont été très appréciés.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Au terme de toutes ces années d'étude nous dédions ce modeste travail en signe de respect et de remerciement :

A nos chers parents auxquels nous devons toutes nos reconnaissances ;

A toute la promotion Biochimie Fondamentale 2023 sans exception.

A tous ceux qui nous ont apporté de l'aide.

A nos frères et sœurs ;

A nos familles sans exception ;

A nos copains de chambres ;

A tous nos chers amis.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Synthèse bibliographique

Généralités sur la plante 02

I.1. Famille des lamiaceae 02

I.2. Genre *salvia* 02

I.2.1. Présentation 02

I.2.2. Propriétés pharmacologiques des *salvia* 02

I.3. Espèce *salvia chudaei* 03

I.3.1. Description et classification botanique 03

I.3.2. Répartition géographique 04

I.3.3. Usages 05

II. Généralités sur les composés phénoliques 05

II.1. Introduction 05

II.2. Définition 05

II.3. Principales classes des composés phénolique 06

II.3.1. Acides phénoliques 06

II.3.2. Flavonoïdes 07

II.3.3. Tanins 07

II.4. Propriété antioxydants des composés phénoliques 09

III. Plans d'expériences 09

III.1. Principaux avantages des plans d'expériences 10

III.2. Plans de surface de réponse 10

III.2.1. Plans de Box-Behnken 10

Partie Pratique

I. Matériel et méthodes 11

I.1. Préparation du matériel végétal 11

I.2. Optimisation des conditions d'extractions 11

I.2.1. Etude préliminaire 11

I.2.2. Plan d'expérience Box-Behnken 12

I.3. Détermination de la teneur en antioxydants 13

I.3.1. Dosage des composés phénoliques	13
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	14
I.4. Evaluation de l'activité antioxydants	14
I.4.1. Activité « scavenger » du radical DPPH.....	14
I.4.2. Activité « scavenger » du radical ABTS.....	15
I.4.3. Pouvoir réducteur du fer.....	16
I.4.4. Pouvoir chélateur de fer	16
I .5. Etude statistique	17
II. Résultats et discussion	18
II.1. Etude préliminaire	18
II.1.1. Effet de la nature du solvant d'extraction.....	18
II.1.2. Effet de la concentration du solvant d'extraction	20
II.1.3. Effet de la durée d'extraction.....	22
II.1.4. Effet du rapport solide/liquide	24
II.2. Application du plan d'expérience	25
II.2.1. Modèle mathématique.....	27
II.2.2. Effet des facteurs	27
II.2.3. Validation du model.....	32
II.3. Conditions optimales	34
Conclusion.....	37
Références bibliographiques.....	39
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
UV	Ultra-violet.
TCP	Teneur en composés phénoliques.
EAG	Equivalent acide gallique.
EQ	Equivalent quercetine.
EAA	Equivalent acide Ascorbique.
ANOVA	Analyse of variance
JMP	John's Machimtosh Project
P	Probabilité
MS	Matière sèche.
RMSE	Root Mean Squar Err

Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Synthèse bibliographique		
1	Espèce <i>Salvia chudaei</i> Battandier & Trabut.	4
2	Répartition géographique de <i>Salvia chudaei</i> Batt et Trab dans les montagnes sahariennes.	4
3	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.	6
4	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.	6
5	Squelette de base des flavonoïdes.	7
6	Structure chimique d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b).	8
Partie expérimentale		
7	Effet de la nature du solvant sur la teneur en composés phénoliques du <i>Salvia chudaei</i> .	18
8	Effet de la nature du solvant sur l'activité « scavenger » du radical DPPH du <i>Salvia chudaei</i> .	19
9	Effet de la concentration du solvant sur la teneur en composés phénolique de <i>Salvia chudaei</i> .	20
10	Effet de la concentration du solvant sur l'activité «scavenger » du radical DPPH de <i>Salvia chudaei</i> .	21
11	Effet de la durée d'extraction sur la teneur en composés phénoliques de <i>Salvia chudaei</i> .	22
12	Effet de la durée d'extraction sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de <i>Salvia chudaei</i> .	23
13	Effet du rapport solide/liquide sur la teneur en composés phénoliques de <i>Salvia chudaei</i> .	24
14	Effet du rapport solide/liquide sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de <i>Salvia chudaei</i> .	25
15	Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en	29

	composés phénoliques.	
16	Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) de <i>Salvia chudaei</i> .	31
17	Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode de macération.	34

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Synthèse bibliographique		
I	Taxonomie de <i>Salvia chudaei</i> .	3
II	Différentes classes des flavonoïdes.	8
III	Récapitulatif des paramètres testés lors de l'étude préliminaire et les conditions d'extraction optimales sélectionnées.	12
IV	Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant l'extraction par macération.	13
V	Valeurs expérimentales et prédites des teneurs en composés phénoliques (TCP) et de l'activité DPPH de <i>Salvia chudaei</i> obtenues avec le plan Box-Behnken.	26
VI	Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	27
VII	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.	33
VIII	Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité anti-radicalaire (DPPH).	33
IX	Conditions optimales et résultats prédits et expérimentaux des teneurs en CP et de l'activité DPPH obtenues par macération.	35
X	Récapitulative des teneurs en composés phénoliques (CP) et en flavonoïde (TF) et des activités antioxydantes de l'extrait obtenu avec les conditions optimales.	35

Introduction

Introduction

Depuis des dizaines de milliers d'années, l'Homme et les plantes vivent côte à côte et cela a permis l'élaboration de plus en plus l'utilisation des plantes au fil des siècles grâce à leurs principes actifs qui agissent directement sur l'organisme et qui confèrent le pouvoir thérapeutique. Environ deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (**Morel, 2011 ; Iserin, 2001**). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 4 000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique (**OMS, 2003**).

L'Algérie, dispose grâce à son climat diversifié d'une large gamme de plantes médicinales qui sont utilisées dans la médecine populaire (**Quezel et al., 1962 ; Hamzaa et al., 2010**). Parmi ces plantes, nous nous sommes intéressés à la plante *Salvia chudaei* Batt & Trab, qui est une espèce endémique du Sahara central (**Ozenda, 1991**).

Les espèces de genre *Salvia* sont très bien connues et utilisées en médecine traditionnelle, cela pour leurs effets : antibactérien, anti-inflammatoire, antivirale, antioxydant et hypoglycémiant. La recherche phytochimique de ces espèces a montré qu'elles sont très riches en huiles essentielles, tanins et en flavonoïdes et autres composés phénoliques (**Dellile, 2007**).

Dans ce contexte, notre travail s'inscrit dans le cadre d'étudier l'optimisation de quelques paramètres, en utilisant le modèle de plan d'expérience de Box-Behnken, sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydants du *Salvia chudaei*. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Etudier l'effet de quelques paramètres d'extraction (la nature et la concentration du solvant, la durée d'extraction et le rapport solide/liquide) sur la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH) ;
- Optimiser ces paramètres d'extraction en utilisant le plan d'expérience Box-Behnken ;
- Etudier l'activité anti-radicalaire et réductrice de l'extrait qui a donné la meilleure teneur en composés phénoliques, en appliquant plusieurs tests.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur la plante

I.1. Famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae (Labiatae) est l'une des premières à être distinguées par les botanistes, elle est composée de 236 genres et 7136 espèces, (**Pistrick, 2002 ; Alice et al., 2016**).

Les plantes de cette famille sont surtout des plantes méditerranéennes (**Carrubba et al. 2006**), qui ne se rencontrent guère que dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar (**Ozenda, 1977**).

Un très grand nombre de genres de la famille Lamiaceae sont riches en huiles essentielles, ce qui leur confère une importance économique et thérapeutique mais aussi, en composés phénoliques, tannins, flavonoïdes, iridoïdes glycolysés, quinones, coumarines, terpénoïdes, saponines et dans certains cas, des pyridines et des alcaloïdes pyrrolidiniques (**Kuklinski, 2000 ; Naghibi et al., 2005**).

I.2. Genre *Salvia*

I.2.1. Présentation

Le genre *Salvia* fait partir des genres de la famille des Lamiaceae, comprenant plus de 959 espèces réparties à l'échelle mondiale. L'Algérie compte 23 espèces de ce genre (**Quezel et Santa, 1963 ; Alice et al., 2016**).

Le nom *Salvia* dérive du latin « *salvere* » en référence aux propriétés curatives de la plante, qui était dans les temps anciens célébré comme une herbe médicinale (**Mirjalili et al., 2006**).

I.2.2. Propriétés pharmacologiques des *Salvia*

Les plantes du genre *Salvia* ont une longue histoire d'utilisation dans le traitement des maladies humaines. Elles sont particulièrement connues pour leurs utilisations traditionnelles dans le traitement de diverses affections telles que le rhume, les infections, la bronchite, les douleurs et les hémorragies (**Bahadori et Mirzaei, 2015**). Ces plantes ont également été utilisées pour traiter les infections microbiennes, et les symptômes associés au cancer (**Abdulhamid et al., 2013 ; Kamatou et al., 2008**).

Ces espèces possédant plusieurs activités biologiques, notamment antioxydantes, antidiabétiques, antibactériennes, anti-tumorale, antiplasmodique, antiseptique et anti-inflammatoires. En outre, elles peuvent être utilisées comme substitut aux conservateurs alimentaires traditionnels (**Bahadori et Mirzaei, 2015 ; Kahraman et al., 2010**).

I.3. Espèce *Salvia chudaei*

Parmi les 23 espèces algériennes de genre *Salvia*, une espèce spécifique, *Salvia Chudaei Batt & Trab*, a été découverte par deux explorateurs naturalistes **E.F. Gautier** et **R. Chudeau** après l'exploration de Hoggar en 1902 (**Battandier et al., 1913**).

La *Salvia chudaei Batt & Trab* est connue sous le nom de la sauge de Sahara (**Abeier, 2007**). Le nom arabe est Aouit et Tagroufte (**Hammiche et Maiza, 2006**).

I.3.1. Description et classification botanique

Salvia chudaei est une plante arbustive persistante très rameuse, de couleur gris bleuté. Elle mesure environ 30 à 40 cm de haut et possède des tiges très feuillues. Les feuilles sont étroites et allongées, crispées sur la marge. À l'extrémité des tiges, les inflorescences en épi portent de longs poils laineux qui masquent les petites fleurs bleu pâle. La plante entière dégage une odeur puissante et agréable (**Sahki et al., 2004**).

La classification phylogénétique de *Salvia chudaei* est représentée dans le tableau suivant :

Tableau I : Taxonomie de *Salvia chudaei* (Bouzar et Nehari, 2019).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Sous classe	Lamiidae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Salvia</i>
Espèce	<i>Salvia chudaei</i> Battandier & Trabut



Figure 1 : Espèce *Salvia chudaei* Battandier & Trabut (**Boukhalfa, 2017**).

I.3.2. Répartition géographique

Salvia chudaei est une espèce caractéristique de la souche d'endémisme continentale insulaire des montagnes sahariennes, ces aires de répartition sont le Hoggar, le Tassili, le Tibesti. Elle est assez commune dans le secteur du Sahara central et dans les Oueds rocailleux (**Jean-pierre, 2001**) ou dans d'autres régions à sables grossiers (**Sahki et Sahki, 2004** ; **Benchelah et al., 2011**).

Cette répartition est indiquée sur la figure suivante :

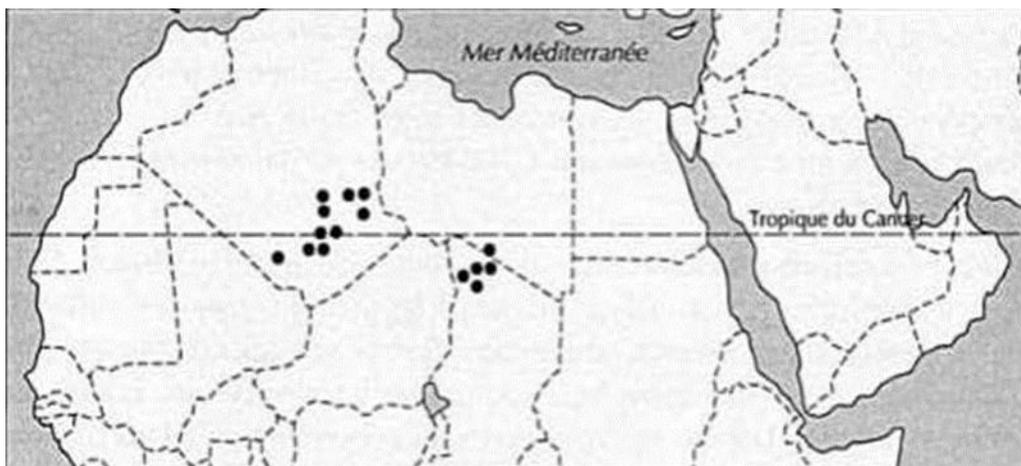


Figure 2 : Répartition géographique de *Salvia chudaei* Batt et Trab dans les montagnes sahariennes (**Lebrun, 2001**).

I.3.3. Usages

Salvia chudaei dégage une odeur agréable, elle aromatisé agréablement le thé des Touaregs. En cuisine, elle est ajoutée à certains plats en condiment, à la viande ou aux bouillies de mil (**Ozenda, 1977 ; Sahki et Sahki, 2004 ; Benchelah et al., 2011**).

Elle a des usages médicaux et culinaires multiples. La plante réduite en poudre et dissoute dans l'eau est utilisée contre les rhumatismes, les douleurs musculaires, les maux d'estomac, les brûlures mictionnelles et pour soulager les ulcères d'estomac (**Benchelah et al., 2000 ; Sahki, 2004**).

II. Généralités sur les composés phénoliques

II.1. Introduction

De nombreuses espèces de Lamiacées ont fait l'objet d'études phytochimiques qui ont permis de mettre en évidence un grand nombre de métabolites secondaires appartenant essentiellement aux groupes des phénols, des polyphénols et des terpénoïdes (**Wichtl et Anton, 2003**).

II.2. Définition

Les composés phénoliques se caractérisent par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles. Ils sont trouvés dans tous les niveaux et dans les organes des plantes (fruits, feuilles, tiges, racines, ...) (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Ces composés se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...) et par les liaisons possibles avec d'autres molécules (**Machiex et al., 2005**). Ils sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés avec d'autres fonctions (éther, ester, hétéroside) (**Bruneton, 2009**). Les polyphénols peuvent être conjugués, avec un ou plusieurs résidus glucidiques, ou être liés à d'autres composés chimiques tels que des acides carboxyliques, des amines, des lipides ou à d'autres phénols (**Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Stoclet et al., 2004 ; Ferguson, 2001**).

II.3. Principales classes de composés phénoliques

Harborne, 1980 et Macheix *et al.* (2006) classent les composés phénoliques en se basant sur le nombre de carbone d'une part, et d'autre part, sur la structure de squelette de base. Les principales classes de ces composés sont les acides phénoliques (les dérivés des acides benzoïques et acides cinnamiques), les coumarines, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés (Naczki *et Shahidi*, 2004).

II.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) (Figure 3) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (Bruneton, 2008) (Figure 4).

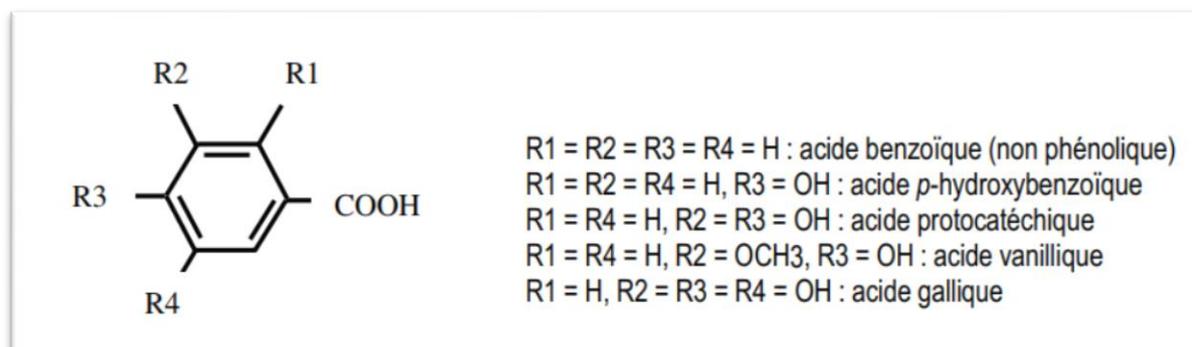


Figure 3 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Bruneton, 2008).

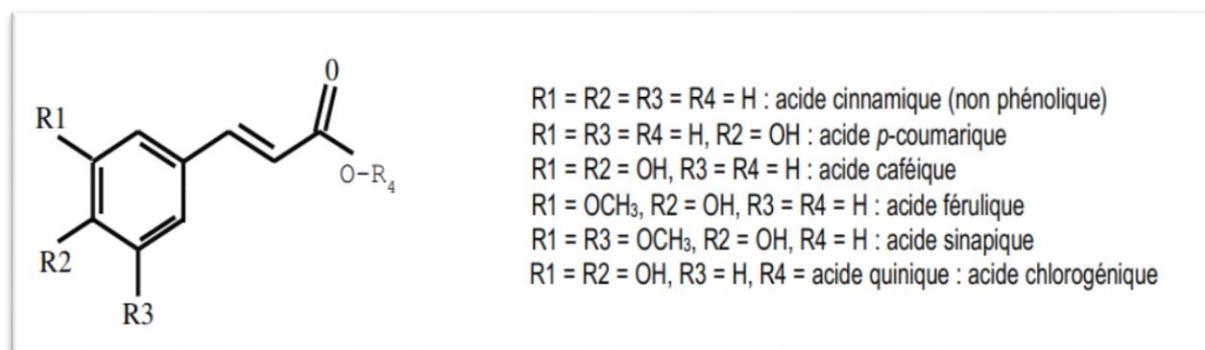


Figure 4 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Han *et al.*, 2007 ; Chira *et al.*, 2008).

II.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux noyaux aromatiques, deux cycles C₆ (A et B) reliés par une chaîne C₃, formant une structure C₆-C₃-C₆ (**Figure 5**).

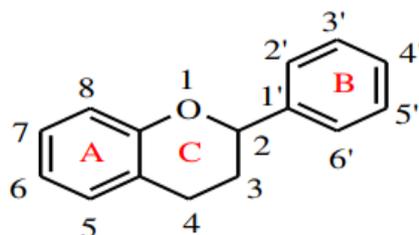


Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes (**Crozier, 2003**).

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV (**Crozier, 2003 ; Tehami, 2017**).

Les flavonoïdes sont classés selon plusieurs critères : présence ou non d'une double liaison en position 2, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position 3 (**Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006**). Des groupements hydroxyles et méthoxyles peuvent le plus souvent se situer en position 2', 3', 4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7.

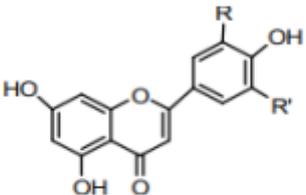
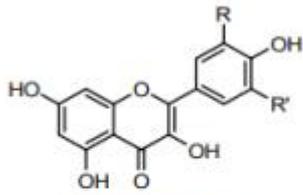
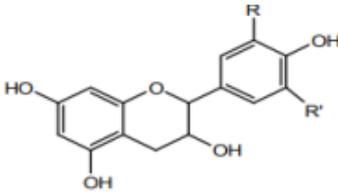
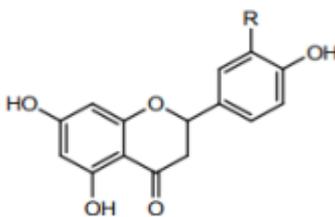
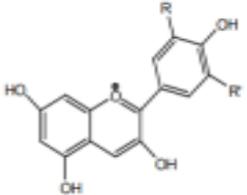
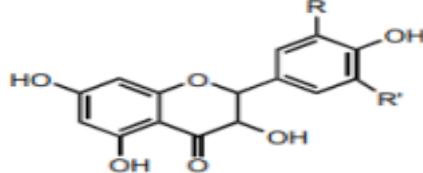
Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les flavanones, les anthocyanes et les flavanonols (**Pietta, 2000 ; Gramza et Korczak, 2005**) (**Tableau II**).

II.3.3. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes. Ils se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines (**Makkar, 2003 ; Mangan, 1988 ; Mcsweeney et al., 2001**). Ils sont très répandus dans le règne végétal, Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains (**Khanbabae et Ree, 2001**).

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (**Linden et Lorient, 1994**) (**Figure 6**).

Tableau II : Différents classes des flavonoïdes (Nkhili, 2009).

<p style="text-align: center;">Flavones</p>  <p style="text-align: center;">R=R'=H: Apigénine R= OH, R' = H: Lutéoline R=R'= OCH₃: Tricine</p>	<p style="text-align: center;">Flavonols</p>  <p style="text-align: center;">R=R'=H: Kaempférol R= OH, R' = H: Quercétine R= OCH₃, R' = H: Isorhamnétine R=R'= OH: Myricétine</p>
<p style="text-align: center;">Flavan-3-ols</p>  <p style="text-align: center;">R=R'=H : Afzéléchine R = OH, R' = H : Catéchine R = R' = OH : Gallocatéchine</p>	<p style="text-align: center;">Flavanones</p>  <p style="text-align: center;">R= H : Naringénine R= OH : Eriodictyol</p>
<p style="text-align: center;">Anthocyanes</p>  <p style="text-align: center;">R = R' = H : Pélagonidine R = OH, R' = H : Cyanidine R = OCH₃, R' = H : Péonidine R = R' = OH : Délphinidine R = R' = OCH₃ : Malvidine R = OH, R' = OCH₃ : Pétunidine</p>	<p style="text-align: center;">Flavanonols</p>  <p style="text-align: center;">R= OH, R' =H: Taxifoline R= OH, R'= OH: Ampéloptol</p>

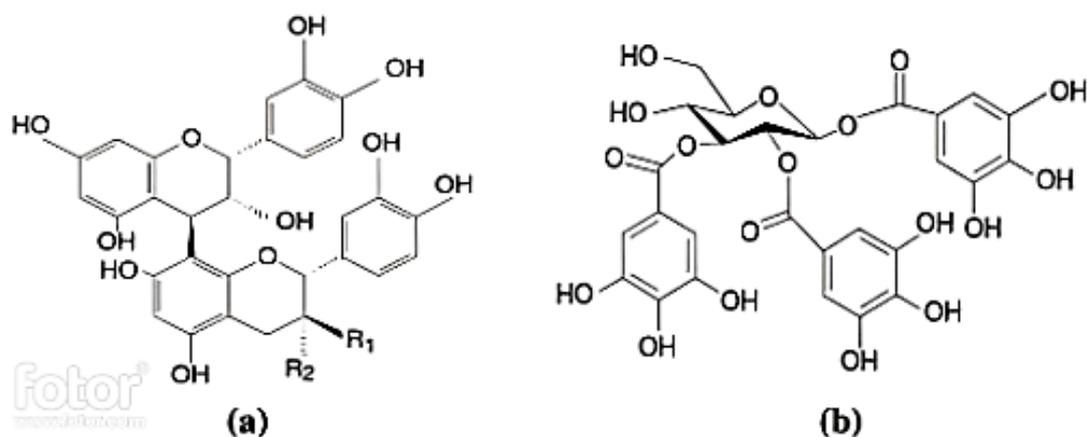


Figure 6 : Structure chimique d'un tannin condensé (a) et d'un tannin hydrolysable (b) (Derbel et al., 2005).

II.4. Propriété antioxydants des composés phénoliques

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydants grâce à leur diversité structurale, via plusieurs mécanismes et agissent à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux de transition, la neutralisation des radicaux libres, l'inhibition d'enzymes génératrice de radicaux libres, et l'induction de la synthèse d'enzymes antioxydants (Cotelle et al., 1995 ; Bors et al., 1997 ; Grassmann et al., 2002). Cette activité est étroitement liée à leur structure, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim et al., 2002).

III. Plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Cette méthode permet d'extraire le maximum d'information avec un minimum de résultats de simulations. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (Goupy, 2006).

Pour qu'un plan d'expérience soit utilisable, il est nécessaire qu'il remplisse la condition de l'orthogonalité qui est indispensable pour pouvoir calculer l'effet d'un facteur (Gillon, 1997).

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur (Goupy, 2006) :

- Plans factoriels complets à deux niveaux.
- Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux.
- Autres plans à deux niveaux (les plans de Koshal, les plans de Rechtschaffner, les plans de Plackett et Burmann, les tables de Taguchi, les plans sursaturés).
- Plans à plusieurs niveaux (plans complets à trois niveaux, carrés latins, carrés gréco-latins, carrés de Youden, plans à niveaux mixtes).
- Plans pour surfaces de réponse (les plans composites, les plans de Doehlert, les plans de Box-Behnken, les plans hybrides, les plans de Mozzo).

III.1. Principaux avantages des plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié (**Gillon, 1997**). Il présente des principaux avantages qui sont :

- Diminution du nombre d'essais.
- Détection des interactions entre facteurs.
- Une précision optimum des résultats.
- Modélisation des réponses étudiées.
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs.

III.2. Plans de surface de réponse

La méthodologie de surface de réponse fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats (**Annadurai et Sheeja, 1998**).

Il existe trois principaux types de plans de surface de réponse couramment utilisés, à savoir les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans composites centrés.

III.2.1. Plans de Box-Behnken

Box et Behnken ont proposé en 1960 ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Ce sont des plans dont les variables ne prennent que 3 niveaux (-1, 0 et +1) (**Chagnon, 2005**).

Ce modèle est un moyen important pour la détermination des interactions présentes entre les différents facteurs ainsi que la détermination de leurs concentrations optimales. Les plans de Box-Behnken sont une alternative aux plans composites parce qu'ils requièrent seulement 3 niveaux pour chaque facteur et permettent aussi de modéliser une surface de réponse de deuxième degré (**Benoist et al., 1994**).

Partie expérimentale

I.1. Préparation du matériel végétal

La plante *Salvia chudaei* a été récoltée en mars 2023 à la Wilaya de Tamanrasset. Après la récolte, le matériel végétal qui est constitué des parties aériennes de la plante, a été nettoyé des poussières et de toutes autres impuretés, puis séché à une température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière. Le matériel végétal séché a été broyé puis tamisé. Les fractions dont le diamètre est inférieur à 250 μ m ont été retenues pour l'extraction.

I.2. Optimisation des conditions d'extractions

I.2.1. Etude préliminaire

Dans ce travail, une étude préliminaire a été réalisée afin d'étudier l'effet de la durée d'extraction, de la nature et de la concentration du solvant et du rapport solide/liquide sur la teneur en composés phénoliques et sur l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH de la partie aérienne de la plante *Salvia chudaei*, en utilisant la technique d'extraction par macération.

- **Effet de la nature du solvant d'extraction**

Afin d'étudier l'effet de la nature du solvant d'extraction, les composés phénoliques totaux de *Salvia chudaei* ont été extraits en utilisant comme solvants l'eau distillée, l'acétone 50 % et l'éthanol 50%.

Une quantité de 0,2g de la poudre de *Salvia chudaei* a été mélangée avec 20mL du solvant d'extraction. Après 60min de macération, les mélanges obtenus ont été filtrés et utilisés pour le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité DPPH.

- **Effet de la concentration du solvant d'extraction**

Pour étudier l'effet de la concentration du solvant, l'extraction a été réalisée en utilisant le solvant qui a donné le meilleur rendement en composés phénoliques à différentes concentrations : 30%, 50%, 70% et 90%.

Une quantité de 0,2g de la poudre a été mélangée avec 20mL du solvant d'extraction. Après 60 min de macération, les mélanges obtenus ont été filtrés et utilisés pour le dosage.

- **Effet de la durée d'extraction**

L'effet de la durée d'extraction a été étudié en réalisant des extractions par macération pendant : 1h, 1h30min, 2heures et 2h30min, en mélangeant 0,2g de la poudre avec 20mL du solvant qui a donné les meilleurs résultats précédemment.

- **Effet du rapport solide-liquide**

L'effet du rapport solide/liquide a été évalué en testant quatre rapport solide/liquide à savoirs : 0,2/20 ; 0,4/20 ; 0,6/20 et 0,8/20 (g/mL).

L'extraction a été réalisée en sélectionnant les meilleures conditions déterminées précédemment. Une quantité de 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ou 0,8g de la poudre a été mélangée avec 20mL d'acétone (70%). Après 1h30min de macération, les mélanges obtenus ont été filtrés et utilisés pour le dosage et la détermination de l'activité antioxydants.

Les différents paramètres examinés dans l'étude préliminaire et les résultats qui ont donné le meilleur rendement en composés phénoliques totaux (CPT) obtenus par la technique de macération, sont résumé dans le tableau N° III.

Tableau III : Récapitulatif des paramètres testés lors de l'étude préliminaire et les conditions d'extraction optimales sélectionnées.

Paramètres testés	Paramètre sélectionné
Nature du solvant : Eau distillée, Ethanol 50%, Acétone 50%.	Acétone 50%
Concentration du solvant : Acétone 30, 50, 70, 90%	Acétone 70%
Durée d'extraction : 60, 90, 120, 150 min.	90 min
Rapport solide/liquide : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 g/20mL.	0,2/20 g/mL

Les résultats de cette étude préliminaire ont permis de sélectionner un intervalle approprié pour l'extraction des composés phénoliques pour chaque variable indépendante.

I.2.2. Plan d'expérience Box-Behnken

L'optimisation de la méthode d'extraction a été réalisée en employant le plan de Box-Behnken de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de trois variables indépendantes : la concentration du solvant (%), la durée (min), et le rapport solide/liquide (g/mL) qui sont désignés par X1, X2 et X3, respectivement.

L'étude préliminaire a été réalisée pour déterminer les valeurs minimales et maximales des variables qui influencent l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans le tableau (IV).

Tableau IV : Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant l'extraction par macération.

Variables indépendantes	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
X1: Solvant (%)	50	70	90
X2: Temps (min)	60	90	120
X3: Ratio Solide/Liquide (g/20mL)	0,1	0,2	0,4

L'étude préliminaire a été réalisée sur ces paramètres afin d'optimiser les deux réponses : la teneur en composés phénoliques (TCP), et l'activité antioxydants évaluée par le test d'inhibition du radical DPPH.

La méthodologie des surfaces de réponses permet de modéliser les deux réponses étudiées sous forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-dessous :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} x_i x_j + E \dots \dots \dots \text{(Equation1)}$$

Où : y représente la réponse étudiée (y représente TCP ou le pourcentage d'inhibition du radical DPPH); β_0 est un coefficient constant : β_i , β_{ii} et β_{ij} sont des coefficients des limites linéaires, quadratiques et interactives, respectivement, et le x_i et x_j représentent les variables indépendantes codées et E représente l'erreur expérimentale.

I.3. Détermination de la teneur en antioxydants

I.3.1. Dosage des composés phénoliques

- **Principe**

Le principe de dosage des composés phénoliques est basé sur la réduction en milieu alcalin de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{28}), lors de l'oxydation des polyphénols. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Ribéreau-Gayon et al., 1982**).

- **Mode opératoire**

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Kähkönen et al. (1999)**. Un volume de 0,5mL du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 100uL d'extrait. Après 3 minutes, 0,4mL de la solution de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés. Après 1 heure d'incubation, l'absorbance est mesurée à 740nm. La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en milligramme équivalent acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche, est déterminée en se référant à la droite d'étalonnage (Annexe 1).

I.3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres avec l'aluminium sous forme d'ions Al^{+3} après décomposition de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les complexes formés sont responsables de l'absorption de la lumière dans le visible (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

- **Mode opératoire**

Les teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus sont déterminées par la méthode de **Lamaison et Carnet (1990)**. Une quantité de 0,5mL de chaque extrait a été ajoutée à un volume égal du chlorure d'aluminium (2%). L'absorbance a été lue à 430nm après 20 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent quercétine (EQ) par gramme de matière sèche à partir de la droite d'étalonnage (Annexe 2).

I.4. Evaluation de l'activité antioxydants

I.4.1. Activité « scavenger » du radical DPPH

- **Principe**

Un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH· (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) de coloration violette (forme oxydée) pour le réduire en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picryl hydrazine) de coloration jaune-verte (**Molyneux, 2004**).

- **Mode opératoire**

L'effet « scavenger » du DPPH est déterminé par la méthode de **Kroyer et Hegedus (2001)**; 100uL d'extrait sont ajoutés à 900uL de DPPH (60 μ M). L'absorbance a été lue à 517nm après 1 heure d'incubation à l'obscurité. L'activité « scavenger » du DPPH est exprimé en milligramme équivalent acide ascorbique (EAA) par gramme de matière sèche à

partir de la droite d'étalonnage (Annexe 3). L'activité « scavenger » du radical ABTS^{•+} est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

A_{témoin} : Absorbance du témoin (DPPH).

A_{échantillon} : Absorbance de l'extrait (extrait + DPPH).

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité antioxydants (valeur IC50 (mg/mL)) a été calculée à partir du graphique des pourcentages d'activité antioxydants par rapport aux différentes concentrations de l'extrait étudié.

I.4.2. Activité « scavenger » du radical ABTS

- **Principe**

La méthode qui détermine l'activité « scavenger » du radical ABTS est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) de coloration bleue verte en le transformant en ABTS-H⁺ incolore, par un don d'hydrogène (Antolovich et al., 2002). La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

- **Mode opératoire**

Le piégeage du radical cationique ABTS^{•+} est déterminé par la méthode de **Re et al. (1999)**. La solution du radical cationique ABTS^{•+} a été préparée en mélangeant 2,45 mM d'ABTS avec 7 mM de persulfate de potassium. Après 16 heures d'incubation la solution ABTS^{•+} a été diluée avec l'éthanol, afin d'obtenir une absorbance de 0,7± 0,02 à 734 nm. L'absorbance a été lue à 734 nm après 6 min d'incubation à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité « scavenger » du radical ABTS^{•+} est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

A_{témoin} : Absorbance du témoin (ABTS^{•+}).

A_{échantillon} : Absorbance de l'extrait (extrait + ABTS^{•+}).

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité antioxydants (valeur IC50 (mg/mL)) a été calculée à partir du graphique des pourcentages d'activité antioxydants par rapport aux différentes concentrations de l'extrait étudié.

I.4.3. Pouvoir réducteur du fer

- **Principe**

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence d'antioxydants réducteurs (**Bijoy et al., 2008**). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (**Gülçin et al., 2003**).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode de **Yildirim et al. (2001)** ; 1mL d'extrait est additionné à 2,5mL de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5mL de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50°C pendant 20 min, 2,5mL d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés au mélange. Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, 2,5mL du surnageant sont mélangés avec 2,5mL d'eau distillée et 0,5mL de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700nm, les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide ascorbique (EAA) par gramme de matière sèche à partir de la droite d'étalonnage (Annexe 4).

I.4.4. Pouvoir chélateur du fer

- **Principe**

Le pouvoir chélateur du fer est une méthode utilisé pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait. La ferrozine réagit avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel, formant ainsi un complexe Ferrozine- Fe^{2+} qui présente une intense couleur violette (**Zhao et al., 2010**). Lorsqu'un agent chélateur est présent, la formation de ce complexe est perturbée ce qui entraîne une diminution de la couleur.

- **Mode opératoire**

La capacité chélatrice de l'extrait étudié a été estimée par la méthode de **Dinis et al. (1994)**. Pour 0,1 mL d'extrait, 2,75 mL d'eau distillée et 0,1 mL de chlorure ferreux (2 mM) ont été ajoutés. Après agitation pendant 5min, 0,1mL de ferrozine (5 mM dans éthanol) sont additionnés au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 562 nm. Le pourcentage de la capacité chélatrice du fer est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance du témoin.

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'extrait.

La concentration d'extrait fournissant 50% d'activité antioxydants (valeur IC50 (mg/mL)) a été calculée à partir du graphique des pourcentages d'activité antioxydants par rapport aux différentes concentrations de l'extrait étudié.

I .5. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec l'application ANOVA univariée (test Tukey-Kramer, logiciel JMP10) et la comparaison des résultats est prise à la probabilité $P < 0,05$. Toutes les données représentent la moyenne de trois essais \pm écart type.

Le logiciel JMP (Version 10, SAS) est utilisé pour construire le plan d'expérience de Box-Behnken pour l'analyse de tous les résultats.

II. Résultats et discussion

La présente étude a été consacrée à la détermination de l'effet de plusieurs paramètres d'extraction à savoir : la nature et la concentration du solvant, la durée d'extraction et le rapport solide/liquide, sur la teneur en polyphénols totaux et sur l'activité anti-radicalaire de *Salvia chudaei*, en utilisant la méthodologie de surface de réponse.

II.1. Etude préliminaire

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer les variables qui donnent les meilleures teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et la plus importante activité "scavenger" vis-à-vis du DPPH.

II.1.1. Effet de la nature du solvant d'extraction

L'effet de la nature du solvant d'extraction, à savoir l'eau distillée, l'éthanol 50% et l'acétone 50%, sur la teneur en polyphénols et l'activité antioxydants (DPPH) de *Salvia chudaei* a été évaluée.

- Teneur en composés phénoliques

L'analyse statistique des teneurs en composés phénoliques des extraits du *Salvia chudaei* a révélé des différences significatives en fonction du solvant utilisé ($P < 0,05$) (Figure 7).

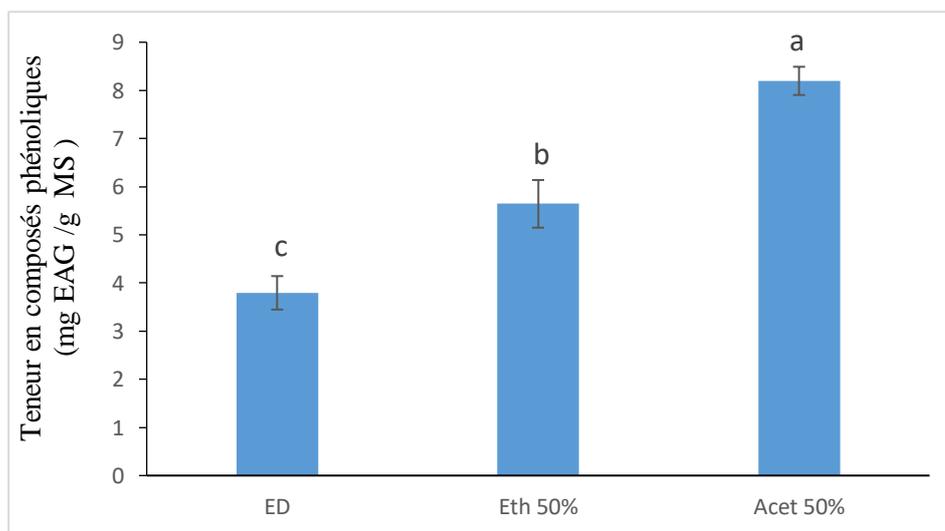


Figure 7 : Effet de la nature du solvant sur la teneur en composés phénoliques de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

Les résultats de cette étude montrent que les meilleurs teneurs en composés phénoliques de *Salvia chudaei* ont été obtenues en utilisant l'acétone 50% comme solvant d'extraction avec une valeur de 8,20 mg EAG/g MS, suivi par l'éthanol 50% puis l'eau distillée avec les valeurs 5,64 et 3,8 mg EAG/g MS, respectivement. Cette différence pourrait être expliquée par la différence de la solubilité des composés phénoliques et de la polarité du solvant utilisée. Les composés phénoliques sont souvent plus solubles dans des solvants organiques qui dépendent de leur structure chimique.

L'étude menée par **Mahmoudi et al. (2013)**, a révélé que le meilleur solvant d'extraction est l'acétone, suivi par l'eau et le méthanol. **Farhoosh, (2009)** a rapporté que l'acétone diluée à 50% est le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols et cela est dû à sa meilleure sélectivité et à sa faible viscosité, ce qui pourrait soutenir les résultats trouvés.

Il est recommandé d'utiliser des solvants acétoniques plutôt que le méthanol ou l'éthanol pour une extraction plus efficace des composés phénoliques. En effet, les solvants acétoniques présentent l'avantage de précipiter les protéines est d'extraire faiblement les sucres (**Boizot et Charpentier, 2006**).

- **Activité « scavenger » du radical DPPH**

L'analyse statistique a montré une différence significative entre les activités anti-radicalaires (DPPH) des extraits obtenus selon le solvant utilisé ($p < 0,05$) (**Figure 8**).

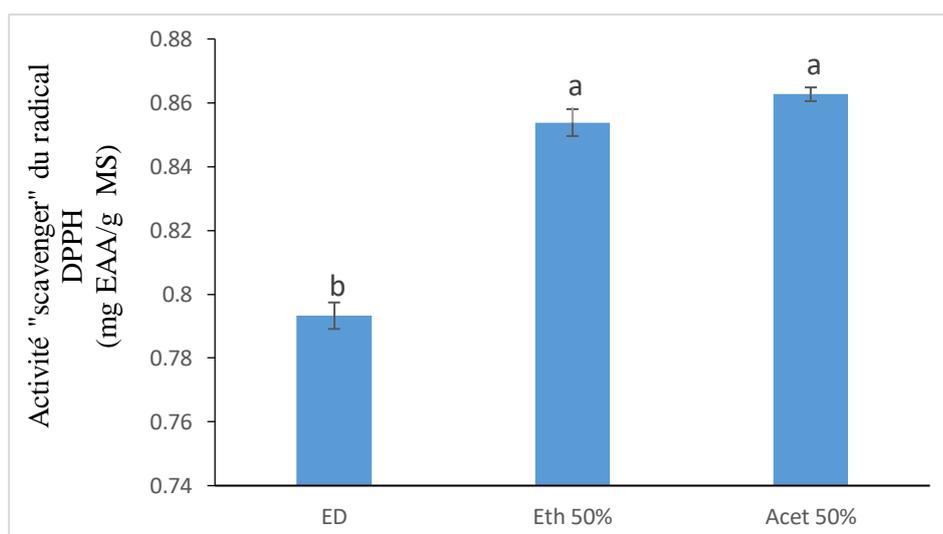


Figure 8 : Effet de la nature du solvant sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents)

Dans la présente étude, l'étude statistique indique que les activités anti-radicalaires (DPPH) les plus élevées ont été trouvées avec l'acétone 50% avec une moyenne de 0,86 mg EAA/g MS et l'éthanol 50% avec une moyenne de 0,85 mg EAA/g MS. Alors que la plus basse activité a été révélée en utilisant l'eau distillée avec une moyenne de 0,79 mg EAA/g MS.

L'étude menée par **Duong et al. (2015)**, montre que les plus fortes activités inhibitrices des radicaux DPPH, sont marquées en utilisant les extraits d'acétone et confirme que l'acétone aqueux est un bon solvant pour l'extraction des antioxydants.

II.1.2. Effet de la concentration du solvant d'extraction

Afin d'évaluer l'impact de la concentration du solvant d'extraction sur la quantité de polyphénols et l'activité anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei*, quatre différentes concentrations d'acétone (30%, 50%, 70% et 90%), ont été testées.

- **Teneur en composés phénoliques**

L'analyse statistique des teneurs en composés phénoliques des extraits de *Salvia chudaei*, a révélé des différences significatives en fonction de la concentration du solvant utilisée pour l'extraction ($p < 0,05$) (**Figure 9**).

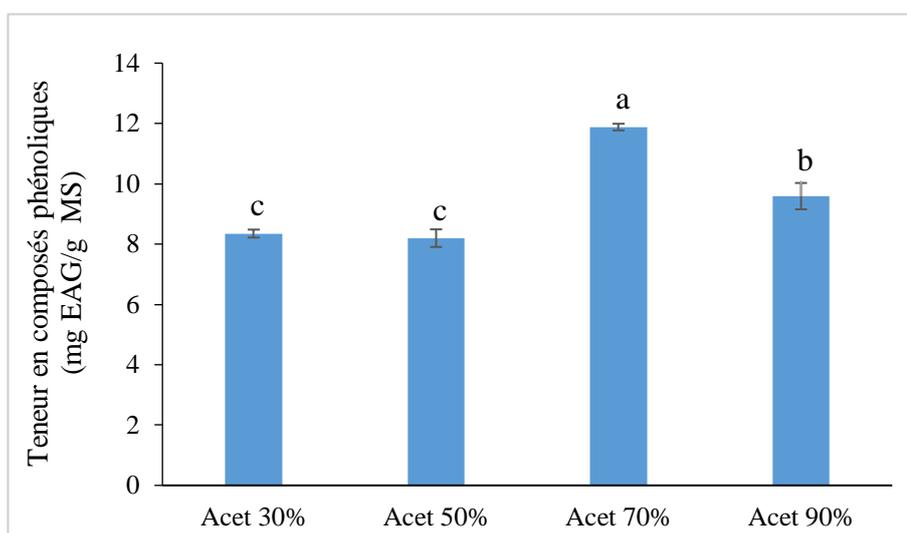


Figure 9 : Effet de la concentration du solvant sur la teneur en composés phénoliques de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

Cette étude a révélé que les meilleures teneurs en composés phénoliques de *Salvia chudaei* ont été obtenues en utilisant l'acétone 70%, avec une valeur de 11,88 mg EAG/g MS, suivi par l'acétone 90%, avec une valeur de 9,59 mg EAG/g MS, tandis que les plus faibles teneurs, ont été obtenues en utilisant l'acétone 30% et l'acétone 50%, avec des valeurs de 8,35 et 8,20 mg EAG/g MS, respectivement.

L'utilisation de l'eau en combinaison avec des solvants organiques contribue à la création d'un milieu modérément polaire qui assure l'extraction des composés phénoliques (Lapronik et al., 2005 ; Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005). Les mélanges acétone-eau sont très utilisés pour l'extraction des matrices protéiques, car ils permettent la dissolution des complexes polyphénols-protéines, ainsi ils sont les meilleurs solvants pour l'extraction des antioxydants polaires (Naczka et Shahidi, 2004 ; Al-Farasi et Lee, 2008). L'étude menée par Nasr et al. (2019) a montré que la teneur en composés phénoliques la plus élevée des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* a été obtenue en utilisant l'extrait acétonique à 70%. Ce qui confirme les résultats trouvés.

- **Activité « scavenger » du radical DPPH**

L'étude statistique a montré une différence significative entre les activités anti radicalaires (DPPH) des extraits obtenus selon la concentration du solvant utilisée ($p < 0,05$) (Figure 10).

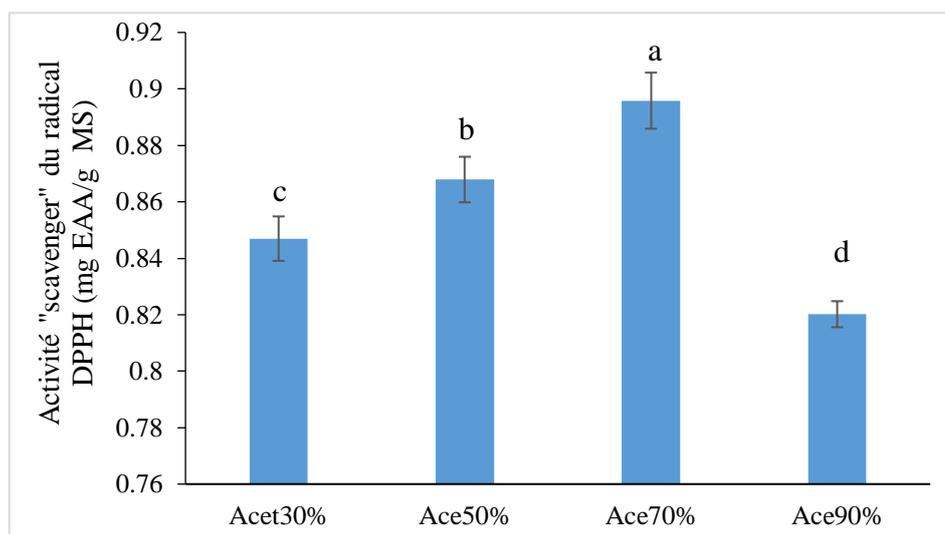


Figure 10 : Effet de la concentration du solvant sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

Dans la présente étude, l'extrait acétonique (70%) de *Salvia chudaei* a exercé le meilleur pouvoir anti-radicalaire (DPPH), avec la valeur 0,90 mg EAA/g MS, suivi par l'extrait acétonique (50%), avec la valeur 0,87 mg EAA/g MS. Tandis que la plus faible activité a été trouvée dans l'extrait acétonique dilués à 90%, avec la valeur 0,82 mg EAA/g MS.

Turkmen et al. (2006) ont montré que la concentration du solvant utilisée a un effet significatif sur l'activité antioxydants d'extraits du thé noir. L'augmentation de la polarité du solvant modifie son habilité d'extraction des composés phénoliques et influence par conséquent l'activité antioxydants des extraits (**Zhou et Yu, 2004**).

II.1.3. Effet de la durée d'extraction

Afin d'évaluer l'impact de la durée d'extraction sur la teneur en polyphénols et l'activité antioxydants de *Salvia chudaei* en utilisant de l'acétone à 70% comme solvant, quatre durées ont été testées : 1 h, 1 h 30, 2 h, 2 h 30.

- **Teneur en composés phénoliques**

L'analyse statistique des teneurs en composé phénolique des extraits de *Salvia chudaei*, a montré des variations significatives en fonction de la durée utilisée ($p < 0,05$) (**Figure 11**).

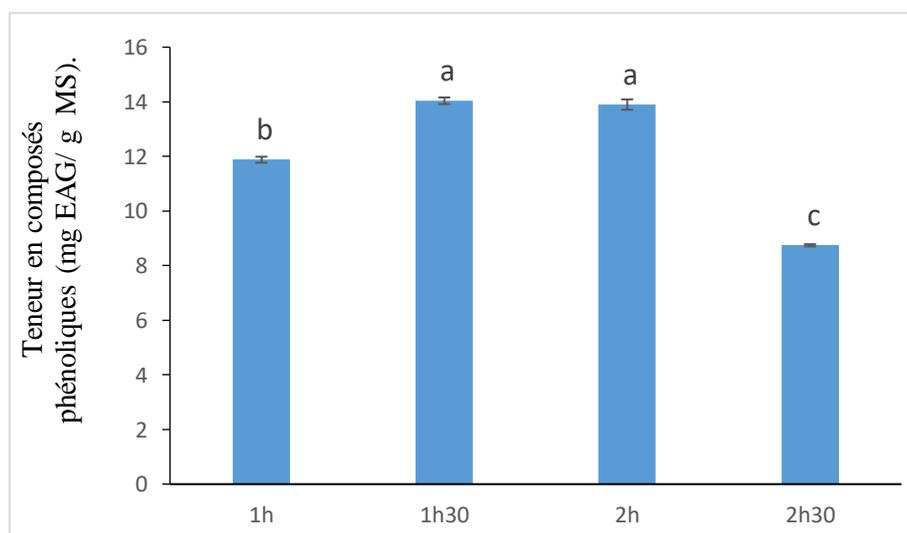


Figure 11 : Effet de la durée d'extraction sur la teneur en composés phénoliques de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

Cette étude a montré que les meilleurs teneurs en composés phénoliques de *Salvia chudaei* ont été trouvées dans l'extrait obtenu après 1 h 30 min et 2 h avec les valeurs 14,03 et 13,89 mg EAG/g MS, respectivement, suivi par l'extrait obtenu après 1 h avec la teneur 11,88 mg EAG/g MS. Tandis que la plus faible teneur a été trouvée dans l'extrait obtenu après 2 h 30 avec une valeur de 8,75 mg EAG/g MS.

Le temps de mise en contact entre le solvant et le matériel végétal peut influencer la libération graduelle des solutés de la matrice végétale vers le solvant, ce qui affecte l'efficacité de l'extraction (Michiels et al., 2012). Cependant, il est important de noter qu'un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga et al., 2012). Ce qui confirme la raison du déclin de la teneur en composés phénoliques après 2 h.

- **Activité « scavenger » du radical DPPH**

L'analyse statistique de l'activité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de *Salvia chudaei* a révélé des différences significatives en fonction de la durée utilisée ($p < 0,05$) (Figure 12). Les plus importantes activités anti-radicalaires (DPPH) ont été exercées par les extraits obtenus après 1 h, 1h30 et 2 h avec des moyennes de 0,90 ; 0,88 et 0,89 mg EAA/g MS, respectivement. Alors que l'extrait obtenu après 2h30 a donné la plus faible activité anti-radicalaire (DPPH) avec une valeur de 0,86 mg EAA/g MS.

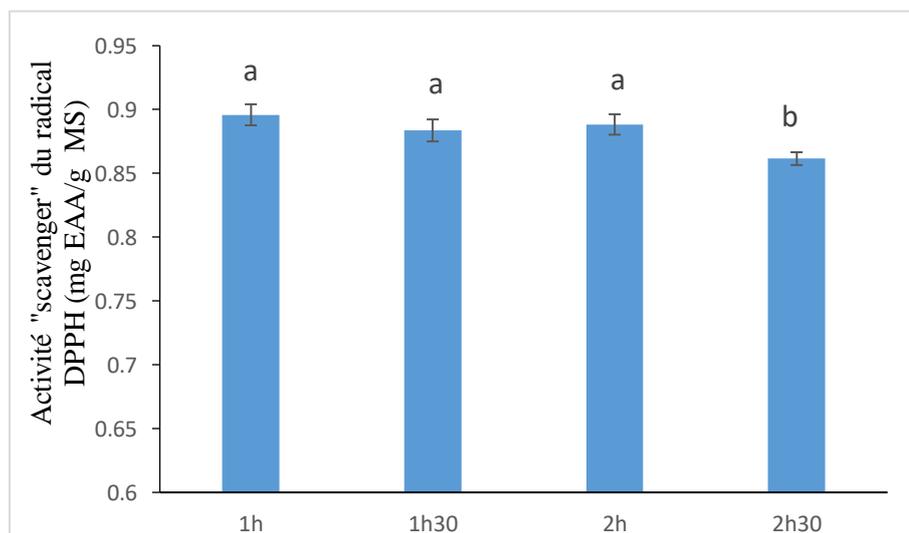


Figure 12 : Effet de la durée d'extraction sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

II.1.4. Effet du rapport solide/liquide

Pour déterminer l'effet du rapport solide/liquide sur la teneur en polyphénols et sur l'activité antioxydants de *Salvia chudaei*, quatre rapports ont été utilisés ; 0,2/20, 0,4/20, 0,6/20 et 0,8/20 (g/mL).

• Teneur en composés phénoliques

L'analyse statistique a révélé que le rapport solide/liquide utilisé pour l'extraction a influencé significativement les teneurs en composés phénoliques des extraits de *Salvia chudaei* ($p < 0,05$) (**Figure 13**). La meilleure teneur en composés phénoliques a été trouvée dans l'extrait préparé par le rapport 0,2/20 (g/mL), avec la valeur 16,86 mg EAG/g MS. Tandis que la plus faible teneur a été obtenue dans l'extrait préparé par le rapport 0,8/20 (g/mL) avec une valeur de 10,74 mg EAG/g Ms.

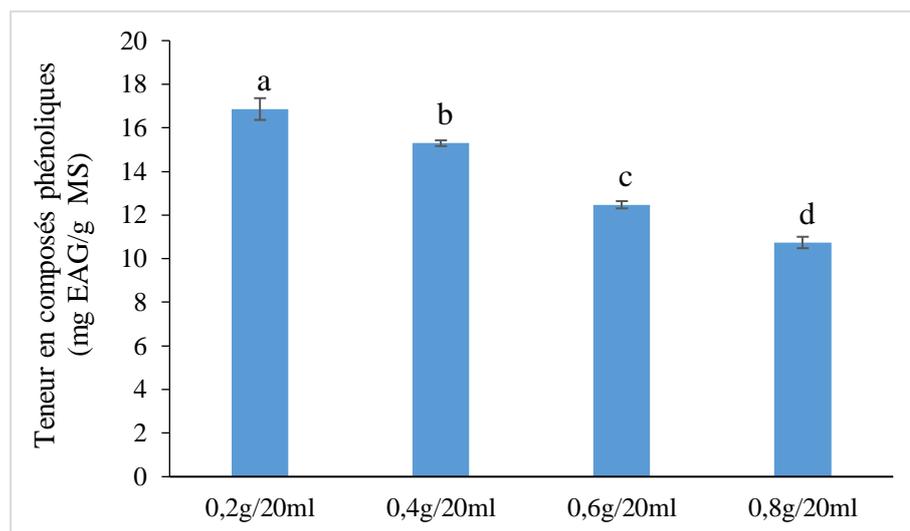


Figure 13 : Effet du rapport solide/liquide sur la teneur en composés phénoliques de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

L'augmentation du rapport solide/liquide a un effet négatif sur l'extraction. En effet, le rapport solide/liquide 0,2/20 (g/mL) est celui qui a permis d'extraire le meilleur taux en composés phénoliques. Au-delà de ce rapport, les taux ont présenté une diminution significative.

Pradal (2016), a rapporté que pour obtenir une extraction efficace, il est nécessaire que le solvant pénètre la matrice solide pour atteindre les solutés. Ainsi, il est essentiel que le

volume du solvant soit adéquat pour faciliter le transfert du soluté vers le solvant. Afin de prévenir le phénomène d'encombrement stérique.

• Activité « scavenger » du radical DPPH

Dans la présente étude, le meilleur pouvoir anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei* a été trouvé dans l'extrait obtenu par le rapport 0,2/20 (g/mL), avec la valeur de 0,88 mg EAG/g MS. Tandis que la plus faible activité a été obtenue par l'extrait obtenu par le rapport 0,8/20 (g/mL) avec une valeur de 0,27 mg EAG/g MS (**Figure 14**).

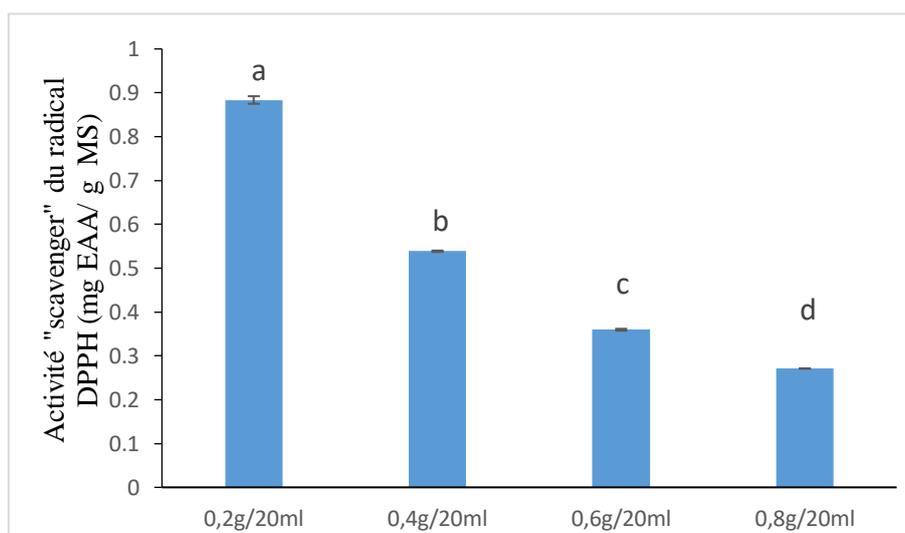


Figure 14 : Effet du rapport solide/liquide sur l'activité « scavenger » du radical DPPH de *Salvia chudaei*.

(Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents).

Selon **Benchikh et Louailèche, (2014)**, la meilleure capacité anti-radicalaire a été obtenue avec le faible rapport solide/liquide. L'étude menée par **Fu et al. (2016)** ont rapporté que la diminution de l'activité anti-radicalaire de DPPH peut s'expliquer par la diminution de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ce qui est en accord avec les résultats de ce travail.

II.2. Application du plan d'expérience

En se basant sur les observations des études préliminaires, les gammes de chaque variable indépendante (concentration du solvant (X1), temps d'extraction (X2), et le rapport solide/liquide (X3)) influençant les réponses étudiées (teneur en polyphénols et le test d'inhibition du DPPH) ont été introduits dans le logiciel JMP10 en utilisant le plan Box-Behnken.

Résultats et discussion

Les résultats de la détermination des teneurs en polyphénols totaux et de l'activité anti-radicalaire (DPPH) obtenus avec les différentes conditions expérimentales, à partir des 15 essais proposés par le plan Box-Behnken, sont illustrés dans le tableau V.

Tableau V : Valeurs expérimentales et prédites des teneurs en composés phénoliques (TCP) et de l'activité DPPH de *Salvia chudaei* obtenues avec le plan Box-Behnken.

	Solvant (%)	Durée (min)	Rapport S/L	Valeurs réelles		Valeurs prédites	
	X1	X2	X3	TCP (mg EAG/g MS)	DPPH (mg EAA/g MS)	TCP (mg EAG/g MS)	DPPH (mg EAA/g MS)
1	70	60	0,4	10,59 ±0,85	0,54±0,0005	10,67	0,53
2	50	120	0,25	5,69±0,44	0,78±0,0049	6,04	0,78
3	90	90	0,4	10,1±2,41	0,54±0,0028	10,37	0,55
4	50	60	0,25	8,241±1,24	0,80±0,0078	8,14	0,80
5	90	60	0,25	13,86±0,12	0,81±0,0007	13,50	0,81
6	70	90	0,25	16,25±0,33	0,86±0,0302	15,98	0,86
7	70	120	0,1	15,14±0,35	2,03±0,0031	15,06	2,04
8	90	120	0,25	10,50±0,78	0,83±0,0016	10,61	0,82
9	90	90	0,1	18,75±0,80	2,05±0,0013	18,73	2,04
10	70	60	0,1	18,62±0,50	2,05±0,0034	19,00	2,05
11	50	90	0,1	12,56±0,15	2,05±0,0042	12,29	2,04
12	70	120	0,4	9,99±0,63	0,53±0,0036	9,61	0,53
13	70	90	0,25	15,77±0,33	0,86±0,0302	15,98	0,86
14	50	90	0,4	6,84±0,29	0,50±0,0025	6,87	0,50
15	70	90	0,25	15,93±0,33	0,85±0,0302	15,98	0,86

Les résultats de la présente étude montrent que les teneurs en composé phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH) ont été affectées par les différents paramètres testés. Les teneurs en composés phénolique trouvées sont de 5,69 à 18,75 mg EAG/g MS. Concernant l'activité anti-radicalaire (DPPH), les valeurs obtenues varient entre 0,50 et 2,05 mg EAA/g MS.

II.2.1. Modèle mathématique

Les modèles mathématiques du plan Box-Behnken appropriés à la teneur en composés phénoliques totaux (CPT) et à l'activité anti-radicalaire (DPPH), relatives aux 15 essais sont représentées respectivement par les équations (I.1) (I.2).

- **Composés phénoliques totaux (CPT)**

$$Y_{CPT} = 15,9841 + 2,4841X_1 - 1,2491X_2 - 3,4453X_3X_1 - 0,2006X_2X_1 - 0,7355X_3X_2 + 0,7203X_3X_1 - 3,9676X_1X_2 - 2,4455X_2X_3 + 0,0462X_3 \dots\dots\dots \text{(Equation I.1)}$$

- **Activité anti-radicalaire (DPPH)**

$$Y_{DPPH} = 0,8566 + 0,0125X_1 - 0,0028X_2 - 0,7583X_3X_1 + 0,0066X_2X_1 + 0,0102X_3X_2 + 0,0030X_3X_1 - 0,0294X_1X_2 - 0,0232X_2X_3 + 0,4560X_3 \dots\dots\dots \text{(Equation I.2)}$$

II.2.2. Effet des facteurs

Les résultats de l'analyse ont montré que les paramètres testés ont présenté différents effets sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH) (**Tableau VI**).

Tableau VI : Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Source	Composés phénoliques		Activité anti-radicalaire (DPPH)	
	Estimation	Prob> F	Estimation	Prob> F
Constante	15,9841	< 0,0001*	0,8566	< 0,0001*
Linéaire				
Solvant % : X1	2,4841	< 0,0001*	0,0125	0,0126*
Durée : X2	-1,2491	0,003*	-0,0028	0,4293
S/L : X3	-3,4453	< 0,0001*	-0,7583	< 0,0001*
Quadratique				
X1* X1	-3,9676	< 0,0001*	-0,0294	0,0017*
X2* X2	-2,4455	< 0,0001*	-0,0232	0,0049*
X3* X3	0,0462	0,8366	0,4560	< 0,0001*
Interaction				
X1* X2	-0,2006	0,3710	0,0066	0,2136
X1* X3	-0,7355	0,0155*	0,0102	0,0795
X2* X3	0,7203	0,0168*	0,0030	0,5463

✓ **Effet linéaire**

- **CPT** : Cette étude a révélé que la concentration du solvant (X1) et le rapport solide/liquide (X3) ont influencé d'une manière hautement significative l'extraction des composés phénoliques de *Salvia chudaei* avec une probabilité $P < 0,0001$. Tandis que la durée d'extraction (X2) a influencé d'une manière très significative avec une probabilité $P = 0,003$.
- **DPPH** : Le paramètre du rapport solide/liquide a une influence hautement significative ($P < 0,0001$) sur l'activité anti-radicalaire (DPPH), alors que le paramètre de la concentration du solvant (X1) a une influence significative ($P = 0,0126$).

✓ **Effet quadratique**

- **CPT** : Les deux effets quadratiques ($X1 * X1$) et ($X2 * X2$) ont des effets hautement significatifs sur l'extraction des composés phénoliques de *Salvia chudaei* avec une valeur de $P < 0,0001$.
- **DPPH** : Les effets quadratiques constatés dans cette étude sont tous significatifs sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei*. Le rapport solide/liquide (X3) a un effet hautement significatif avec une probabilité $P < 0,0001$, tandis que la concentration du solvant (X1) et la durée d'extraction (X2) ont des effets très significatifs avec des probabilités $P = 0,0017$ et $P = 0,0049$, respectivement.

✓ **Effet d'interaction**

- **CPT** : Les deux effets d'interactions ($X1 * X3$) et ($X2 * X3$) ont influencé d'une manière significative sur l'extraction des composés phénoliques avec des probabilités $P = 0,0155$ et $P = 0,0168$, respectivement.
- **DPPH** : Cette étude a révélé que toutes les interactions ($X1 * X3$), ($X2 * X3$) et ($X1 * X2$) ne sont pas significatives sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei*.

✓ **Analyse de la surface de réponse (ASR)**

• **Composés phénoliques totaux**

Pour fournir une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D sur la teneur en CP a été construit (**Figure 15**) à l'aide de l'équation (I.1). Les graphiques ont été générés en traçant la réponse en utilisant l'axe z

contre deux variables indépendantes, tout en gardant l'autre variable indépendante à un niveau fixé.

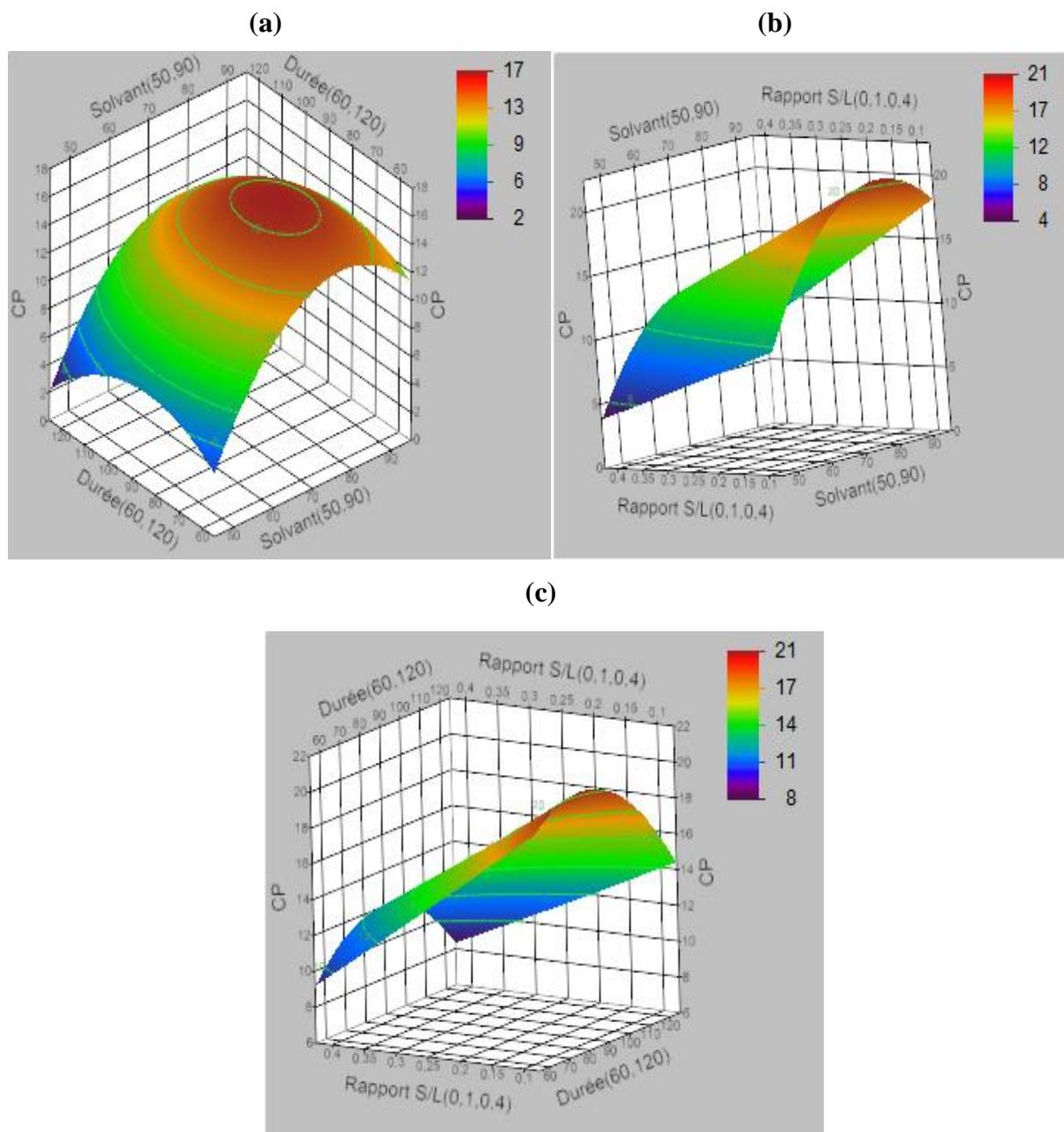


Figure 15 : Surface de réponse pour les différentes interactions sur la teneur en composés phénoliques de *Salvia chudaei*.

(a) : solvant(%)/durée(min); (b) : solvant(%)/rapport S/L(g/mL) ; (c) : durée(min) /rapport S/L(g/mL).

Les résultats de l'interaction de la concentration du solvant avec la durée d'extraction montrent que la teneur en composés phénoliques augmente avec l'augmentation de la durée d'extraction (de 60 à 100 min) et la concentration du solvant (de 50 à 90 %), puis elle diminue

en prolongeant la durée en dessus des 110 min et en augmentant la concentration au-delà du 90 % (**Figure 15(a)**). Cela pourrait être due à la perte des polyphénols par oxydation qui provoque la polymérisation des polyphénols en composés insolubles (**Naczk et al., 2006 ; Chirinos et al., 2007**).

Les résultats de l'interaction rapport solide/liquide avec la concentration du solvant montrent que les teneurs en composés phénoliques de *Salvia chudaei* augmentent avec l'augmentation de la concentration du solvant (jusqu'à 80%) et avec la diminution de rapport S/L jusqu'à atteindre 0,1/20 (g/mL), puis elles diminuent en augmentant la concentration du solvant au-delà du 90 % (**Figure 15(b)**). Selon **Şahin et Şamli, (2013)**, l'eau agit comme agent de gonflement des plantes, tandis que l'acétone perturbe la liaison entre le soluté et la plante matrice, ce qui peut modifier les récupérations en composés phénoliques.

Les données de l'interaction de la durée avec le rapport solide/liquide sur la teneur en composés phénoliques ont révélé que l'augmentation de la durée d'extraction de 60 à 100min avec la diminution du rapport S/L améliorent le rendement d'extraction des composés phénoliques (**Figure 15(c)**).

Ces résultats indiquent que la teneur en composés phénoliques augmente significativement en diminuant le rapport solide/liquide pour toutes les concentrations du solvant et les durées d'extraction testées. Ces résultats pourraient s'expliquer par la forte diffusion du solvant d'extraction entre les particules de la poudre en raison de l'absence de sursaturation de la matière végétale en utilisant des importants volumes. En pénétrant plus profondément dans la matrice solide, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi la libération des composés phénoliques.

La teneur en composés bioactifs augmente avec le volume du solvant d'extraction, car les composés phénoliques sont plus facilement solubles dans les volumes les plus élevés que dans les volumes les plus faibles (**Silva et al., 2007**). Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté entre le solide et le liquide, cette force devient importante lorsque le rapport solide/liquide utilisé est plus faible (**Al-Farsi and Lee, 2008**).

• **Activité anti-radicalaire (DPPH)**

Pour fournir une meilleure compréhension de l'interaction entre les facteurs, le diagramme de surface de réponse 3D sur l'activité anti-radicalaire DPPH a été construit (Figure 16) à l'aide de l'équation (I.2).

Les résultats des différentes interactions exercées sur l'activité anti-radicalaire testée sont tracés et présentées sur la figure 16.

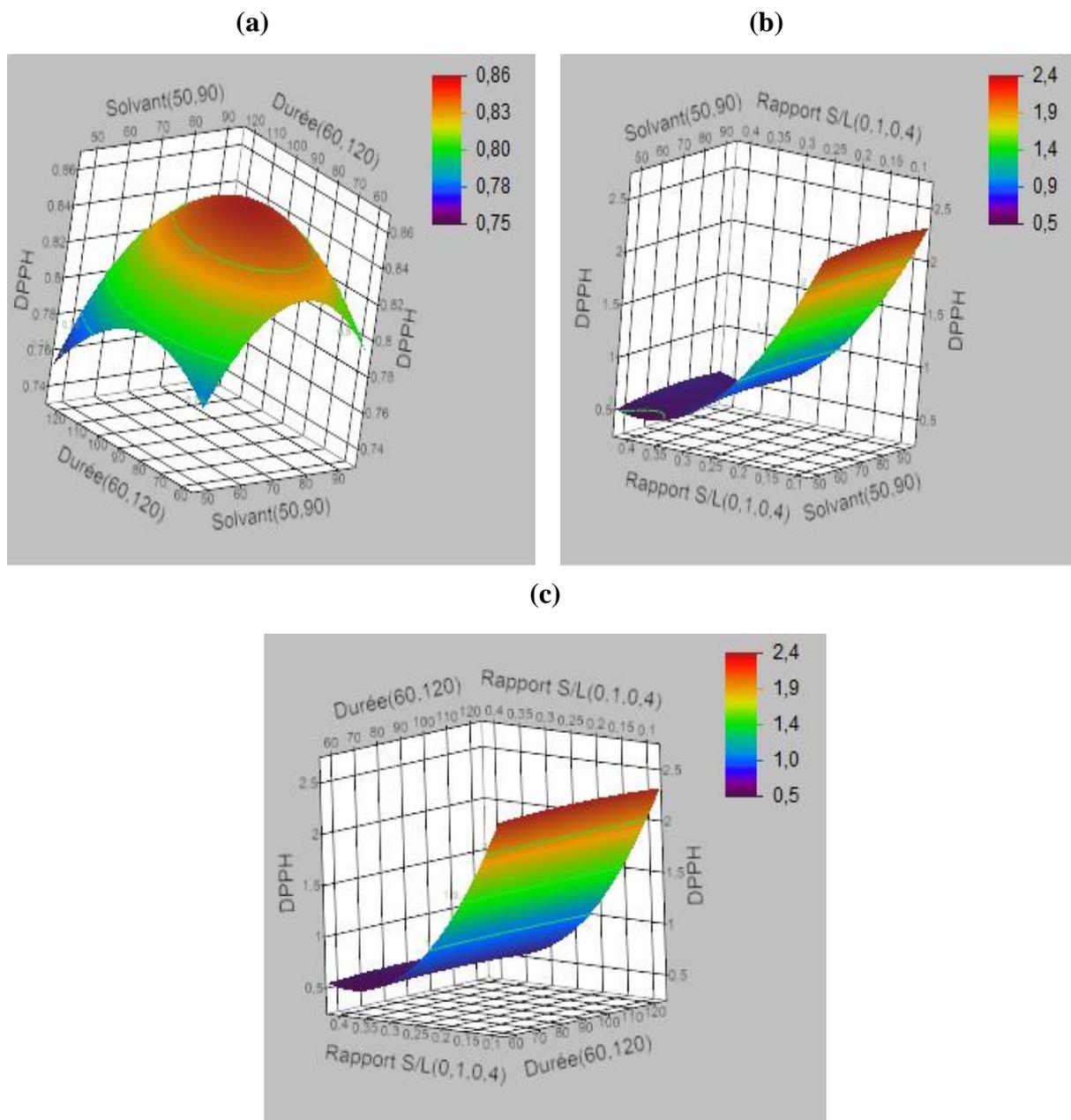


Figure 16 : Surface de réponse pour les différentes interactions sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei*.

(a) : solvant(%)/durée(min); (b) : solvant(%)/rapport S/L(g/mL) ; (c) : durée(min) /rapport S/L(g/mL).

Les résultats illustrés dans la figure 16(a) montrent que l'activité anti-radicalaire (DPPH) augmente en augmentant la concentration du solvant de 50 à 90 % et la durée d'extraction de 60 à 100 min, puis elle diminue en dépassant la concentration du solvant 90 % et en prolongeant la durée en dessus de 110 min.

Les résultats de la figure 16(b) révèlent que l'activité antioxydants augmente en diminuant le rapport S/L avec toutes les concentrations du solvant testées.

Concernant l'interaction entre la durée et le rapport solide/liquide, les résultats de la figure 16(c) montrent que l'activité antioxydants augmente significativement avec la diminution du rapport solide/liquide pour toutes les durées d'extraction étudiées.

Ces données ont montré que les teneurs en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire testée dans ce travail ont été affectées significativement par le rapport solide/liquide d'extraction appliqué. Ces résultats sont en accords avec ceux de **Kankara et al. (2014)** ; **Chaalal et al. (2012)**.

II.2.3. Validation du model

Les résultats de l'effet des facteurs d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH) de *Salvia chudaei* sont représentés par les coefficients de régression dans les tableaux (**X et Y**) respectivement.

- **Composés phénoliques**

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de régression R^2 (**Chan et al., 2009**). Les résultats de l'analyse de la variance pour l'effet des facteurs d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques indiquent que le modèle choisi est hautement significative ($P < 0,0001$), avec un coefficient de régression R^2 de 0,996, une valeur de R^2 ajustée de 0,99 et une probabilité de défaut d'ajustement qui n'est pas significative ($P = 0,2046$). Ces données indiquent que le modèle des composés phénoliques a une forte puissance d'explication des résultats expérimentaux.

Tableau VII : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les teneurs en composés phénoliques.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F	Prob> F
Modèle	9	237,29243	26,3658	158,0362	<0,0001*
Défaut d'ajustement	3	0,71612449	0,238708	4,0443	0,2046
Erreur pure	2	0,11804587	0,059023		
Erreur total	5	0,83417036			
Total corriger	14	238,12660			
R ²		0,996497			
R ² Ajusté		0,990191			
RMSE		0,408453			

- **Activité anti-radicalaire (DPPH)**

Dans la présente étude, la valeur de R² est 0,9999, la valeur de R² ajusté est 0,9997 et une probabilité de défaut d'ajustement qui n'est pas significative (P=0,1927). Cela indique que le modèle choisi pour l'effet des facteurs sur l'activité antioxydants des extraits issus par macération a une forte puissance d'explication des résultats expérimentaux (P<0,0001).

Tableau VIII : Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur l'activité anti-radicalaire (DPPH).

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F	Prob> F
Modèle	9	5,3955005	0,599500	6980,815	<0,0001*
Défaut d'ajustement	3	0,00037229	0,000029	4,3462	0,1927
Erreur pure	2	0,00005711	0,000029		
Erreur total	5	0,00042939			
Total corriger	14	5,3959299			
R ²		0,99992			
R ² Ajusté		0,999777			
RMSE		0,009267			

En résumé, le facteur le plus important dans l'extraction par macération est le rapport solide/liquide avec des effets hautement significatifs sur les deux réponses.

La concentration du solvant a une influence linéaire et quadratique hautement significative sur la teneur en composés phénoliques et significative sur l'activité anti-radicalaire (DPPH). Selon **Rebey et al. (2016)**, la polarité du solvant est un facteur fondamental dans l'extraction des composés phénoliques. Ce qui est en accords avec les résultats trouvés.

La durée d'extraction a un effet quadratique significatif à la fois sur la teneur en composés phénoliques et sur l'activité anti-radicalaire. Cependant, elle a un effet linéaire significatif uniquement sur la teneur en composés phénoliques.

Seules les interactions entre la concentration de solvant et le rapport S/L, ainsi que la durée d'extraction et le rapport S/L qui sont significatives sur la teneur en composés phénoliques.

II.3. Conditions optimales

Les conditions optimales de l'extraction des CPT et de la détermination de l'activité anti-radicalaire DPPH ont été obtenues en utilisant les équations de régression de la méthodologie de surface de réponse. La figure 17 montre le profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par le modèle Box-Behnken.

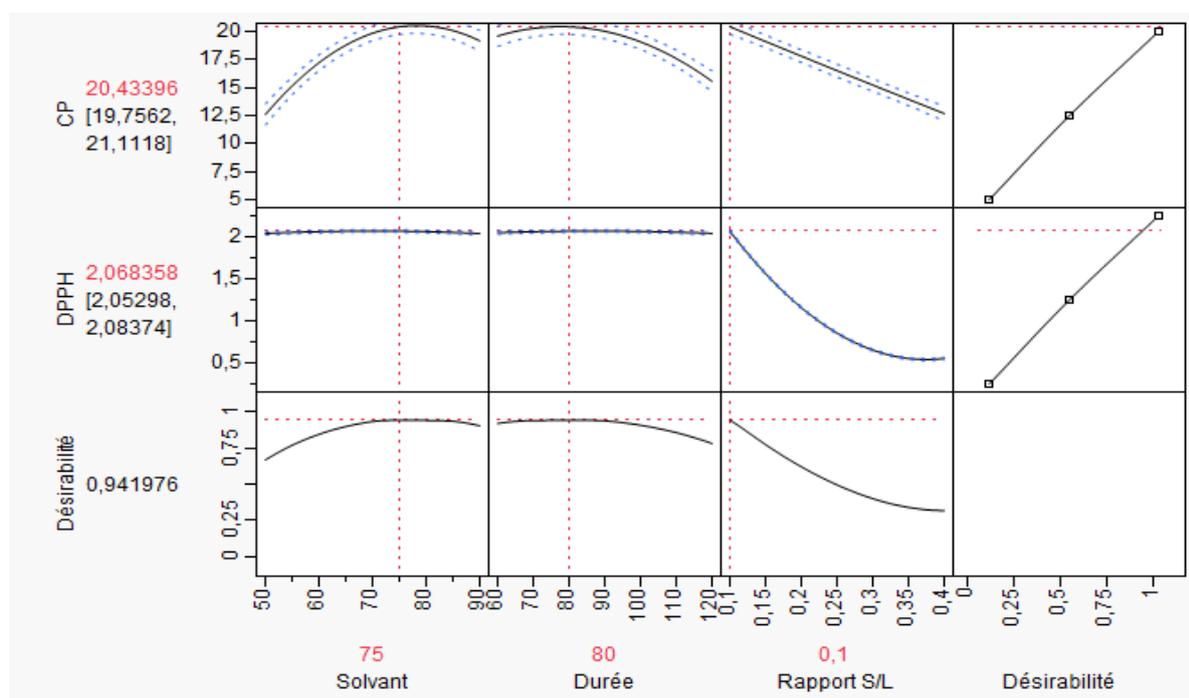


Figure 17 : Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues par la méthode de macération.

Résultats et discussion

Les conditions optimales et les valeurs réelles et prédites sont présentées dans le tableau N° IX.

Tableau IX : Conditions optimales et résultats prédites et expérimentaux des teneurs en CP et de l'activité DPPH obtenus par macération.

Solvant (%) X1	Durée (min) X2	S/L (g/ml) X3	Valeurs réelles TCP (mgEAG /g MS)	Valeurs prédites TCP (mgEAG /g MS)	Valeurs réelles DPPH (mgEAA /g MS)	Valeurs prédites DPPH (mgEAA /g MS)
75	80	0,1/20	19,81±0.303	20,43	2,06±0.005	2,07

La présente étude montre que les valeurs optimales en CP et en activité anti-radicalaire (DPPH) sont obtenues par les conditions suivantes : une concentration du solvant de 75%, une durée d'extraction de 80min et un rapport S/L de 0,1/20 g/mL. En effet, cette étude a montré que les teneurs prédites et celles obtenues par expérimentation ne présentent pas de différence significative en ce qui concerne le teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH). Ce qui confirme la validité du plan d'expérience utilisé.

L'extrait qui a donné la valeur optimale en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire (DPPH) la plus élevée a été utilisé pour déterminer la teneur en flavonoïde (TF), l'activité « scavenger » du radical ABTS, le pouvoir réducteur du fer et le pouvoir chélateur du fer. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau N° X.

Tableau X : Récapitulative des teneurs en composés phénoliques (CP) et en flavonoïde (TF) et des activités antioxydants de l'extrait obtenu avec les conditions optimales.

CP mg EAG/g	TF mg EQ/g	PR mg EAA/g	PC Ferrozine		DPPH		ABTS	
			%	IC 50 (mg/mL)	%	IC 50 (mg/mL)	%	IC 50 (mg/mL)
19,81±0.30	0,45±0,01	20,86±0,69	34,54±0,05	6,80	90,60±0,21	1,68	43,45±0.26	11,07

Résultats et discussion

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait obtenu avec les conditions optimales a une teneur en composés phénoliques de 19,81 mg EAG/g en flavonoïdes de 0,45 mg EQ/g. En ce qui concerne le pouvoir réducteur du fer, cet extrait a une valeur de 20,86 mg EAA/g.

L'analyse des pourcentages des activités antioxydantes exercée par l'extrait étudié, a révélé que la plus importante activité testée est l'activité « scavenger » du radical DPPH avec un pourcentage de 90,60% suivie par celle du radical ABTS avec un pourcentage de 43,45%. Tandis que la plus faible activité est l'activité chélatrice du fer avec un pourcentage de 34,54%.

Les résultats des IC50 indiquent que le plus faible IC50 est celui de l'activité DPPH avec une valeur de 1,68 mg/mL, suivi par celui de l'activité chélatrice du fer avec une valeur de 6,80 mg/mL, alors que le plus élevé IC50 a été trouvé dans l'ABTS avec une valeur de 11,07 mg/mL. Ces résultats indiquent que l'extrait obtenu est plus efficace sur le radical DPPH que sur le radical ABTS et le fer.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été consacrée à la détermination de l'effet de quelques paramètres d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydants du *salvia chudaei*, ainsi que leur optimisation en utilisant le modèle de plan d'expérience Box-Behnken.

Le plan Box-Behnken a été mis en place pour étudier l'effet de trois variables indépendantes, à savoir : la concentration du solvant (%), le temps (min) et le rapport solide/liquide (g/mL), sur l'extraction des composés phénoliques totaux. Une étude préliminaire a été réalisée afin de définir les niveaux hauts et bas pour chaque facteur.

Les résultats de l'étude préliminaire révèlent que l'acétone 70 %, la durée 90 min, le rapport 0,2/20 (g/mL), sont les meilleurs paramètres pour l'extraction des composés phénoliques totaux de *Salvia chudaei*.

L'utilisation du plan Box-Behnken a permis d'identifier les meilleures conditions d'extraction, qui sont ; une durée de 80 min, une concentration du solvant de 75% et un rapport S/L de 0,1/20 g/mL.

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait obtenu avec les conditions optimales a une teneur en composés phénoliques de 19,81 mg EAG/g et en flavonoïdes de 0,45 mg EQ/g.

L'analyse des activités antioxydants exercées par l'extrait étudié, a révélé que la plus importante activité testée est l'activité « scavenger » du radical DPPH suivie par celle du radical ABTS. Tandis que la plus faible activité est l'activité chélatrice du fer.

Les résultats des IC50 indiquent que le plus faible IC50 est celui de l'activité DPPH, alors que le plus élevé IC50 est celui de l'ABTS suivi par celui de l'activité chélatrice du fer. Ces résultats indiquent que l'extrait obtenu est plus efficace sur le radical DPPH que sur le radical ABTS et le fer.

L'ensemble de ces résultats indique que l'extrait de *Salvia chudaei* obtenu avec les conditions optimales a la capacité d'exercer une activité anti-radicalaire vis à vis du DPPH et l'ABTS, une activité réductrice du fer et une activité chélatrice du fer. Ceci indique que l'extrait étudié a exercé une importante activité antioxydants via plusieurs mécanismes.

Dans le but d'élargir cette recherche et d'approfondir les travaux déjà entrepris, plusieurs travaux peuvent être explorés :

Conclusion

- Etudier d'autres techniques d'extractions telles que l'extraction par micro-ondes.
- Optimiser d'autres paramètres qui affectent le taux d'extraction des composés phénoliques, tels que ; la température, le pH, la granulométrie de la poudre...etc.
- Utiliser d'autres plans de la surface de réponse (Plans composites, Doehlert...).
- Caractériser des différents composés phénoliques de la plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdulhamid A, Giweli1 AM, Džamić MS, Ristić MS, Janačković P, Marin PD. The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences* 2013; 65 (1):321-329.

Al-Farsi MA, Lee CY. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 2008; 108 (3):977-985.

Alice T, Mariella L, Rita M, Haana M, Tania S, Paolo V, Anna M, Alberto P. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Industrial Crops and Products* 2016; 83:241-254.

Annadurai G, Sheeja RY. Use of Box-Behnken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer. *Bioprocess engineering* 1998; 18: 463-466.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robard K. Methods for testing antioxidant activity . *Analyste* 2002 ; 127 (1) : 183-198.

B

Ba K, Tine E, Destain J, Cissé N, Thonart P. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de variétés différentes de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 2010 ; 14 (1):131-139.

Bahadori MB, Mirzaei M. Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. Ex Benth. *Research Journal of Pharmacognosy* 2015 ; 2: 27-32.

Battandier MM, & Trabut. Plantes du Tassili des Azdjer. *Bulletin de la Société Botanique de France* 1913 ; 60:3, 244-248.

Benchelah AC, Bouziane H, Maka M, Ouahès C. *Fleurs du Sahara, voyage Ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili.* Paris : éditions Ibis Press, Atlantica, 2000 : 254.

Benchelah AC, Bouzian H, Maka M. *Fleurs du Sahara, Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili.* Paris: Edition Ibis press, 2011: 255.

Benchikh Y, Louailèche H. Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters* 2014; 161: 175-181.

Benoist D, Tourbier Y, Germain-Tourbier S. Plans d'expériences : construction et analyse. Paris : *Technique et Documentation*, 1994 ; 700.

Bijoy M, Jayati S, Prabir KS. Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus fermentation to kinema. *Food Research International* 2008 ; 41(6) : 586-593.

Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'institut national de la recherche agronomique* 2006 ; 79-82.

Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *British Library* 1997 ; 6: 399-402.

Boukhalfa D. Contribution à l'étude des plantes aromatiques et médicinales de la région de l'Ahaggar. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université Benyoucef Benkhedda d'Alger centre. 2017 : 387.

Bouzar R, Nehari W. *Salvia chudaei* Batt. et Trab. du Hoggar : Étude phytochimique préliminaire. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université aboubekr belkaïd. Tlemcen 2019.

Bruneton J. Acides phénols. In : Lavoisier. *Pharmacognosie phytochimie et plantes médicinales*. Paris : Ed : *Technique et Documentation*, 2008:198-260.

Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris : *Technique et Documentation* Lavoisier (4^{ème} Ed), 2009:1243.

C

Carrubba A, La Torre R, Zaffuto G. Exploitation of native labiatae in Sicily. *Acta Horticultura* 2006; 723:111-116.

Chaalal M, Touati N, Louaileche H. Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Botanica Gallica* 2012 ; 159(4) : 467-475.

Chagnon P. Les plans d'expériences. Avis d'expert statistique, 2005, pp 97-100.

Chan, SW, Lee CY, Yap CF, Wan Aida WM, Ho CW. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques des écorces de limau purut (*Citrus hystrix*). *Journal international de recherche sur l'alimentation* 2009 ; 16 (2).

Chira K, Such J, Saucier C, Teissède L. Les polyphénols du raisin. Ed: Springer 2008; 6: 75-82.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 2007 ; 55(2) : 217-225.

Cotelle N, Benier JH, Catteau, JP, Gaydou E, Wallet JC. Activité biologique de 24 flavones : inhibition de la xanthine oxydase et capture de radicaux libres. Edition *Institut national de la recherche agronomique* 1995; 359–396.

Crozier A. *Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview.* In: *Plants: Diet and Health.* Ed. *Goldberg.* 2003: 27- 48.

D

Dellile L. « *Plantes médicinales d'Algérie* », Berti Edition, 2007.

Derbel S, Ghedira K. Phytothérapie et nutrition : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* 2005; 1: 28-34.

Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivate (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives Biochemistry and Biophysics* 1994; 315: 161-169.

Duong T, Phan T, Ha T. Effects of extraction process on phenolic content and antioxidant activity of soybean. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 2015 ; 3(1-2) : 33-38.

F

Farhoosh R, Khodaparast MHH, Sharif A. L'huile de coque de Bene en tant qu'huile végétale très stable et antioxydante. *Journal européen de la science et de la technologie des lipides* 2009 ; 111 (12) : 1259-1265.

Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 2001; 475 (1-2): 89-111.

G

Gillon F. Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur a commutations électroniques. Thèse de doctorat : Génie électrique. Lille : L'université des sciences et technologies de Lille, 1997 ; 42-43 p.

Goupy J. Les plans d'expériences. Tutoriel 2013; (34): 74-116.

Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis*L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology* 2005; 16:351–358.

Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 2002; 40: 471–478.

Gülçin İ, Oktay M, Kirreççi E, Küfr evioglu ÖI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinelle anisum L*). Seed extracts. *Food Chemistry* 2003; 83: 371-382.

H

Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N 'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 105: 358 -367.

Hamzaa N, Berkea B, Chezea C, Aglib AN, Robinsona P, Ginc H, Moorea N. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 128: 513–518.

Han XH, Hong SS, Hwang JS, Lee MK., Hwang BY, Ro JS. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacal Research*. 2007 ; 30: 07-13.

Harborne JB. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. *New series* 1980; 8:329-402.

Heim KE, Tagliafeno AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002 ; 13:572-584.

I

Iserin P. Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF. 2éme Ed. Vol. 14. Paris. 2001 ; 335p.

K

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 1999; 47(10): 3954-3962.

Kahraman A, Celep M, Dogan M. Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). *South African Journal of Botany* 2010; 76:187-195.

Kamatou GPP, Vanzyl I, Vanvuuren SF, Figueirdo-Barroso G, Pedro, Viljoen P. Seasonal Variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* Species. *South African Journal of Botany* 2008; 74: 230-237.

Kankaran SS, Mustafa M, Ibrahim HM, Nulit R, Go R. Effect of Drying Methods, Solid-Solvent Ratio, Extraction Time and Extraction Temperature on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) Leaves Water Extract. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 2014 2(12): 1378-1392.

Khanbabae K, Ree TR. Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry* 2001; Vol. (18): 641-649.

Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2001; 2(3): 171-174.

Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Espagne: Omega (Ed.), 2000:528.

L

Lamaison JLC, Carnet A. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegeusmonogyna*Jacq et de *Crataegeuslaevigata* (Poiret D.C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1990; 65: 315–320.

Lapronik B, Prosek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal Food Engineering* 2005 ; 71: 214-222.

Lebrun JP. *Introduction à la flore d’Afrique*. Ed cirad, ibis press, 2001:155.

Linden G, Lorient D. Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. *Ed: Masson*, 1994: 338-340.

Liyana-Pathirana C M, Shahidi F. Antioxydant propriétés of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006 ; 86: 477-485.

M

Machiex J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. *Les Composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* Presses polytechniques et universitaires Romandes. 2005 :75-85.

Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P. *Les Polyphénols en agroalimentaire.* Paris : Ed *Technique et Documentation*, 2006:1-28.

Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology* 2013; (9): 35.

Makkar HPS. Effects and Fate of Tannins in Ruminant Animals, Adaptation to Tannins, And Strategies to Overcome Detrimental Effects of Feeding Tannin-Rich Feeds. *Small Ruminant Research* 2003; 49: 241-256.

Mangan JL. Nutritional Effects of Tannins in Animal Feeds. *Nutrition Research Reviews* 1988; 1: 209-231.

Martin S, Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 2002, 51: 304-315.

Mcsweeney CS, Palmer B, Mcneill DM, Krause DO. Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 2001; Vol. (91): 83-93.

Messaili B. *Botanique, systématique des spermatophytes.* Alger : OPU (Ed), 1995:91.

Mirjalili M, Peyman S, Sonboli A, Vala M. Essential oil of variation *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds* 2006; 42:19-23.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004; 26 (2): 211-219.

Morel S. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers, 2011; 265p.

N

Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 2004; 1054: 95–111.

Naczk M, Shahidi F. Phénoliques dans les céréales, les fruits et les légumes : Occurrence, extraction et analyse. *Journal d'analyse pharmaceutique et biomédicale* 2006 ; 41 (5) : 1523-1542.

Naghbi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed M, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran : from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2005; 2:63-79.

Nasr A, Saleem Khan T, Zhu GP. Phenolic compounds and antioxidants from *Eucalyptus camaldulensis* as affected by some extraction conditions, a preparative optimization for GC-MS analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 2019 ; 49 (5) :464-476.

Nkhili EZ. Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat en Science des aliments. Avignon (2009, January).

O

OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle, 2003 ; 31-35p.

Ozenda P. *Flore du Sahara*. Paris : 2ème ED CNRS, 1977:622.

Ozenda P. « les relations biogéographiques des montagnes Sahariennes avec la région Méditerranéenne ». *Revue de la Géographie Alpine* 1991 ; 43-45.

P

Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000; 63: 1035–1042.

Pistrick K. Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the families Umbelliferae and Labiatae. *Genetic resources and crop evolution* 2002; 49:211–225.

Pradal D. Eco- procédés d'extraction de polyphénols antioxydants à partir d'un co-produit agro-alimentaire. *Thèse de Doctorat. Villeneuve d'Ascot. Nord. France* 2016.

Q

Quezel R, Santa S. « Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques Méridionales » Tome II, Edition Centre National de la Recherche Scientifique, 1962 ; 1170.

Quezel P, Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Paris : Tome II, Edition Centre National de la Recherche Scientifique, 1963:793.

R

Re R, pellegrini N, proteggrente A, Pannala A, Yang M. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 1999 ; 26:1231-1237.

Rebey IB, Sriti J, Besbess B, Mkaddmini Hammi K, Hamrouni Sellami I, Marzouk B, Ksouri R. Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of New Sciences* 2016 ; 27:1478-1487.

Ribèreau-Gayon P. Notions générales sur les composés phénoliques. In : « Lescomposés phénoliques des végétaux ». Edition Dunod, 1968 :1–27.

Ribèreau-Gayon, P. Notions générales sur les composés phénoliques, méthodes générales d'études des composés phénoliques. In : « Composés phénoliques des végétaux ». Paris : Ed. Dunod, 1982 :173–201.

S

Şahin S, Şamli R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 2013 ; 20:595-602.

Sahki A, Sahki R. *Le Hoggar promenade botanique. Espèces herbacées.* Algérie : Edition Esope, 2004 : 311.

Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, Gonzalez-Par amas AM. Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation* 2012: 427-464.

Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 2007; 55(3): 381-387.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Revue européenne de pharmacologie* 2004 ; 500 (1-3) : 299-313.

T

Tehami W. *Caractérisation phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de Salvia argentea* (Doctoral dissertation), 2017.

Tsimogiannis DI, Oreopoulou V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'- hydroxyl substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2006; 7: 140– 146.

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 2006 ; 99: 835-841.

W

Wichtl M, Anton R. *Plantes thérapeutiques–Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* 2ème édition, Ed. *Technique et Documentation*, 2003:689.

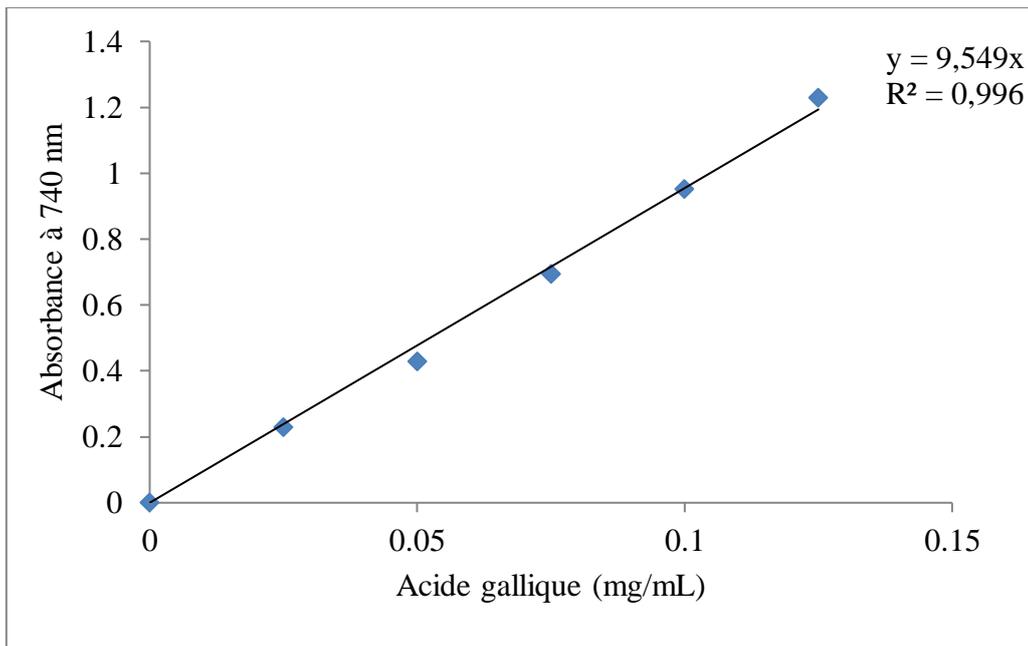
Y

Yildirim A, Oktay M, Bilaloglu V. The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2001; 31: 23-27.

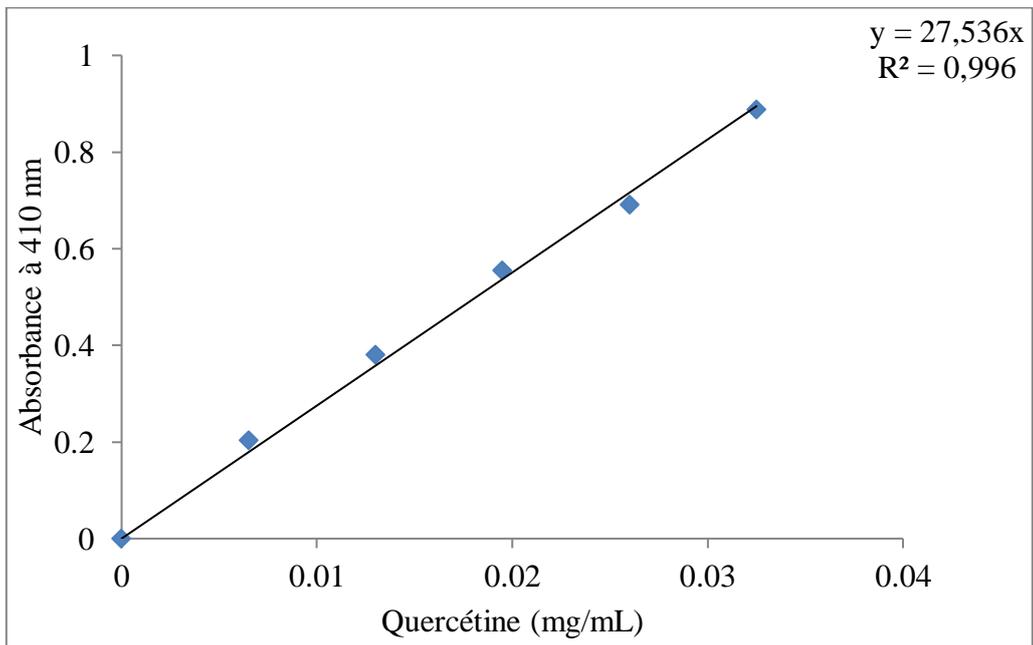
Z

Zhao S, Zhao X, Su H, Liu X, Suo X. Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 2010; 37(12): 35-38.

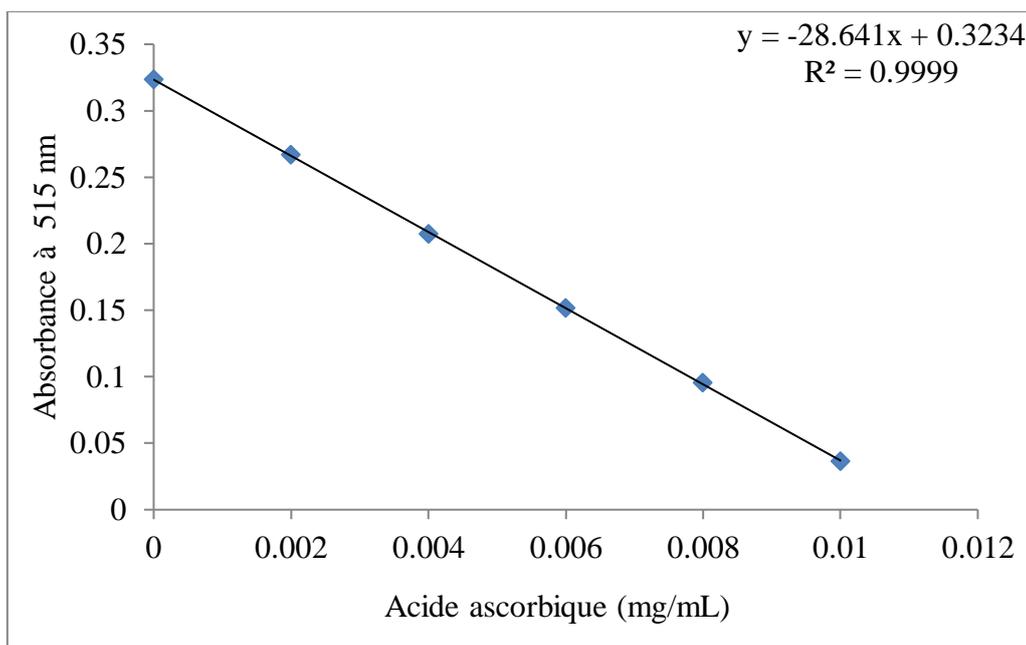
Zhou K, Yu L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology* 2004; 37: 717-721.



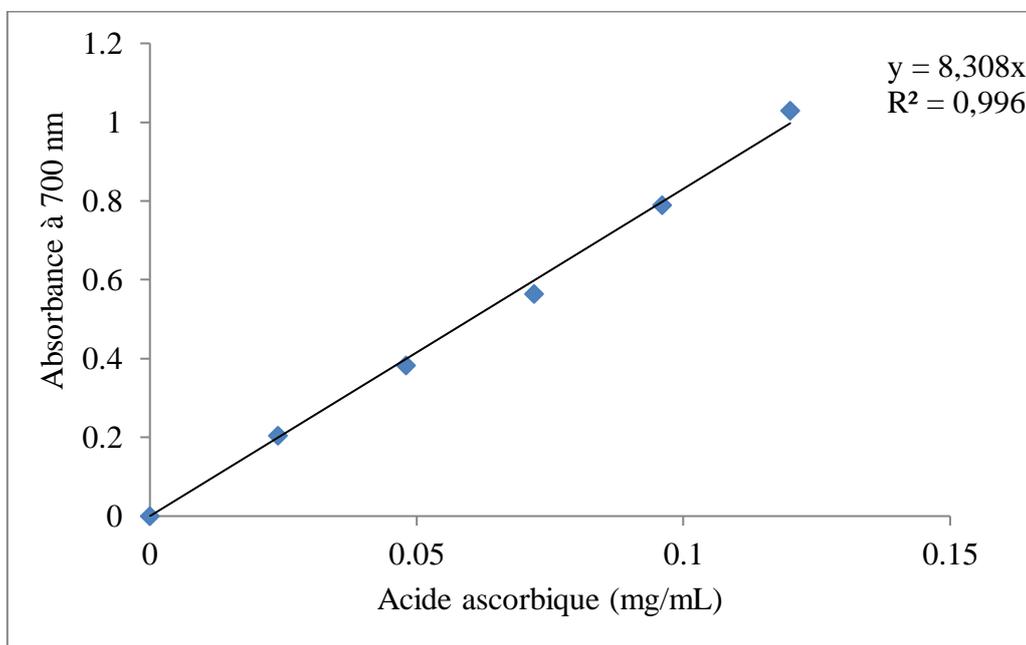
Annexe 1 : Droite d'étalonnage des composés phénoliques.



Annexe 2 : Droite d'étalonnage des flavonoïdes.



Annexe 3 : Droite d'étalonnage de l'activité « scavenger » du radical DPPH.



Annexe 4 : Droite d'étalonnage du pouvoir réducteur.

Résumé

Cette étude a été consacrée à l'optimisation de quelques paramètres d'extraction des composés phénoliques de *salvia chudaei*, en utilisant le modèle de plan d'expérience Box-Behnken. Les résultats de l'étude préliminaire révèlent que l'acétone 70 %, la durée 90 min et le rapport 0,2/20 (g/mL), sont les meilleurs paramètres pour l'extraction des composés phénoliques totaux de *Salvia chudaei*. L'application du plan d'expérience Box-Behnken a permis d'obtenir les conditions optimales suivantes : l'acétone (75%), la durée 80min et le rapport solide/liquide 0,1/20 (g/mL). Ces conditions ont conduit à un rendement plus élevé en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ces résultats révèlent que l'extrait obtenu avec les conditions optimales a la capacité d'exercer une activité anti-radicalaire vis à vis du DPPH et l'ABTS, une activité réductrice du fer et une activité chélatrice du fer. Ceci indique que l'extrait étudié a exercé une importante activité antioxydants via plusieurs mécanismes.

Mots clé

Salvia chudaei, macération, Box-Behnken, composé phénolique, activité antioxydant.

Abstract

This study was devoted to the optimization of some parameters for the extraction of phenolic compounds from *salvia chudaei*, using the Box-Behnken experimental design model. The results of the preliminary study reveal that acetone 70%, duration 90 min and ratio 0.2/20 (g/mL), are the best parameters for the extraction of total phenolic compounds from *Salvia chudaei*. The application of the Box-Behnken experimental plan made it possible to obtain the following optimal conditions: acetone (75%), duration 80min and solid/liquid ratio 0.1/20 (g/mL). These conditions led to a higher yield of phenolic compounds and flavonoids. These results reveal that the extract obtained with the optimal conditions has the capacity to exert an anti-radical activity with respect to DPPH and ABTS, an iron-reducing activity and an iron-chelating activity. This indicates that the studied extract exerted significant antioxidant activity via several mechanisms.

Keywords

Salvia chudaei, maceration, box-behken, phenolic compound, antioxidant activity.

ملخص

خصصت هذه الدراسة لتحسين بعض معاملات استخلاص المركبات الفينولية من سالفيا شوداي باستخدام اليوكسيفينكن لنموذج التجربة. أظهرت نتائج الدراسة الأولية أن الأستون 70%, ومدته 90 دقيقة و نسبة 20/0,2 (جم/مل), هي أفضل المعايير لاستخلاص المركبات الفينولية الكلية من سالفيا شوداي , أتاح تطبيق خطة اليوكسيفينكن التجريبية الحصول على الظروف المثلى التالية: الاسيتون (75%), المدة 80 دقيقة ونسبة الصلبة/السائلة 0,1/20 (جم/مل). أدت هذه الظروف إلى ارتفاع محصول المركبات الفينولية والفلافونويد. تكشف هذه النتائج أن المستخلص الذي تم الحصول عليه مع الظروف المثلى لديه القدرة على ممارسة نشاط مضاد للجذور فيما يتعلق ب : DPPH و ABTS.

وهو نشاط يخفض الحديد ونشاط مخلب للحديد. وهذا يدل على أن المستخلص المدروس قد مارس نشاطاً مضاداً للأكسدة من خلال عدة آليات.

الكلمات المفتاحية

سالفيا شوداي، النقع، اليوكسيفينكن، المركب الفينولي، النشاط المضاد للأكسدة.