

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued



FACULTE DE LATECHNOLOGIE

DÉPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES ET PETROCHIMIE

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat LMD

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Procédés et énergie

THEME

***Optimisation des conditions ultrasoniques
d'extraction des composés phénoliques de Moringa
Oleifera et leur activité antioxydante***

Présenté par :

BENARIMA Abdelhakim

Soutenu publiquement Le : 06/21/2021

Devant le jury composé de :

KHELEF Abdelhamid	Pr	Université d'El oued	Président
HADEF Derradji	MCA	Université d'Ouargla	Examineur
BELFAR Mohamed Lakhdar	MCA	Université d'Ouargla	Examineur
OUCIF KHALED Mohammed Tayeb	MCA	Université d'El oued	Examineur
LAOUINI Salah Eddine	MCA	Université d'El oued	Encadreur
OUAHRANI Mohammed Ridha	Pr	Université d'El oued	Invité

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

*Pour leur patience et leur réconfort dans
les moments de doutes et de découragement.*

A mes frères et mes sœurs.

A tous les membres de ma famille.

A tous mes professeurs.

A tous mes amies.

A tous mes collègues.

A tous ceux qui me sont chers.

Avec toute mon affection et mon amour.

Je leur dédie ce modeste travail

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoires du département de Génies des Procédés à l'université Echahid Hamma Lakhdar el oued, dirigé par Monsieur **LAOUINI Salah Eddine** Maître de conférences (A) au département de génie des procédés. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre conseils et pour la confiance que vous m'avaient témoigné tout au long de cette étude.*

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.

*Monsieur **KHELEF Abdelhamid**, Professeur à l'université Echahid Hamma Lakhdar el oued, nous fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueuse gratitude.*

*Monsieur **OUCIF KHALED Mohammed Tayeb**. Maître de conférences (A) à l'université Echahid Hamma Lakhdar el Oued, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à Monsieur **BELFAR Mohamed Lakhdar**, Maître de conférences (A) à l'université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.*

*Monsieur **HADEF Derradji**. Maître de conférences (A) à l'université Kasdi Merbah Ouargla, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur **OUAHRANI Mohammed Ridha**. Professeur à l'université Echahid Hamma Lakhdar el Oued, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'accepter l'invitation et participer au jury.*

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce thèse.

Merci à tous et à toute

ABSTRACT

ملخص

RÉSUMÉ

Abstract

Moringa Oleifera, or in other words the tree of life is considered one of the most useful plants in the world because it's rich in bioactive substances, also can be used in many fields: foods, pharmaceutical and cosmetics purposes. The present study consists of determining the optimal extraction conditions to maximize the yield of the phenolic compounds (TPC and FVT) and evaluate the antioxidant activity (FRAP and DPPH) from *Moringa Oleifera* leaves, by applied the response surface methodology (RSM) based on a Box–Behnken design (BBD) and the use of ultrasonic-assisted extraction (UAE) as a new technique. The experimental values were agreed with these predicted values, thus indicating the suitability of the response surface methodology to optimize the extraction parameters. The mathematical models were obtained and exhibit good compatibility. The parameters studied: extraction time (X_1), extraction temperature (X_2) and solvent/solid ratio (X_3) presented independent and interactive effects on the yields of phenolic compounds and their antioxidant activity.

Keywords:

Moringa Oleifera; Extraction; Optimization; Phenolic compounds; Antioxidant activity; UAE; RSM; BBD.

ملخص

مورينجا أوليفيرا، أو بعبارة أخرى شجرة الحياة، تعتبر من أكثر النباتات فائدة في العالم لأنها غنية بالمواد النشطة بيولوجيا، كما يمكن استخدامها في العديد من المجالات: أغذية، أدوية، مستحضرات تجميل. تتكون الدراسة الحالية من تحديد شروط الاستخلاص المثلى لتحسين إنتاجية المركبات الفينولية (TPC و FVT) وتقييم نشاط مضادات الأكسدة (FRAP و DPPH) من أوراق المورينجا أوليفيرا، من خلال تطبيق منهجية سطح الاستجابة (RSM) على أساس تصميم (BBD) Box–Behnken واستخدام الاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية (UAE) كتقنية جديدة. توافقت القيم التجريبية مع تلك القيم المتوقعة، مما يشير إلى ملاءمة منهجية سطح الاستجابة لتحسين معاملات الاستخلاص. تم الحصول على نماذج رياضية ذات ملائمة عالية. العوامل المدروسة: زمن الاستخلاص (X_1)، درجة حرارة الاستخلاص (X_2) ونسبة المذيب/المادة الصلبة (X_3) أظهرت تأثيرات مستقلة وتفاعلية على عائد المركبات الفينولية ونشاط مضادات الأكسدة.

الكلمات المفتاحية:

مورينجا أوليفيرا؛ الاستخلاص؛ تحسين؛ المركبات الفينولية؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ RSM؛ UAE؛ BBD.

Résumé

Moringa Oleifera, ou en d'autres termes l'arbre de vie est considéré comme l'une des plantes les plus utiles au monde car il est riche en substances bioactives, peut également être utilisé dans de nombreux domaines: alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La présente étude consiste à déterminer les conditions d'extraction optimales pour maximiser le rendement des composés phénoliques (TPC et FVT) et à évaluer l'activité antioxydante (FRAP et DPPH) à partir des feuilles de *Moringa Oleifera*, en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur un design Box–Behnken (BBD) et en utilisant extraction assistée par ultrasons (EAU) comme nouvelle technique. Les valeurs expérimentales concordaient avec ces valeurs prédites, indiquant ainsi la pertinence de la méthodologie de surface de réponse pour optimiser les paramètres d'extraction. Les modèles mathématiques ont été obtenus présentent une bonne compatibilité. Les paramètres étudiés: temps d'extraction (X_1), température d'extraction (X_2) et rapport solvant/solide (X_3) ont présenté des effets indépendants et interactifs sur les rendements des composés phénoliques et leur activité antioxydant.

Mots clés:

Moringa Oleifera; Extraction; Optimisation; Composés phénoliques; Activité antioxydante; EAU; RSM; BBD.

Liste des abréviations

- ANOVA** : Analysis of variance
- APR** : Puissance anti-radicalaire
- BBD** : Box–Behnken design
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluene
- DPPH** : 1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
- EAG** : Équivalent acide gallique
- EAU** : Extraction assistée par ultrasons
- EFeSO₄** : Équivalent sulfate de fer
- ER** : Équivalent rutine
- FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FRAP** : Ferrique Réductrice Antioxydante Puissance
- FVT** : Flavonoïdes totaux
- IC** : Concentration inhibitrice
- MS** : Masse sèche
- OH** : Groupe hydroxyle
- PPT** : Polyphénols totaux
- R²** : Coefficient de corrélation
- RSM** : Response surface methodology
- TPTZ** : 2, 4,6-tris (2-pyridyl)-1, 3,5-s-triazine
- UV** : Ultra-violet
- Valeur-p** : Valeur de probabilité
- Valeur-f** : Test de Fisher

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure I. 1: Distribution géographique de Moringa Oleifera dans le monde.	6
Figure I. 2: L'arbre de Moringa Oleifera.	7
Figure I. 3: Les graines de Moringa Oleifera	7
Figure I. 4: Les fleurs de Moringa Oleifera.	8
Figure I. 5: Les gousses de Moringa Oleifera	8
Figure I. 6: Les branches de Moringa Oleifera.	9
Figure I. 7: Les racines de Moringa Oleifera.	9
Figure I. 8: Les feuilles de Moringa Oleifera.	10
Figure I. 9: Teneurs des feuilles de Moringa Oleifera en vitamines et minéraux	11

CHAPITRE II

Figure II. 1 : Structure de base des flavonoïdes.	20
Figure II. 2: Exemple des tanins hydrolysables (penta-O-galloylglucose)	26
Figure II. 3: Exemple des tanins condensés (Proanthocyanidines type B).	26
Figure II. 4 : Structure chimique de l'ion phénol.	27

CHAPITRE III

Figure III. 1: Carte géographique montrant la zone de collecte.	33
Figure III. 2: L'arbre et les feuilles utilisés dans ce travail.	354
Figure III. 3: Diagramme général de la procédure expérimentale.	35
Figure III. 4: image graphique du design Box-Behnken	37
Figure III. 5: générations des bulles de cavitation par l'action des ultrasons.	39
Figure III. 6 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.	42
Figure III. 7: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.	43
Figure III. 8: Mécanisme d'action de DPPH.	44
Figure III. 9: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un anti-oxydant (AH).	45
Figure III. 10: Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur de fer.	46

CHAPITRE IV

Figure IV. 1: Taux d'humidité de la matière végétale.	48
Figure IV. 1: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le rendement d'extrait brut.	49
Figure IV. 3: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le rendement d'extrait brut.	49

Figure IV. 4: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le rendement d'extrait brut.	50
Figure IV. 5: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur les polyphénols totaux.	53
Figure IV. 6: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur les polyphénols totaux.	54
Figure IV. 7: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur les polyphénols totaux.....	54
Figure IV. 8: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur les flavonoïdes totaux.	57
Figure IV. 9 : Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur les flavonoïdes totaux.	58
Figure IV. 10: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur les flavonoïdes totaux.....	58
Figure IV. 11: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le piégeage du radical DPPH.	62
Figure IV. 12: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le piégeage du radical DPPH.	62
Figure IV. 13: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le piégeage du radical DPPH.	63
Figure IV. 14: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le FRAP.	66
Figure IV. 15: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le FRAP.....	67
Figure IV. 16: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le FRAP.	67

Liste des tableaux

CHAPITRE I

Tableau I. 1: Quelques noms vernaculaires du Moringa Oleifera Lam.....	5
Tableau I. 2: La classification systématique de Moringa Oleifera.	5
Tableau I. 3 : Compositions chimiques des feuilles de Moringa Oleifera.	12
Tableau I. 4: Teneur en acides aminés des feuilles de Moringa Oleifera.....	13

CHAPITRE II

Tableau II. 1: Les principales classes des composés phénoliques.....	18
Tableau II. 2: Principaux acides hydroxybenzoïques.....	19
Tableau II. 3: Principaux acides hydroxy cinnamiques.....	19
Tableau II. 4: Structures chimiques des flavones avec quelques exemples	21
Tableau II. 5: Structures chimiques des flavonols avec quelques exemples	21
Tableau II. 6: Structures chimiques des flavanones avec quelques exemples.....	22
Tableau II. 7: Structures chimiques des dihydro-flavonoïdes avec quelques exemples.	22
Tableau II. 8: Structures chimiques des isoflavones avec quelques exemples.....	23
Tableau II. 9: Structures chimiques des flavanols avec quelques exemples	23
Tableau II. 10: Structures chimiques des anthocyanidines avec quelques exemples.....	24
Tableau II. 11: Structures chimiques des chalcones avec quelques exemples	24
Tableau II. 12: Structures chimiques des aurones avec quelques exemples	25
Tableau II. 13: Exemples de ROS et RNS	29

CHAPITRE III

Tableau III. 1 : Données sur le site d'échantillonnage de Moringa Oleifera.....	33
Tableau III. 2 : Niveaux de conception expérimentale pour divers paramètres.	38
Tableau III. 3 : La matrice de plan Box – Behnken.	38

CHAPITRE IV

Tableau IV. 1: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les rendements des extraits bruts.....	51
Tableau IV. 2: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale du rendement d'extraction.	52
Tableau IV. 3 : Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour le Polyphénols Totaux.	56
Tableau IV. 4: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale du Polyphénols Totaux.	57

Tableau IV. 5 : Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les flavonoïdes totaux.	60
Tableau IV. 6 : Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale du Flavonoïdes Totaux.	61
Tableau IV. 7: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour DPPH	64
Tableau IV. 8: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de DPPH.	65
Tableau IV. 9 : Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour FRAP	69
Tableau IV. 10: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de FRAP.	70

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
Abstract	III
ملخص	V
Résumé	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	X
Introduction générale	1
Chapitre I : Généralités sur la plante	
I.1. Moringa Oleifera	5
I.3. Classification classique	5
I.4. Historique.....	6
I.5. Distribution géographique.....	6
I.6. Description botanique des différentes parties de la plante Moringa Oleifera	6
I.6.1. Les graines	7
I.6.2. Les fleurs.....	8
I.6.3. Les gousses	8
I.6.4. Les branches	9
I.6.5. Les racines	9
I.6.6. Les feuilles.....	10
I.7. Principales exigences écologiques de Moringa Oleifera.....	10
I.7.1. Altitude	10
I.7.2. Température.....	10
I.7.3. Sols.....	10
I.7.4. PH.....	11
I.7.5. Vent.....	11
I.8. Valeurs nutritionnelles de Moringa Oleifera	11
I.9. Composition chimique.....	12
I.10. Domaines d'utilisation de Moringa Oleifera	13
I.10.1. Consommation humaine.....	14
I.10.2. Consommation animale.....	14

I.10.3. Pharmaceutique	14
I.10.4. Traitement de l'eau	14
I.10.5. Utilisations industrielles	14
I.10.6. Biodiesel	15
I.10.7. Autres utilisations.....	15
I.11. Importance socio-économique	15
Chapitre II : Polyphénols et Activité Antioxydante	
II.1. Définition des composés phénoliques	17
II.2. Classification des composés phénoliques.....	17
II.2.1. Acides phénoliques	19
II.2.1.1. Acides hydroxybenzoïques	19
II.2.1.2. Acides hydroxy cinnamiques.....	19
II.2.2. Flavonoïdes	20
II.2.2.1. Définition.....	20
II.2.2.2. Structure des flavonoïdes.....	20
II.2.2.3. Classification des flavonoïdes	20
II.2.3. Les tannins.....	25
II.2.3.1. Tanins hydrolysables.....	25
II.2.3.2. Les tannins condensés.....	26
II.3. Propriétés chimiques majeures des polyphénols.....	27
II.4. L'activité anti-oxydante des polyphénols.....	27
II.5. L'activité anti-oxydante	28
II.6. Radicaux libres	28
II.6.1. Définition.....	28
II.6.2. Sources des radicaux libres.....	29
II.7. Les anti-oxydants	30
II.7.1. Définition.....	30
II.7.2. Classification	30
II.7.2.1. Anti-oxydants synthétiques.....	30
II.7.2.2. Anti-oxydants naturels	30
II.7.2.3. Anti-oxydants synergistes.....	31
II.7.2.4. Anti-oxydants primaires.....	31
II.7.2.5. Anti-oxydants secondaires.....	31

Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.1. Echantillonnage.....	33
III.2. Méthodologie	34
III.2.1. Test d'humidité	34
III.2.2. Méthode d'optimisation.....	36
III.2.2.1. Plan d'expériences.....	36
III.2.2.2. La méthodologie de surface de réponse (RSM).....	36
III.2.2.3. Conception Box-Behnken	36
III.2.2.4. Modèle mathématique postulé.....	37
III.2.2.5. Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques	37
III.2.3. Méthode d'extraction.....	39
III.2.3.1. Extraction assistée par ultrason (EAU)	39
III.2.3.2.Principe de fonctionnement	39
III.2.3.3. Rendement d'extraction.....	40
III.3. Méthodes d'analyse physico-chimiques	40
III.3.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible)	40
III.3.1.1. Définition	40
III.3.1.2. Principe	40
III.3.1.3. Appareillage.....	40
III.4. Dosages des composés phénoliques	41
III.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	41
III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	42
III.5. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	43
III.5.1. Réactifs chimiques.....	43
III.5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil).....	43
III.5.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	45
Chapitre IV : Résultats et discussions	
IV.1. L'humidité de la matière végétale.....	48
IV.2. Optimisation du rendement des extraits bruts	48
IV.2.1. Analyse de la surface de réponse des extraits bruts	48
IV.2. 2. Montage du modèle du rendement des extraits bruts	51
IV.2. 3. Analyse de la variance du modèle les rendements des extraits bruts	51
IV.2.1.4. Validation du modèle de rendement d'extraits brut.	52
IV.3. Étude de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques	53

IV.3.1. Optimisation d'extraction des polyphénols totaux (PPT).....	53
IV.3.1.1. Analyse de la surface de réponse des polyphénols totaux	53
IV.3.1.2. Montage du modèle des polyphénols totaux	55
IV.3.1.3. Analyse de la variance du modèle des polyphénols totaux.....	55
IV.3.1.4. Validation du modèle des polyphénols totaux.....	56
IV.3.2. Optimisation d'extraction des flavonoïdes totaux (FVT)	57
IV.3.2.1. Analyse de la surface de réponse des flavonoïdes totaux	57
IV.3.2.2. Montage du modèle les flavonoïdes totaux	59
IV.3.2.3. Analyse de la variance des flavonoïdes totaux.....	60
IV.3.2.4. Validation de modèle des flavonoïdes totaux.....	61
IV.4. Étude de l'optimisation de l'activité anti-oxydante.....	61
IV.4.1. Optimisation du piégeage du radical DPPH.	61
IV.4.1.1. Analyse de la surface de réponse du piégeage du radical DPPH.....	61
IV.4.1.3. Montage du modèle de DPPH.....	64
IV.4.1.3. Analyse de la variance du modèle de DPPH	64
IV.4.1.4. Validation de modèle de DPPH	65
IV.4.2. Optimisation le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	66
IV.4.2.1. Analyse de la surface de réponse du pouvoir réducteur de l'ion ferrique	66
IV.4.2.2. Montage du modèle de FRAP	68
IV.4.2.3. Analyse de la variance du modèle de FRAP	68
IV.4.2.4. Validation de modèle de FRAP	69
Conclusion général.....	72
Références bibliographiques.....	75
Annexes.....	86
Communications et Publications.....	89

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes des maladies, ces plantes représentent un réservoir immense des composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques [1].

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde [1]. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle [2].

Moringa Oleifera est une espèce d'arbre tropical très intéressante car la plupart de ses parties telles que les feuilles, les fleurs, les fruits et les gousses immatures peuvent être utilisées comme légume hautement nutritif comme cela est pratiqué dans de nombreux pays [3]. Les feuilles de *Moringa Oleifera* sont très nutritives, étant une source importante des substances biologiquement actives telles que : composés phénoliques, protéines, fer et potassium. Les feuilles peuvent être consommées fraîches, cuites ou conservées sous forme de poudre séchée pendant de nombreux mois sans réfrigération et sans perte de valeur nutritionnelle [4]. Presque toutes les parties de ces plantes ont été utilisées pour divers maux en médecine indigène, compris le traitement de l'inflammation et des maladies infectieuses ainsi que des troubles cardiovasculaires, gastro-intestinaux, hématologiques et hépatorénaux [5].

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont l'un des plus important groupe de composés présents dans les plantes, où sont largement distribués, comprenant au moins 8000 différentes structures connues [6]. Les polyphénols sont également des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ces composés sont signalés présentent une activité antioxydante remarquable et jouent un rôle d'inhibiteur efficaces des radicaux libres comme hydroxyle, oxyde de nitrique, peroxyde de nitrogène et activité antimicrobienne.

Les polyphénols possèdent une potentielle dans la prévention des maladies chroniques, cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète sucré, les maladies neuro-dégénératives, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, anti-athérogènes et anti-thrombotique [7]. Leurs activités protectrices ont été attribué initialement à leurs propriétés antioxydantes, anti-radicaux libres et les propriétés de chélateur de métaux, puis à la capacité d'inhibiteur ou de réduire différentes enzymes [8].

Concernant l'extraction des composés phénoliques, des méthodes nombreux ont été utilisées, telles que l'expulsion à chaud, la pression à froid, l'extraction assistée par micro-ondes (EAM), l'extraction par fluide supercritique (EFS) et le Soxhlet [9]. Comme ces techniques prennent du temps et nécessitent des grands volumes des solvants organiques coûteux, des facteurs tels que l'efficacité, le coût, la simplicité et le gaspillage ont une influence considérable sur la méthode d'extraction choisie [10]. L'extraction assistée par ultrason (EAU) est une méthode moderne utilisée pour extraire des composés des plantes tout en préservant leurs propriétés structurales et moléculaires [11]. Les réduisent également la consommation des solvants et d'énergie, économisent du temps et simplifient la manipulation. Cette méthode peuvent être qualifiés des respectueux de l'environnement ou de technique verte [12], et favorise le transfert de masse et éventuellement, la rupture des parois cellulaires par cavitation acoustique, améliorant ainsi l'efficacité et optimisant le rendement d'extraction [13].

Les méthodes d'optimisation traditionnelles modifient une variable à la fois. Cependant, les inconvénients de cette approche comprennent le temps et la consommation des réactifs ainsi que l'ignorance des effets synergiques potentiels [14]. Afin de surmonter ces problèmes, l'optimisation peut être effectuée à l'aide des techniques statistiques multi-variées telles que la méthodologie de surface de réponse (RSM), qui est un ensemble des techniques mathématiques et statistiques basées sur l'ajustement d'une équation polynomiale aux données expérimentales et permet l'évaluation des plusieurs paramètres et leurs interactions, la caractéristique la plus avantageuse du RSM est qu'il réduit le nombre des cycles expérimentaux, économise de l'énergie, du temps et des matières premières ainsi que la prise en compte de l'interaction des différents facteurs [15].

L'objectif de ce travail de thèse consiste à déterminer les conditions optimales d'extraction pour maximiser le rendement en polyphénols et la capacité anti-oxydante des feuilles de *Moringa Oleifera*, en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RSM)

basée sur le design Box-Behnken (BBD) et en utilisant l'extraction assistée par ultrasons comme nouvelle technique.

Notre travail est réparti comme suit:

Une introduction générale précédée les quatre chapitres constituant ce manuscrit.

Le premier chapitre présente un rappel des principales données bibliographiques, présentation botanique de *Moringa Oleifera* et de sa place dans les classifications phylogéniques.

Le deuxième chapitre présente une synthèse bibliographique sur les polyphénols qui permettra de décrire les métabolites secondaires principaux et leur activité antioxydante.

Le troisième chapitre est consacré aux expériences effectuées, leurs modes opératoires ainsi qu'aux matériels utilisés dans chaque expérience.

Les résultats de nos expériences sont présentés sous forme de tableaux et de graphiques dans le dernier chapitre m suivis de discussions et d'interprétations, puis d'une conclusion générale.

Enfin, la présente thèse est achevée par une liste des références bibliographiques, des annexes, communication et publication.

GÉNÉRALITÉS *SUR* *LA PLANTE*



Chapitre I : Généralités sur la plante

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine, etc....) peut être employée dans le but de se soigner. Elles sont utilisées depuis au moins 7000 ans avant notre ère par les hommes et sont à la base de la phytothérapie [16].

I.1. *Moringa Oleifera* :

La plante *Moringa Oleifera* est considérée comme l'un des arbres les plus utiles au monde, elle possède de nombreuses propriétés intéressantes qui lui confèrent un grand intérêt scientifique, elle est décrite comme l'arbre miracle, l'arbre de vie, et le don de Dieu à l'homme [17].

I.2. Nomenclature :

Moringa Oleifera est porte différents noms selon les régions :

Tableau I. 1: Quelques noms vernaculaires du *Moringa Oleifera* [18].

Anglais	Arabe	Inde	Français
Drumstick tree	Shajarat alhayat	Horseradish	Ben aïlé
Ben oil tree	Habbah Ghaliah	Shajnah	morungue
Never die	Ghasan alban	Dumstick	Moringa aïlé

I.3. Classification classique :

Tableau I. 2: La classification systématique de *Moringa Oleifera* [19].

Classification	Nom spécifiques
Règne	Plantae
Sous-règne	Angiospermes
Division	Dicotylédones
Classe	Rosacées
Ordre	Brassicales
Famille	Moringaceae
Genre	Moringa
Espèce	<i>Moringa Oleifera</i> Lamarck

I.4. Historique :

L'histoire de *Moringa Oleifera* remonte à 150 avant Jésus Christ, des preuves historiques indiquent que les rois et les reines antiques ont utilisé, les feuilles et les fruits de *Moringa Oleifera* dans leur régime alimentaire pour maintenir la vigilance mentale et une peau saine [18].

I.5. Distribution géographique :

Moringa Oleifera est un arbre originaire du nord-ouest de l'Inde du Pakistan partie situant en bordure de l'Himalaya, il a été introduit dans toutes les régions tropicales et subtropicales et s'est naturalisé dans de nombreux pays africains. Cette arbre a une distribution géographique étendue dans toute l'Amérique centrale et du Sud, en Afrique et en Asie du Sud [20]

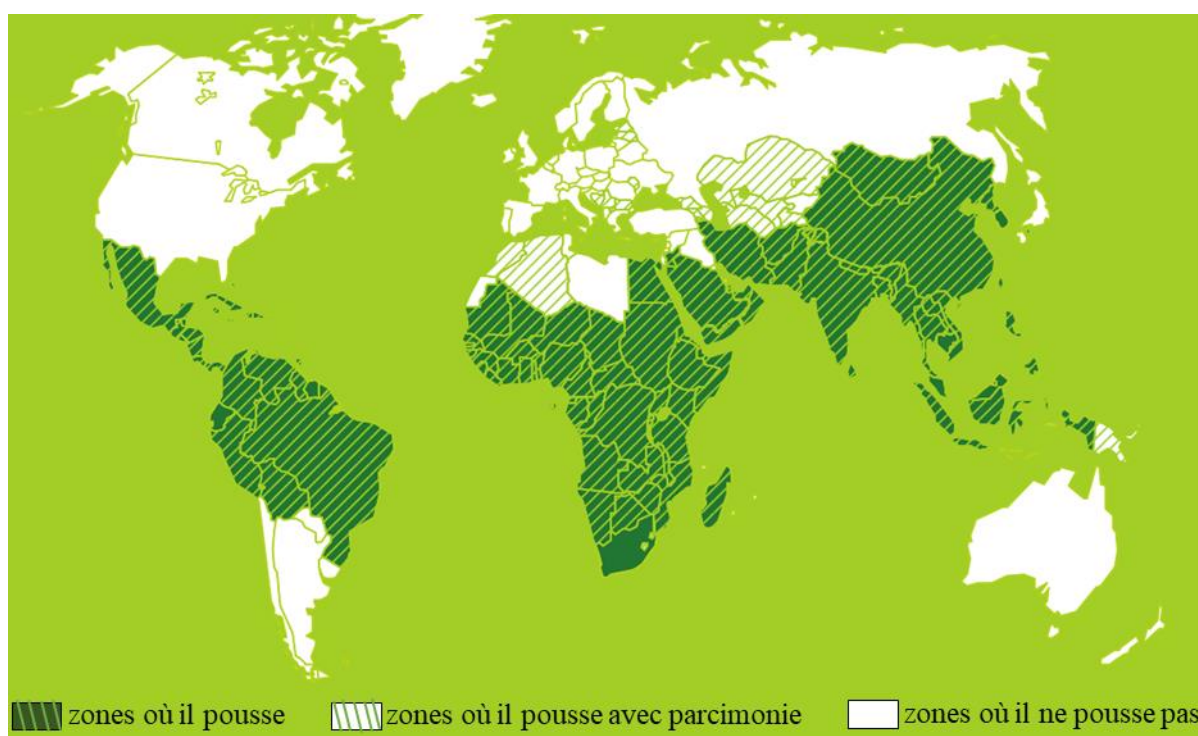


Figure I. 1: Distribution géographique de *Moringa Oleifera* dans le monde [21].

I.6. Description botanique des différentes parties de la plante *Moringa Oleifera* :

L'arbre *Moringa Oleifera* est une plante à croissance rapide, qui en fin de croissance, peut atteindre jusqu'à 10 à 15 m de haut et son diamètre jusqu'à 3 mètres, avec une couronne ouverte en forme de parapluie, un tronc droit qui mesure 20 à 40 cm de diamètre, parfois très peu développé, en général, il atteint 1,5 à 2 mètres bien qu'il puisse parfois atteindre les 3 mètres de haut avant de se ramifier en branches. Le bois de *Moringa Oleifera* est mou, très tendre et souvent attaqué par les termites [22].



Figure I. 2: L'arbre de *Moringa Oleifera*.

I.6.1. Les graines :

Les graines sont arrondies, ailées, avec une coque marron semi-perméable. Le poids moyen d'une graine est de 0,3 g dont 25% sont représentés par la coque. La production annuelle par arbre est de 15 000 à 25 000 graines [23].



Figure I. 3: Les graines de *Moringa Oleifera* [23].

I.6.2. Les fleurs :

Les fleurs mesurent 2,5 cm de large et se présentent sous forme de panicules axillaires et tombantes de 10 à 25 cm. Elles sont généralement abondantes et dégagent une odeur agréable. Elles sont blanches ou couleur crème, avec des points jaunes à la base. Les sépales, au nombre de cinq, sont symétriques et lancéolés. Les cinq pétales sont minces et spatulés, symétriques à l'exception du pétale inférieur, et entourent cinq étamines [18].



Figure I. 4: Les fleurs de *Moringa Oleifera* [21].

I.6.3. Les gousses :

Les fruits sont en forme de gousses allongées à trois valves, déhiscentes et mesurant 20 à 60 cm de long. Les gousses sont situées au sommet des branches et chacune renferme environ 12 à 35 graines [24].



Figure I. 5: Les gousses de *Moringa Oleifera* [21].

I.6.4. Les branches :

Les branches de *Moringa Oleifera* poussent de manière désorganisée et la canopée est en forme de parasol [25].



Figure I. 6: Les branches de *Moringa Oleifera* [21].

I.6.5. Les racines :

Les graines de *Moringa Oleifera* une fois en terre développent une racine blanche gonflée, tubéreuse qui a une odeur piquante caractéristique dotée de racines latérales plutôt clairsemées. Les arbres cultivés à partir de graines développent une profonde racine pivotante robuste avec un système à large diffusion composée d'épaisses racines latérales tubéreuses [26].



Figure I. 7: Les racines de *Moringa Oleifera* [21].

I.6.6. Les feuilles :

Les feuilles, alternes et bi ou tripennées, se développent principalement dans la partie terminale des branches. Elles mesurent 20 à 70 cm de long, sont recouvertes d'un duvet gris lorsqu'elles sont jeunes, ont un long pétiole avec 8 à 10 paires de pennes composées chacune de deux paires de folioles opposés, plus un à l'apex, ovales ou en forme d'ellipse, et mesurant 1 à 2 cm de long [27].



Figure I. 8: Les feuilles de *Moringa Oleifera* [21].

I.7. Principales exigences écologiques de *Moringa Oleifera* :**I.7.1. Altitude :**

Le *Moringa Oleifera* préfère une altitude inférieure à 600 m, mais peut pousser jusqu'à 1200 m dans certaines régions tropicales et a déjà été observé à 2000 m [6].

I.7.2. Température :

Généralement, le *Moringa Oleifera* pousse le mieux dans les régions tropicales chaudes et semi-arides. La plage de température idéale de cette plante est de 25 à 35 °C, mais il peut tolérer des températures jusqu'à 48 °C pendant de courtes périodes de temps [28].

I.7.3. Sols :

Le *Moringa Oleifera* préfère les sols légers, frais et qui ne retiennent pas l'eau. Il pousserait bien également dans les sols rocaillieux et des terres légèrement salées. En effet, cette plante préfère les sols sablonneux ou limoneux bien drainés. Il tolère les sols argileux mais pas l'engorgement du sol [28].

I.7.4. pH :

Le *Moringa Oleifera* tolère une grande plage de pH (de 5 à 9), et pousse assez bien dans les milieux alcalins jusqu'à un pH de 9 [28].

I.7.5. Vent :

Un environnement venteux peut assécher les feuilles de *Moringa Oleifera*. Les forts vents peuvent casser les branches et même le tronc de l'arbre [28].

I.8. Valeurs nutritionnelles de *Moringa Oleifera* :

Le *Moringa Oleifera* est un arbre d'une extrême puissance, Une étude en laboratoire a permis de conclure que les feuilles fraîches de *Moringa Oleifera* contiennent [29] :

- 4 fois plus de vitamine A que les carottes.
- 7 fois plus de vitamine C que les oranges.
- 4 fois plus de calcium que le lait.
- 3 fois plus de potassium que les bananes.
- 5 fois du fer contenu dans les épinards.
- 2 fois plus de protéines que les œufs.
- 8 fois plus de fibres que le blé.
- 30 fois plus de vitamine B2 que les amandes.



Figure I. 9: Teneurs des feuilles de *Moringa Oleifera* en vitamines et minéraux [21].

I.9. Composition chimique :

Compte tenu des effets bénéfiques du *Moringa Oleifera* sur la santé, c'est une plante unique en raison de ses minéraux enrichissants avec des composants anti-nutritionnels inférieurs. Les compositions chimiques et acides aminés des feuilles de *Moringa Oleifera* sont présentées dans les tableaux 1 et 2 [28].

Tableau I. 3 : Compositions chimiques des feuilles de *Moringa Oleifera* [28].

Composant nutritif	Feuilles fraîches	Feuilles sèches	Feuilles en poudre
Calories (cal)	92	329	205
Protéine (g)	6.7–17.1	29.4–40.0	25.4–27.1
Graisses (g)	1.7–2.11	5.2–6.5	2.3
Glucides (g)	6.3–12.5	38.0–41.2	34.3–38.2
Fibre (g)	0.9–7.09	12.5–21.09	19.2
Vitamine A	0.9–11.05	16.3–18.90	-
Vitamine B1 (mg)	0.06	2.02–2.60	2.64
Vitamine B2 (mg)	0.05	19.82–21.3	20.5
Vitamine B3 (mg)	0.8	7.6–8.3	8.2
Vitamine C (mg)	220	15.8–17.3	17.3
Vitamine E (mg)	448	10.8–77.0	113
Calcium (mg)	440	2185–3050	2003
Magnésium (mg)	42–82	86–448	368
Phosphore (mg)	30.15–70	204–252	204
Potassium (mg)	259	1236–1384	1324
Cuivre (mg)	0.07	0.08–0.49	0.57
Fer (mg)	0.85–10.7	25.6–490	28.2
Soufre (mg)	-	363–630	870
Zinc (mg)	6.7	3.25–13.03	-
Manganèse (mg)	81.6	86.8–91.2	-

Toutes les valeurs sont en 100 g par matière végétale.

Tableau I. 4: Teneur en acides aminés des feuilles de *Moringa Oleifera* [28].

Acide aminé	Feuilles fraîches (mg / g MS)	Feuilles extraites (mg / g MS)
Lysine	13.25–26.77	14.06–18.09
Leucine	20.52–42.89	17.5–21.84
Isoleucine	11.91–22.53	8.08–11.30
Méthionine	3.5–8.96	1.13–4.97
Cystine	3.8–5.18	1.0–3.39
Phénylalanine	16.31–27.14	8.9–15.51
Tyrosine	18.88	9.71
Valine	10.62–27.58	7.25–14.26
Histidine	5.17–13.57	7.16–7.50
Thréonine	13.5–21.97	7.90–11.70
Serine	10.87–20.79	9.40–10.34
Acide glutamique	28.42–50.85	17.10–25.65
L'acide aspartique	20.52–46.11	14.3–22.16
Proline	14.3–25.75	12.41–13.63
Glycine	15.33–26.62	10.3–13.73
Alanine	28.67–30.33	12.51–18.37
Arginine	18.9–30.28	13.25–15.64
Tryptophane	4.25–9.26	5.27–7.16

I.10. Domaines d'utilisation de *Moringa Oleifera* :

Les feuilles de *Moringa Oleifera* sont distribuées un peu partout dans le monde, elles ont une gamme impressionnante d'utilisation pour leurs intérêts nutritionnels et médicaux. Presque toutes les parties de l'arbre ont un intérêt nutritionnel parmi les domaines d'utilisation on trouve [19] :

I.10.1. Consommation humaine :

Les feuilles, les fruits, les jeunes tiges, les racines et les fleurs sont consommables et se consomment partout dans le monde. Les feuilles peuvent se consommer fraîches ou en poudre et même associées aux épices comme le piment, elles peuvent également être préparées en soupe ou en salade. Les jeunes gousses vertes peuvent être consommées bouillies comme des haricots. Les graines sèches peuvent être réduites en poudre et utilisées pour assaisonner les sauces, et les fleurs peuvent également être consommées comme crudités (salade). L'huile de *Moringa Oleifera* est utilisée comme huile végétale comestible et également comme huile de cuisson [30].

I.10.2. Consommation animale :

Moringa Oleifera est riche en nutriments et en composés bioactifs qui offrent un grand potentiel pour son utilisation en tant que ressource d'alimentation du bétail. Les feuilles, les graines et l'écorce d'arbre sont facilement consommées par les animaux d'élevage tel que les bovins, les moutons et les chèvres en tant qu'ingrédients dans l'alimentation [31].

I.10.3. Pharmaceutique :

Moringa Oleifera est souvent appelé une panacée et peut être utilisé pour soigner plus de 300 maladies. Le *Moringa Oleifera* a longtemps été utilisé en phytothérapie par les Indiens et les Africains, la présence de composés phytochimique en fait un bon agent médicinal. Notamment les différentes parties de cet arbre, y compris les racines, l'écorce, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines sont traditionnellement utilisées dans diverses applications thérapeutiques, en particulier les tumeurs abdominales, l'hystérie (trouble psychologique), le scorbut, la paralysie vésicale et la prostate [32].

I.10.4. Traitement de l'eau :

L'extrait aqueux de graines a été traditionnellement utilisé pour purifier l'eau en Afrique et, dans les pays sud-asiatiques, comme coagulant naturel puisqu'il présente des taux élevés de protéines cationiques actives de masse moléculaire comprise entre 6 et 16 kDa et de points isoélectriques hautement alcalins. De plus, il est connu que les graines sont capables de réduire 99,9% des bactéries en suspension dans l'eau après un traitement de 1 à 2 heures [23].

I.10.5. Utilisations industrielles :

Grâce à ses propriétés, l'huile de *Moringa Oleifera* est utilisée comme lubrifiant dans la machinerie fine, comme l'horlogerie (pour sa faible tendance à se détériorer et devenir rance et

collante). Elle est également intéressante dans l'industrie cosmétique et de parfums. Le bois de cette arbre constitue « aussi une excellente pâte à papier [33].

I.10.6. Biodiesel :

Après l'extraction de nutriments de valeur élevée, l'huile de *Moringa Oleifera* peut être convertie en biodiesel. La propriété la plus remarquable de ce biodiesel est réside dans les indices de cétane élevés. Les propriétés physico-chimiques étudiées du biodiesel de l'huile de *Moringa Oleifera*, suggèrent qu'il puisse être employé comme carburant dans des moteurs [22].

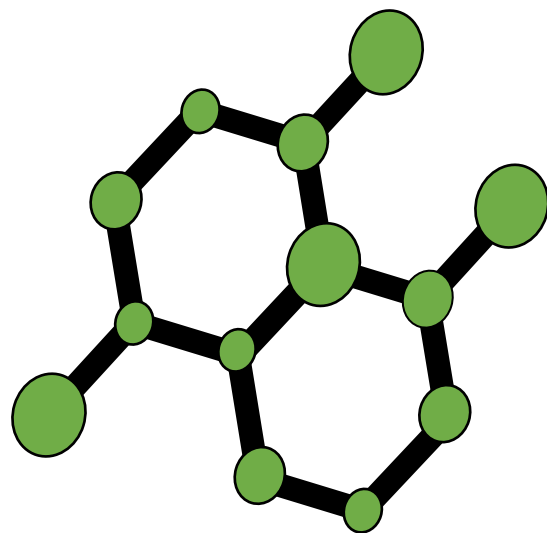
I.10.7. Autres utilisations :

Moringa Oleifera possède d'autres pouvoirs ; ses graines sont utilisées pour purifier le lait et le miel. En raison de sa teneur en composés phytohormones de type Cytokinines. Cette plante peut être utilisée comme un engrais pour activer la croissance des arbres et les rendements des plantes. *Moringa Oleifera* a été employé aussi comme une barrière de phase et coupe-vent [34].

I.11. Importance socio-économique :

Moringa Oleifera est l'un des arbres tropicaux les plus utiles. Il se propage relativement facilement, aussi bien de manière végétative que sexuée, et il est peu exigeant en eau et matières minérales. Ainsi, sa production et son entretien sont aisés. L'introduction de cette plante au sein d'une ferme dans un environnement riche en biodiversité peut être bénéfique à la fois pour l'exploitant et pour l'écosystème environnant. Presque toutes les parties de la plante ont des intérêts nutritionnels d'où l'importance socioéconomique dans la région agro-écologique [35].

POLYPHÉNOLS
ET
ACTIVITÉ
ANTIOXYDANTE



Chapitre II : Polyphénols et activité anti-oxydante

Au début du XX^{ème} siècle, des synthèses de composés analogues (métabolites secondaires) ont commencés à naître ; et afin d'augmenter leurs efficacités pharmacologiques, des études des structures et des activités biologiques issues des dérivés prénylés de ces métabolites ont été réalisés. Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-microbiennes, anti-inflammatoires et anti-carcinogènes ou mutagènes [36]. On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes. Ces composés sont constitués de polyphénols, lignines, stilbènes, flavonoïdes, phénylpropanoïdes, anthocyanes et tannins [37]. Dans la nature, la synthèse du noyau aromatique est le fait des seuls végétaux et micro-organismes. Les organismes animaux sont en effet presque toujours tributaires, soit de leur alimentation, soit d'une symbiose, pour élaborer les métabolites qui leur sont indispensables et qui comportent cet élément structural (aminoacides, vitamines, pigments, toxines...etc) [38].

II.1. Définition des composés phénoliques :

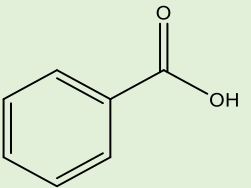
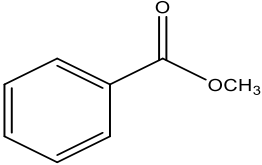
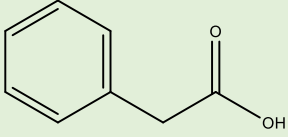
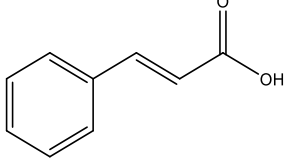
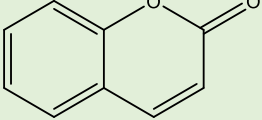
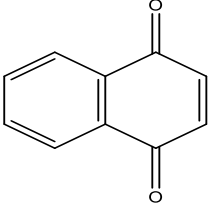
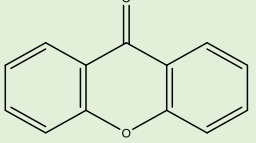
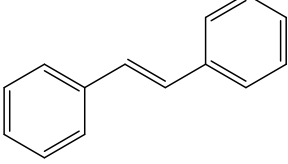
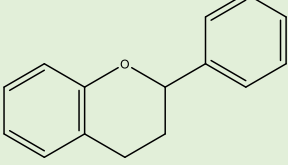
Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques 1 associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes [39].

Les composés phénoliques prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neuro-dégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [40].

II.2. Classification des composés phénoliques :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau II. 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau II. 1: Les principales classes des composés phénoliques [3].

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénone	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide ρ -hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acidep-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculétine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

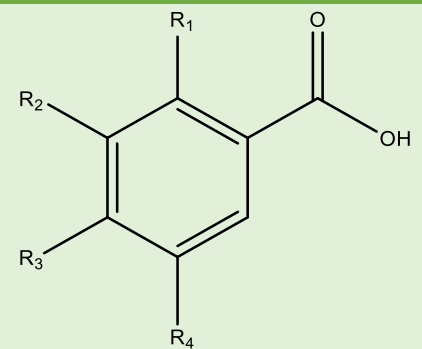
II.2.1. Acides phénoliques :

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxy cinnamiques [41].

II.2.1.1. Acides hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type (C6-C1) (**Tableau II. 2**). Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides [41].

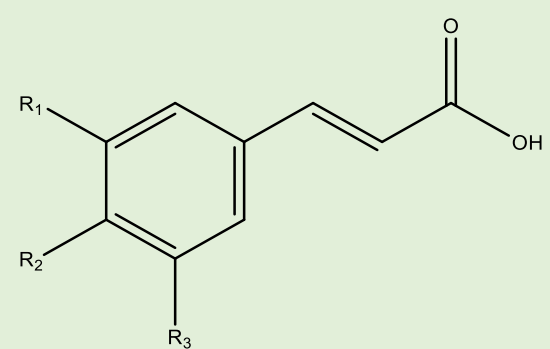
Tableau II. 2: Principaux acides hydroxybenzoïques [1].

Structure	R1	R2	R3	R4	Acide phénolique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	OH	H	H	OH	Acide Protocatechimique
	OH	H	H	H	Acide salicylique

II.2.1.2. Acides hydroxy-cinnamiques :

Dérivent de l'acide cinnamique (**Tableau II. 3**), ils ont une structure générale de base de type (C6-C3), existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques, se présentent majoritairement sous formes libre et peuvent exister sous forme estérifiée par l'acide quinique [42].

Tableau II. 3: Principaux acides hydroxy cinnamiques [1].

Structure	R1	R2	R3	Acide phénolique
	H	H	H	Acide cinnamique
	OH	OH	H	Acide caféique
	H	H	H	acide paracoumarique

II.2.2. Flavonoïdes

II.2.2.1. Définition :

Les flavonoïdes sont considérés comme l'une des sections les plus importantes des composés phénoliques, dont l'origine vient du mot latin flavus, qui signifie jaune, et est concentré surtout dans la partie aérienne de la plante sous forme de composés à base de sucre (la présence de sucre dans la molécule lui donne la capacité de se dissoudre dans l'eau) ou sous forme de composés libres dans les cavités et le cytoplasme. En tant que membranes fibreuses, plus de 4000 flavanols naturels ont été extraits [43].

II.2.2.2. Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes partagent une structure chimique commune (Figure II. 1) sur la base du squelette C6-C3-C6, où deux cycles aromatiques sont connectés à une triple chaîne carbonée qui forme un cycle hétérogène [44], les atomes de carbone individuels sont basés sur le système de numérotation qui utilise des nombres réguliers avec les nombres A, C et «préparés» pour l'épisode B.

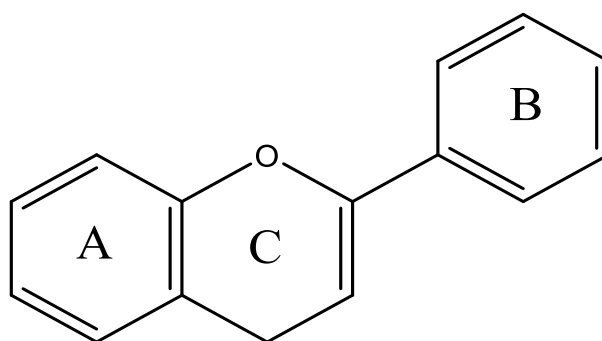


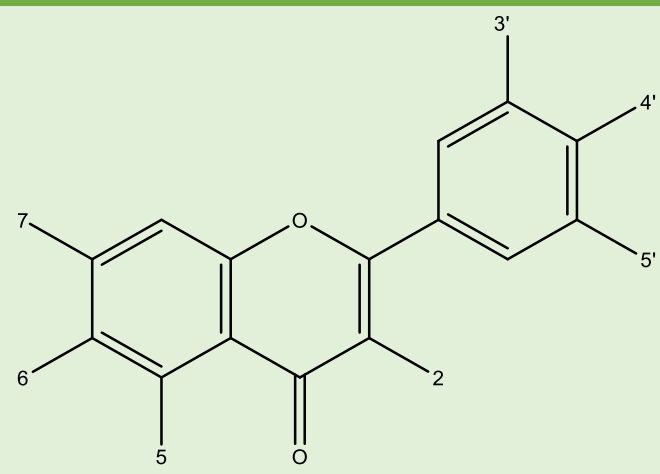
Figure II. 1 : Structure de base des flavonoïdes.

II.2.2.3. Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en différents sous-groupes en fonction du carbone du cycle C sur lequel le cycle B est fixé et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C [36].

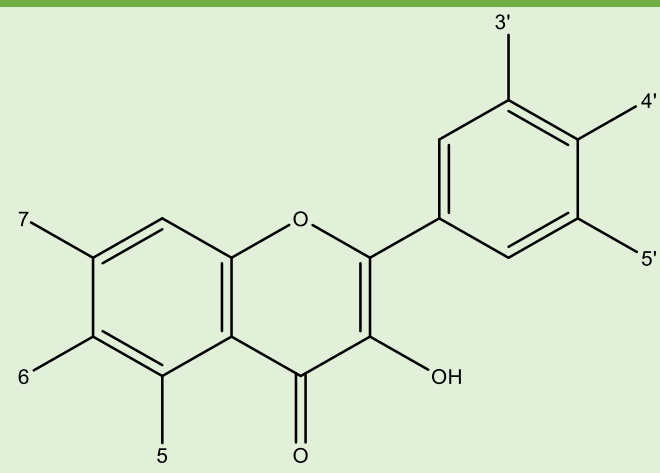
- **Les flavones** : sont caractérisées par la présence d'un groupe cétone en C4 et d'une double liaison C2 ,3. Le cycle A de la majorité des flavones est dérivé du phloroglucinols et le cycle B peut être substitué aux positions C3 ' , C4' ou C5 ' [36].

Tableau II. 4: Structures chimiques des flavones avec quelques exemples [1]

Structure	Exemples		Substitutions				
 Flavones		5	6	7	3'	4'	5'
	Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
	Chrysin	H	H	OH	H	H	H
	Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H

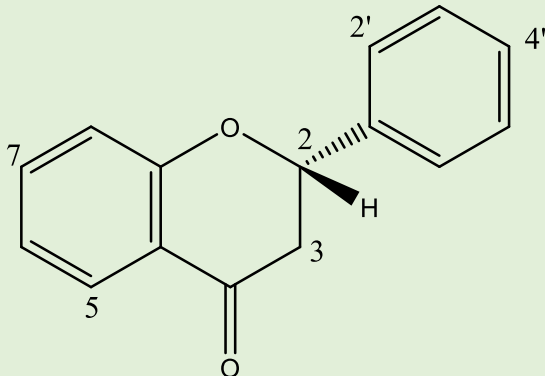
- **Les flavonols** : ont une double liaison entre C2 et C3, avec un groupe hydroxyle en position C3 [36].

Tableau II. 5: Structures chimiques des flavonols avec quelques exemples [1].

Structure	Exemples		Substitutions				
 Flavonols		5	6	7	3'	4'	5'
	Fisépine	H	H	OH	H	OH	OH
	Quercépine	OH	H	OH	OH	OH	H
	Myricépine	OH	H	OH	OH	OH	OH

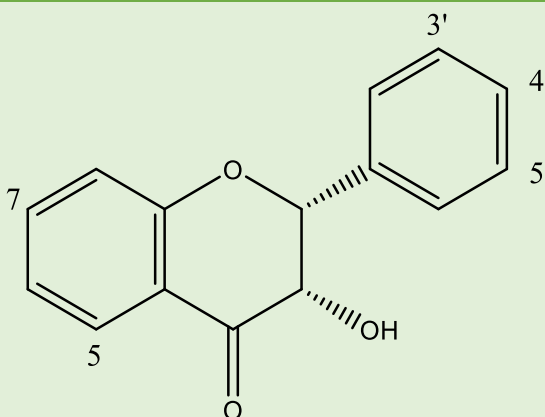
- **Les flavanones** : montrent un groupe cétone en C4 sans la double liaison C2, 3, trouvée dans les flavones. Ils possèdent un centre chiral à C2 [8].

Tableau II. 6: Structures chimiques des flavanones avec quelques exemples [8].

Structure	Examples		Substitutions				
 Flavanones		5	6	7	3'	4'	5'
	Eriodictyol	OH	H	OH	OH	OH	H
	Naringenin	OH	H	OH	H	OH	H
	Butine	H	H	OH	H	OH	OH

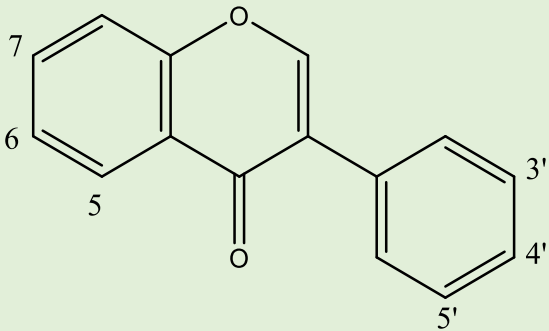
- **Les dihydro-flavonols** : sont caractérisés par l'absence C2-C3 double liaison et à centres symétriques, Il se distingue des flavanones par la présence d'hydroxyl de la position C3.

Tableau II. 7: Structures chimiques des dihydro-flavonols avec quelques exemples [8].

Structure	Examples	Substitutions						
 Dihydro-flavonols		5	6	7	3'	4'	5'	
	Taxifoline	OH	H	OH	OH	OH	H	
	Fustin	H	H	OH	OH	OH	H	
	Ampélopsine	OH	H	OH	OH	OH	OH	

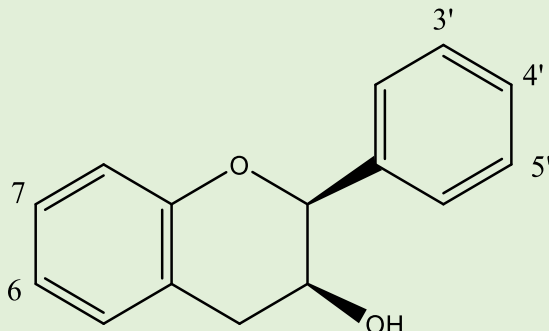
- **Les isoflavones** : sont caractérisées par le fait que l'anneau B est fixé en C3 plutôt que position C2 [45].

Tableau II. 8: Structures chimiques des isoflavones avec quelques exemples [8].

Structure	Exemples		Substitutions				
 Isoflavones		5	6	7	3'	4'	5'
	Daidzein	H	H	OH	H	OH	H
	Genistéine	OH	H	OH	H	OH	H
	Orobol	OH	H	OH	OH	OH	H

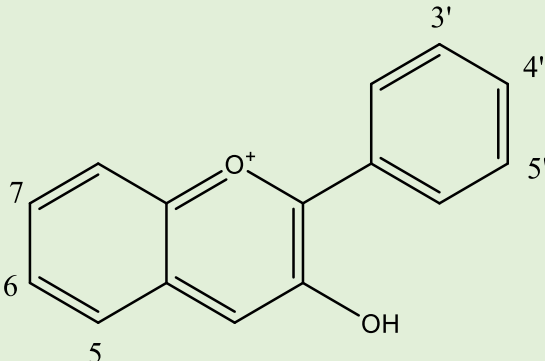
- **Les flavanols** : contiennent une chaîne à trois atomes de carbone saturée avec un groupe hydroxyle dans le C3 [51].

Tableau II. 9: Structures chimiques des flavanols avec quelques exemples [8].

Structure	Exemples		Substitutions				
 Flavanols		5	6	7	3'	4'	5'
	Catéchine	OH	H	OH	OH	OH	H
	Gallocatéchine	OH	H	OH	OH	OH	OH
	Afzelecho	OH	H	OH	H	OH	H

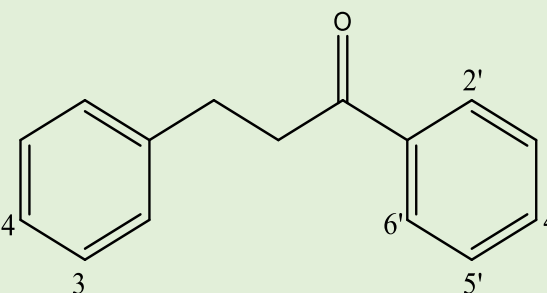
- **Les anthocyanidines** : possèdent un squelette basé sur le cation pyrylium. Ils sont caractérisés par la présence d'une charge cationique et ne se trouvent généralement pas sous forme d'aglycons libres [8].

Tableau II. 10: Structures chimiques des anthocyanidines avec quelques exemples [8].

Structure	Examples		Substitutions				
 Anthocyanidines		5	6	7	3'	4'	5'
	Pelargonidine	OH	H	OH	H	OH	H
	Cyanidine	OH	H	OH	OH	OH	H
	Delphinidine	OH	H	OH	H	OH	OH

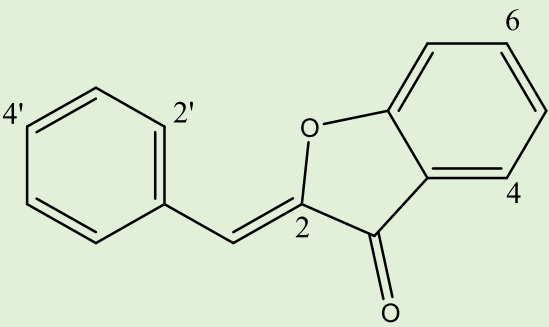
- **Les chalcones** : n'a pas d'hétérocyclique central noyau et sont caractérisés par la présence d'une chaîne à trois carbones avec une fonction cétone et insaturation α, β , les substitutions sur l'anneau A sont le plus souvent identiques à ceux des autres flavonoïdes, où car l'anneau B est assez souvent non substitué [53].

Tableau II. 11: Structures chimiques des chalcones avec quelques exemples [8].

Structure	Exemples		Substitutions					
 Chalcones		2'	3'	4'	6'	3	4	
	Davidigenin	OH	H	OH	H	H	OH	
	Isoliquiritigenin	OH	H	OH	H	H	OH	
	Butein	H	H	OH	OH	OH	OH	

- **Les aurones** : composés caractérisés par un cycle C avec une boucle à cinq pointes [54].

Tableau II. 12: Structures chimiques des aurones avec quelques exemples [8].

Structure	Exemples		Substitutions				
 Aurones		4	6	7	3'	4'	5'
	Maritimetin	H	OH	OH	OH	OH	H
	Aureusidin	OH	OH	H	H	OH	OH
	Bracteatin	OH	OH	H	OH	OH	OH

II.2.3. Les tannins :

Depuis les temps anciens, il a été connu que certaines matières organiques possèdent des propriétés de bronzage et sont capables de bronzer les peaux animales, et les tanins sont un mot dérivé du nom de Français Tanin (un matériau utilisé dans le bronzage) appartenant au groupe naturel de polyphénols [49]. Tannin est un composé phénolique avec des poids moléculaires assez grands allant de 500 à 20.000 dalton [50]. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles avec des glucides, des protéines et des enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité alimentaire. Ils peuvent également lier la cellulose et de nombreux éléments minéraux [51]. Et c'est deux types :

II.2.3.1. Tanins hydrolysables :

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallo tannins, aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres) [52].

L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C6-C3, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur. Tanins hydrolysables ne sont présents que dans les quantités infimes dans les aliments couramment consommés [51].

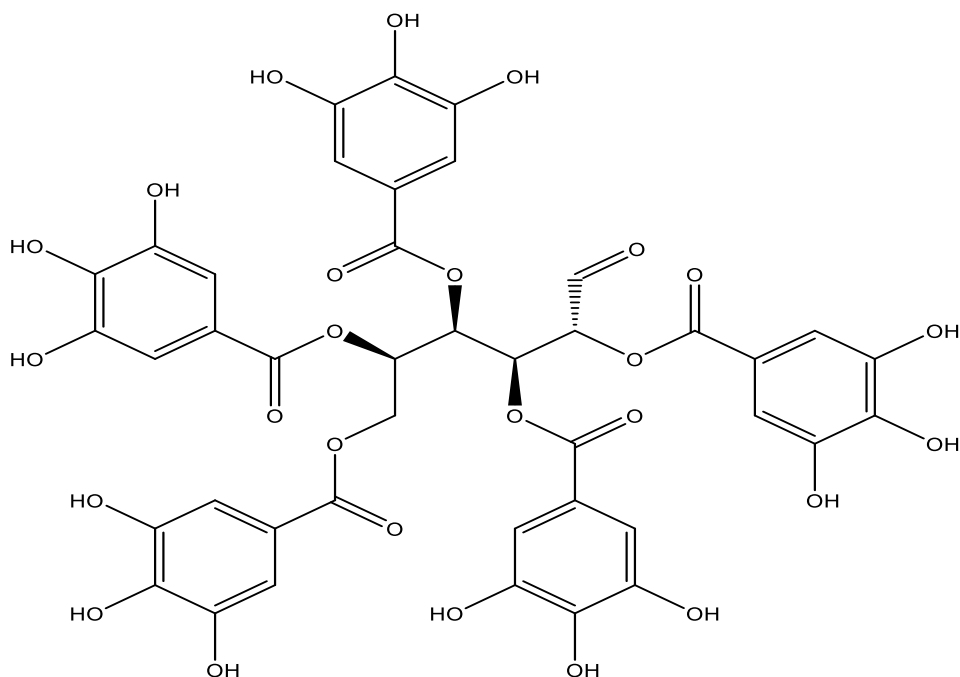


Figure II. 2: Exemple des tanins hydrolysables (penta-O-galloylglucose).

II.2.3.2. Les tannins condensés :

Les tannins condensés ou le proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6. Les tanins condensés sont largement distribués dans les légumes, les fruits, le cacao et certains grains [51].

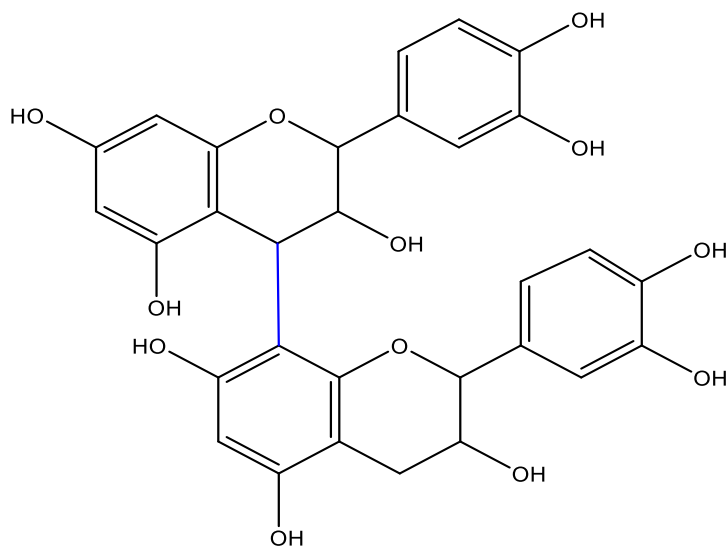


Figure II. 3: Exemple des tanins condensés (Proanthocyanidines type B).

II.3. Propriétés chimiques majeures des polyphénols :

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxyde (Figure II. 4) stabilisés par résonnance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical [7], l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical [53]. Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre [16].

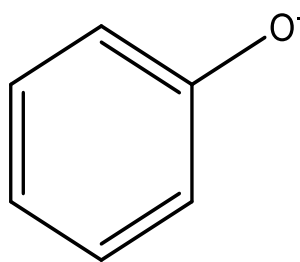


Figure II. 4: Structure chimique de l'ion phénoxyde.

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel [54]. Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale [55].

II.4. L'activité anti-oxydante des polyphénols :

Les polyphénols possèdent surtout une forte activité anti-oxydante [56]. L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, pour les flavonoïdes, ce mécanisme est lié à leur structure et à l'arrangement des groupements hydroxyles [6]. Des études effectuées sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montrées que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

À titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [57].

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est dirigée principalement vers HO et O²⁻ aussi les radicaux peroxy et alkoxy. En plus, comme ces composants présentent une forte affinité pour les ions du fer (catalysent plusieurs processus conduisant à l'apparition des radicaux libres), leur activité anti-péroxydative peut être aussi attribuée à une capacité concomitante de chélation du fer [58].

Par ailleurs, l'inhibition des enzymes présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains. Une étude réalisée a montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase [44].

II.5. L'activité anti-oxydante :

Chaque partie du corps humain souffre d'environ 10 000 attaques de radicaux libres par jour. Cette attaque est principalement axée sur le matériel génétique en plus du fait que les membranes cellulaires, les protéines et les graisses sont également attaquées par les radicaux libres et au cours de 70 ans de vie humaine, le corps génère l'équivalent d'environ dix-sept tonnes de radicaux libres. Donc le corps humain a besoin de défenses anti-oxydantes efficaces en tout temps [59], alors qu'est-ce que les radicaux libres ?

II.6. Radicaux libres

II.6.1. Définition :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules, Il contient un ou plusieurs électrons dans la coquille de valence ou orbite extérieure et capable d'existence indépendante. L'un nombre impair d'électron (s) pour le radical libre le rend instable, éphémère et très réactif. À cause d'eux très interactifs, ils peuvent retirer les électrons d'autres véhicules de stabilisation. Ceci est la molécule attaquante dès le départ, il perd son électron et devient radical. La cascade est une chaîne des réactions qui finit par faire mal cellule vivante [60].

II.6.2. Sources des radicaux libres :

- ✓ Sources internes
- ✓ Sources externes
- ✓ Facteurs physiologiques

- **Sources internes :**

Il peut s'agir des réactions enzymatiques, qui servent de source des radicaux libres. Ceux-ci incluent ceux réactions impliquées dans la chaîne respiratoire, dans la phagocytose, dans la synthèse des prostaglandines et système du cytochrome P450. Certaines sources internes de génération des radicaux libres sont les mitochondries, xanthine oxydase, phagocytes, réactions impliquant le fer et d'autres métaux de transition, peroxyosomes, voies arachidonates, exercice, ischémie / reperfusion, inflammation [60].

- **Sources externes :**

Il s'agit notamment des réactions non enzymatiques de l'oxygène aux composés organiques. Electrolytes libres Ils surviennent également lors des réactions qui commencent par des rayonnements ionisants [61]. Certaines sources externes des radicaux libres sont : la fumée de cigarette, les polluants environnementaux, les radiations, certains médicaments et pesticides de solvant industriel, et l'ozone [60].

- **Facteurs physiologiques :**

L'état mental comme le stress, les émotions, etc. et les maladies sont également responsables de la formation de radicaux libres [7].

II.6.3. Les types des radicaux libres :

Les radicaux libres se trouvent à l'intérieur du corps humain ou des mammifères sous la forme d'images efficaces d'oxygène actif, (ROS) (Réactive Oxygenspecies) dérivées de l'oxygène moléculaire. De plus, il existe une autre catégorie gratuite, Les racines sont appelées azote (RNS) (Réactive Nitrogenspecies) [62].

Tableau II. 13: Exemples de ROS et RNS [53].

Les espèces réactives de l'oxygène	Espèces réactives de l'azote
Anion super-oxyde ($O_2^{\bullet-}$)	L'oxyde nitrique ($NO^{\bullet}$)
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	Dioxyde nitrique ($NO_2^{\bullet}$)
Radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$)	Peroxy-nitrite ($ONOO^{\bullet-}$)

Les radicaux libres d'oxygène et d'azote peuvent être convertis en d'autres espèces réactives non radicalaires, Par produit chimique enzymatique ou non enzymatique. Des réactions qui peuvent à leur tour conduire à de nouvelles racines comme le peroxyde d'hydrogène, acide hypochloreux (HOCl), acide hypobromeux (HOBr) et peroxynitrite (ONOO) [27,28].

II.7. Les anti-oxydants :

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les anti-oxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols [62].

II.7.1. Définition :

Il peut être défini comme toute substance qui est capable, concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [58]. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques des radicaux libres.

II.7.2. Classification :

Les anti-oxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en anti-oxydants primaires ou secondaires.

II.7.2.1. Anti-oxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les anti-oxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme anti-oxydants de la nourriture [72].

II.7.2.2. Anti-oxydants naturels :

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant in vivo. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les

membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [73].

II.7.2.3. Anti-oxydants synergistes :

Ce sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'anti-oxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence d'autres anti-oxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citriques et tartriques, des acides aminés (lysine et arginine), de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer et le cuivre qui ont un effet pro-oxydant à faibles doses. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées [1].

II.7.2.4. Anti-oxydants primaires :

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques ($L\bullet$, $LOO\bullet$, $LO\bullet$) en produits plus stables (LH , $LOOH$, LOH) grâce à leur propriété de donneurs de protons actifs. Le radical ($A\bullet$) dérivé de l'anti-oxydant se convertit en produit stable [1].

II.7.2.5. Anti-oxydants secondaires :

Selon [1], les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- Absorption des radiations ultraviolettes
- Inactivation de l'oxygène singulet
- Chélation des métaux
- Décomposition des hydroperoxydes

MATÉRIELS *ET* *MÉTHODES*



Chapitre III : Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au sein de laboratoire de génie des procédés dans la faculté de la technologie à l'Université Echahid Hamma Lakhdar d' El Oued. Ce travail comprend l'étude de l'optimisation des conditions ultrasoniques d'extraction des composés phénoliques de *Moringa Oleifera* et leur activité antioxydante.

III.1. Echantillonnage :

La matière végétale utilisée dans cette étude est constitué des feuilles de *Moringa Oleifera*. Les feuilles ont récolté en Avril 2019 de l'Institut technique de développement de l'agronomie saharienne (ITDAS) à Hassi Ben Abdallah à l'Est de la ville d'Ouargla. (30 km).

Les différentes données sur le site d'échantillonnage sont mentionnées dans le **Tableau III. 1** ci-dessous, et représentés par la **Figure III. 1**:

Tableau III. 1: Données sur le site d'échantillonnage de *Moringa Oleifera*.

Localisation	Nom du site	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Etage bioclimatique	Date de récolte
l'Est d'Ouargla	Hassi Ben Abdallah-Ouargla	Latitude : 32°,30 N Longitude : 05°,4 E	135	Aride	Avril 2019

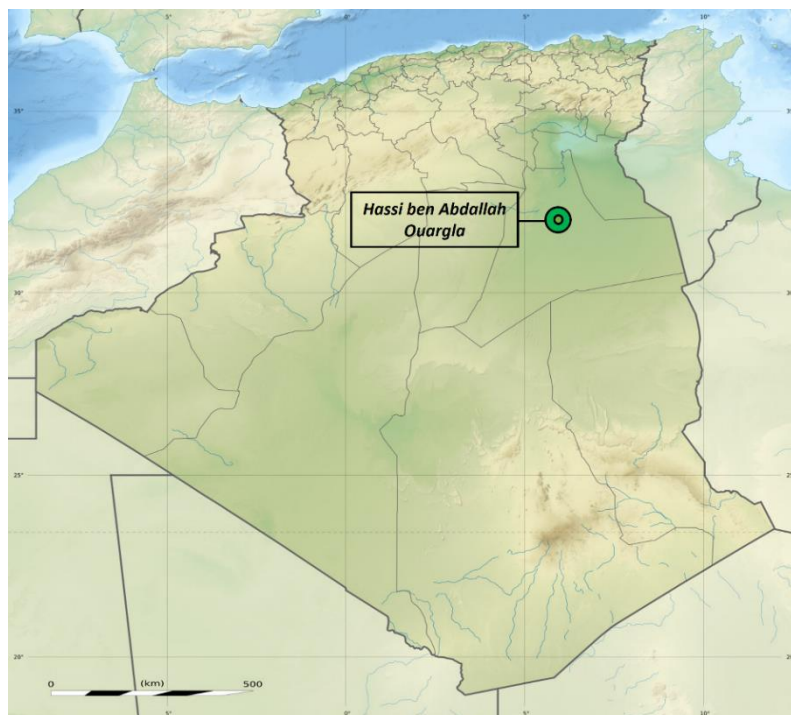


Figure III. 1: Carte géographique montrant la zone de collecte.



Figure III. 2: L'arbre et les feuilles utilisés dans ce travail.

III.2. Méthodologie

III.2.1. Test d'humidité :

La teneur en humidité des plantes est déterminée par la méthode de séchage dans un endroit sec et aéré à température ambiante sur un chiffon sous agitation occasionnelle [63]. Ainsi, le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivant :

$$\text{Test d'humidité (\%)} = \frac{P_F - P_S}{P_F} * 100 \quad \text{équation (III.1)}$$

Où :

P_f : Poids frais de l'échantillon (g).

P_s : Poids sec de l'échantillon (g).

Ce travail basé sur le plan expérimental suivant :

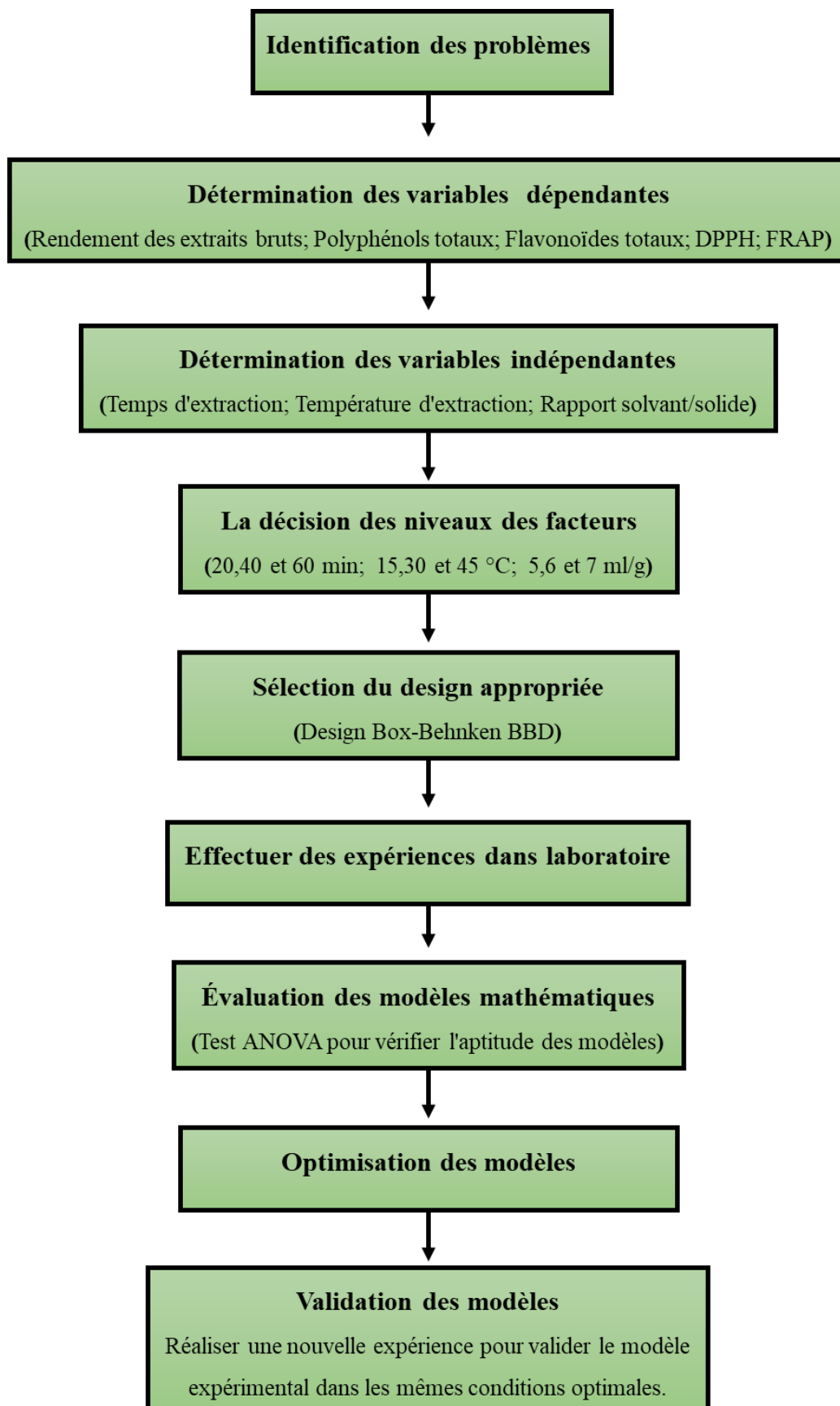


Figure III. 3: Diagramme général de la procédure expérimentale.

III.2.2. Méthode d'optimisation

III.2.2.1. Plan d'expériences :

Plan d'expériences (en anglais, design of experiments ou DOE) est une méthode structurée et planifiée, qui est utilisée pour trouver la relation entre différents facteurs qui affectent un sujet testé et les différentes sorties [15]. Cela se fait avec plusieurs facteurs à différents niveaux combinés dans une seule expérience. Il est utilisé pour analyser des problèmes complexes avec de nombreux facteurs d'influence à la fois. Au lieu de tester chaque facteur individuellement, dans un plan d'expériences, plusieurs facteurs sont modifiés à la fois pour réduire la quantité de test avec la possibilité d'analyser les interactions entre les facteurs [64]. Cela se fait en utilisant des tableaux de test. Ces tableaux sont des tableaux factoriels complets (toutes les combinaisons sont testées) ou des tableaux fractionnaires (une partie d'une configuration de test factorielle complète pour réduire le nombre de tests) [65].

III.2.2.2. La méthodologie de surface de réponse (RSM) :

La méthodologie de surface de réponse est une configuration de test statistique avec plus de facteurs à différents niveaux combinés dans une expérience [66]. Il est utilisé lors de l'analyse de problèmes complexes avec plusieurs facteurs d'influence dans des interactions uniques. Cela se fait en utilisant des tableaux de test. Un RSM est un DOE avec des tableaux spécialement conçus pour le calcul des interactions et des réponses quadratiques [67].

III.2.2.3. Design Box-Behnken (BBD) :

Le design Box-Behnken est une matrice de test spécialement conçue pour la méthodologie de surface de réponse [68]. Dans le design Box-Behnken, les niveaux des facteurs sont au milieu des arêtes (points rouges) et au centre du point central (point bleu) [69]. Ce tableau est souvent utilisé dans un RSM pour construire une surface de réponse. Pour chaque facteur 3 niveaux sont requis [70].

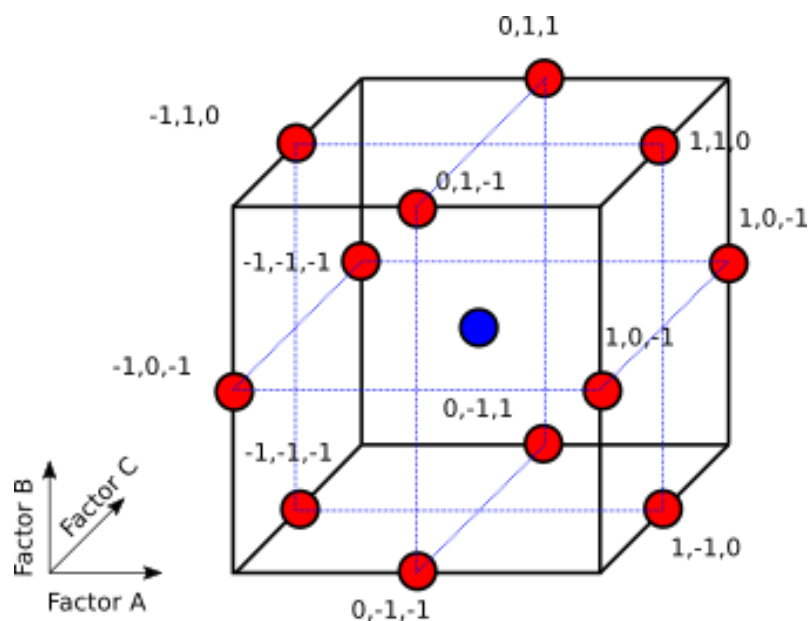


Figure III. 4: image graphique du Design Box-Behnken [71].

III.2.2.4. Modèle mathématique postulé :

Le modèle mathématique utilisé par le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, est un modèle du second degré qui relie la réponse aux facteurs [72]:

$$Y = \gamma_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^3 \alpha_{ij} X_i X_j \quad \text{équation (III.2)}$$

Où :

Y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.

X_i, X_j : représentent respectivement les niveaux des variables indépendantes.

$\alpha_i, \alpha_{ii}, \alpha_{ij}$: sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

III.2.2.5. Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques :

Il existe plusieurs paramètres qui influencent l'extraction des composés phénoliques : la méthode d'extraction, le choix du solvant, le temps d'extraction, la température d'extraction, le rapport solvant / solide...etc [73].

Dans notre travail on a fixé les paramètres suivant (Tableau III. 2) pour l'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques. Selon le design Box-Behnken choisi, 15

tests ont été réalisés, dont trois tests au centre (0, 0, 0) qui permettent l'évaluation de l'erreur (Tableau III. 3).

Tableau III. 3: Niveaux de conception expérimentale pour divers paramètres.

Symboles	Variable indépendante	Niveaux		
		-1	0	+1
X ₁	Temps d'extraction (min)	20	40	60
X ₂	Température d'extraction (°C)	15	30	45
X ₃	Rapport solvant / solide (ml/g)	5	6	7

Après avoir défini les trois paramètres et choisi le design Box-Behnken, nous obtenons la matrice suivante (Tableau III. 4) :

Tableau III. 5: La matrice de design Box – Behnken.

Tests	Facteurs		
	A (X ₁)	B (X ₂)	C (X ₃)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	0	0	0
6	0	-1	-1
7	0	-1	1
8	0	1	-1
9	0	1	1
10	0	0	0
11	-1	0	-1
12	-1	0	1
13	1	0	-1
14	1	0	1
15	0	0	0

III.2.3. Méthode d'extraction

III.2.3.1. Extraction assistée par ultrason (EAU) :

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 20 à 100 kHz pour l'extraction des composés bioactives [74]. Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires et améliorent le transfert de masse [75]. Les ultrasons dans l'extraction peuvent également perturber les parois cellulaires, facilitant la libération de leur contenu. Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique [76].

III.2.3.2.Principe de fonctionnement :

Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compression provoquant la formation de bulles, ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression [77]. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (Figure III. 4). Les mécanismes d'extraction par ultrason impliquent deux phénomènes physiques [73]:

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion.
- Le contenu des cellules peut être lessivé après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés phénoliques.

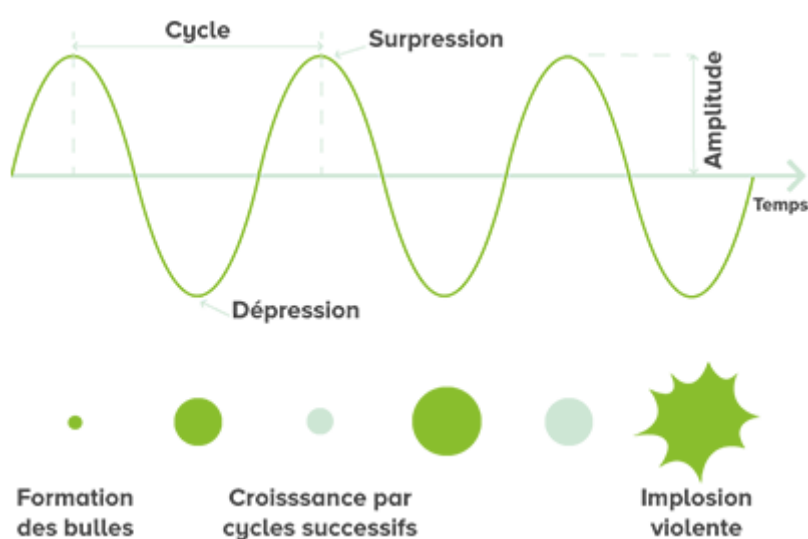


Figure III. 5: générations des bulles de cavitation par l'action des ultrasons

III.2.3.3. Rendement d'extraction :

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse obtenue par extraction et la masse totale du matériel végétal traité. Il est calculé à l'aide de formule suivante [1] :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{M_E}{M_S} * 100 \text{ équation (III.3)}$$

Où :

M_e : Masse d'extraite (g).

M_s : Masse de la matière végétale sèche (g).

III.3. Méthodes d'analyse physico-chimiques :

III.3.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible) :

III.3.1.1. Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution [73]. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert [78].

III.3.1.2. Principe :

La spectrophotométrie consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible.

D'une manière générale, la solution dont on désire étudier l'absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, et qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde [1].

III.3.1.3. Appareillage :

Pour la plupart des spectrophotomètres UV-visible, les lampes utilisées sont des lampes au deutérium. Ces lampes au deutérium émettent un rayonnement dont les longueurs d'onde sont comprises entre 180 et 400 nm. Pour la partie visible du spectre, les plus utilisées sont les lampes halogène au quartz à filaments de tungstène dont le rayonnement est compris entre 350 et 1300 nm. La présence de l'halogène augmente sensiblement la durée de vie de la lampe (1500 à 2000

heures). Ces deux lampes sont donc utilisées de façon complémentaire et simultanée pour couvrir la totalité du spectre UV-visible [79].

III.4. Dosages des composés phénoliques :

La détermination des composés phénoliques : polyphénols totaux (PPT) et flavonoïdes totaux (FVT) présents au niveau des différents extraits a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type Shimadzu UV-Vis 1800 ([Annexe. I](#)).

III.4.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT) :

- **Principe :**

Le dosage des polyphénols est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange de complexes des sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleu. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 765 nm. Ainsi, le dosage des PPT se fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique [72].

- **Mode opératoire :**

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante : 0.2 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.01 jusqu'à 0.06 mg/mL, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée est ajouté puis immédiatement. Après 5 min, on ajoute 0.8 ml d'une solution de Na_2CO_3 (7.5%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 765 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique [72].

- **Courbe d'étalonnage de l'acide gallique :**

Ces courbes sont établies en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS).

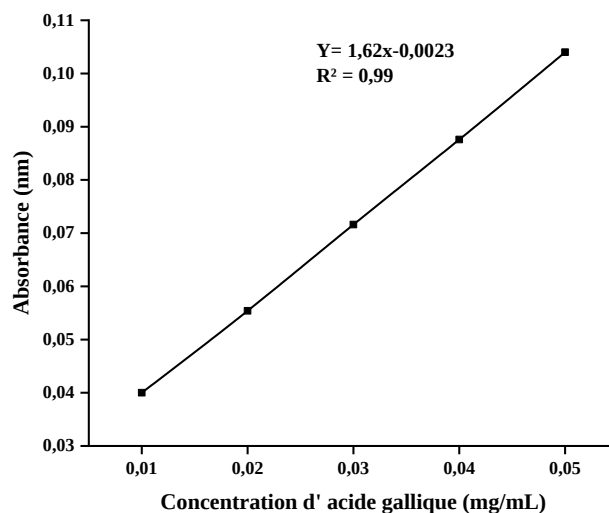


Figure III. 6 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT) :

- **Principe :**

Le réactif utilisé est : le chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par ce réactif, elle entraîne la formation d'un complexe jaune absorbe à 415 nm [80].

- **Mode opératoire :**

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, 1 ml de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%) préparé dans l'éthanol [80].

Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de rutine préparées à des concentrations différentes. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 415 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent rutine/gr de matière sèche (mg ER/g MS).

- **Courbe d'étalonnage de rutine :**

Dans ce dosage on utilise la rutine pour l'établissement de ces courbes. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g MS).

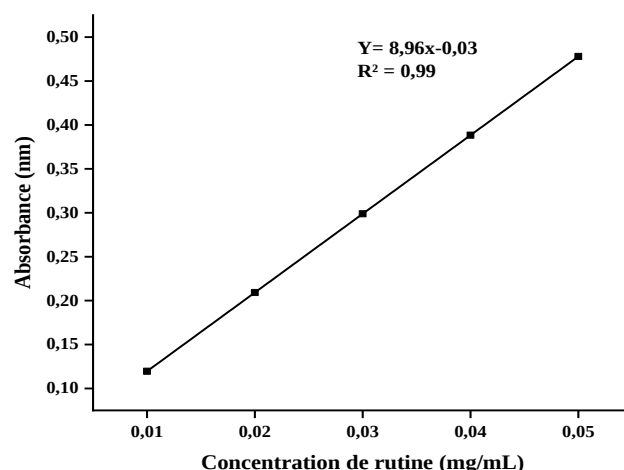


Figure III. 7: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.

III.5. Evaluation de l'activité anti-oxydante :

L'évaluation de l'activité anti-oxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité anti-oxydante par deux techniques chimiques à savoir : la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH.

III.5.1. Réactifs chimiques :

Tous les produits chimiques utilisés dans cette étude sont de qualités analytiques et ils sont les suivants : Acide sulfurique (H_2SO_4), chlorure de fer ($FeCl_3$) et sulfate de fer ($FeSO_4$) par Biochem chemopharma Co (Canada), DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) et TPTZ ($C_{18}H_{12}N_6$) produit par (ALFA AESAR).

III.5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

- **Principe :**

L'activité anti-radicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante [81].

Le DPPH (2,2 -diphényl-1-picrylhydrazil) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH. Cette couleur disparaît en présence d'anti-oxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe pécryl; et l'intensité de la couleur est inversement

proportionnelle à la capacité des anti-oxydants présents dans le milieu à donner des protons [82]. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517 nm [83].

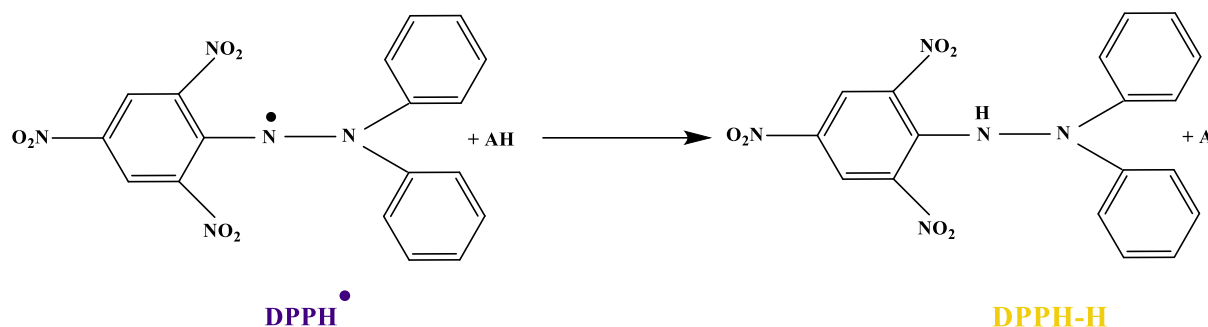


Figure III. 8: Mécanisme d'action de DPPH.

- **Mode opératoire :**

L'évaluation de la capacité anti-oxydante est réalisée comme suit : 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.1 mM) a été mélangé avec 0.5 ml de l'extrait des feuilles. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes, Puis l'absorbance est mesurée à 515 nm par rapport un témoin composé de 1 ml de la solution de DPPH et de 0.5 ml de méthanol [1].

Les résultats exprimés en IC_{50} qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition $I\%$ en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC_{50} est petite, plus l'activité anti-oxydante des extraits est grande [1].

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Abs_{Control} - Abs_{Extrait}}{Abs_{Control}} * 100 \text{ équation (III.4)}$$

Où :

$Abs_{Control}$: Absorbance du control (ne contenant aucun anti-oxydant).

$Abs_{Extrait}$: Absorbance des extraits mesurés.

L'activité anti-radicalaire exprimée en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), la dose anti-radicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition. En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le %IC correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les %IC.

À partir de cette régression, nous avons déduit la valeur d'IC₅₀ correspondante.

III.5.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP) :

- **Principe :**

La méthode FRAP est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un anti-oxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) à la couleur bleue-vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme réactionnel de la réduction de fer est expliqué dans la figure suivante [1]:

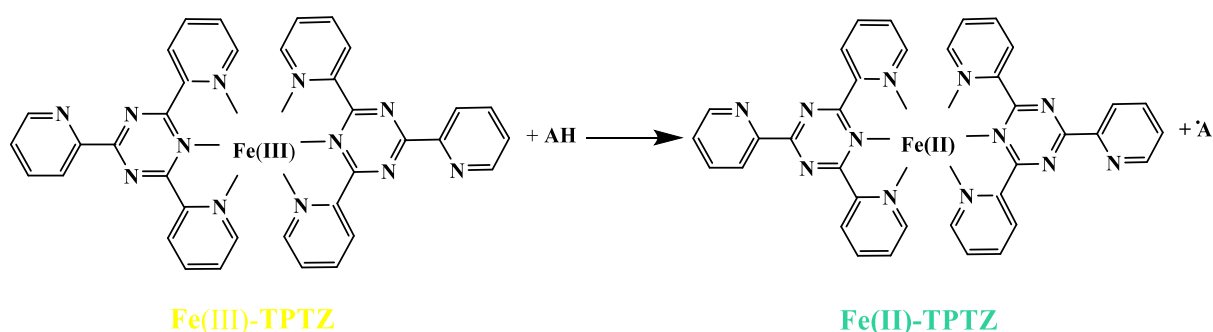


Figure III. 9: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un anti-oxydant (AH).

- **Mode opératoire :**

La détermination de la capacité anti-oxydante par la méthode du FRAP est réalisée comme suit : le réactif FRAP était fraîchement préparée par mélange de 25 ml d'une solution tampon d'acétate buffer (3 mM, pH 3.6), 2,5 ml de TPTZ (10 mM), 2,5 ml du chlorure ferrique (20mM) et 3 ml d'eau distillée. 30 μL des différents échantillons d'essai ont été ajoutés à 970 μL du FRAP réactif. L'absorbance a été lue à 593 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante contre une vierge [1]. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de FeSO_4 par gramme de matière sèche (mg E FeSO_4 /g MS).

- Courbe d'étalonnage du sulfate de fer :

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de ces courbes est FeSO_4 .

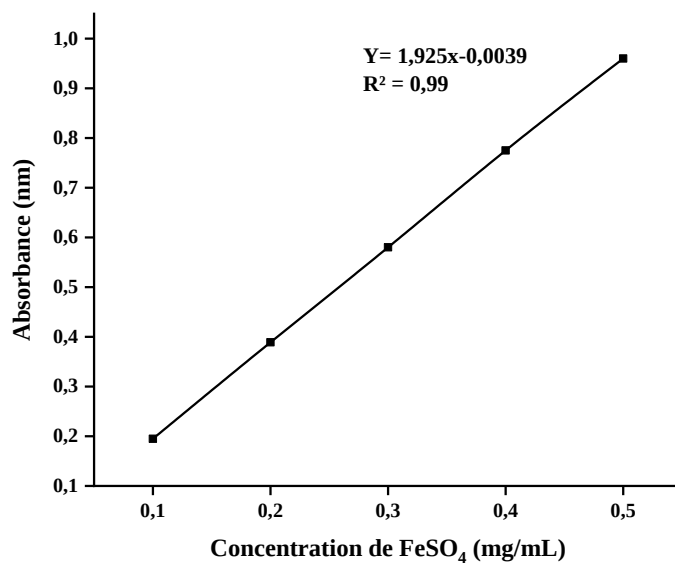


Figure III. 10: Courbe d'étalonnage pour le pouvoir réducteur de fer.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS



Chapitre IV : Résultats et discussions

La famille des polyphénols est devenue le point de départ de toutes les recherche scientifique en particulier la découverte des molécules naturelles à très forte activité antioxydante [38]. Notant que, les oxydants quelques soit leurs origines constituent un très grave problème non seulement au niveau de la santé publique mais aussi au niveau de l'industrie agro-alimentaire [84]. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et leurs capacités anti-oxydantes à partir des feuilles de *Moringa Oleifera*.

IV.1. L'humidité de la matière végétale :

Les résultats montrent que le taux d'humidité est 75.63% du poids total (Figure IV.1). Ce qui signifie que 24.37% représentent le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction des composés phénoliques.

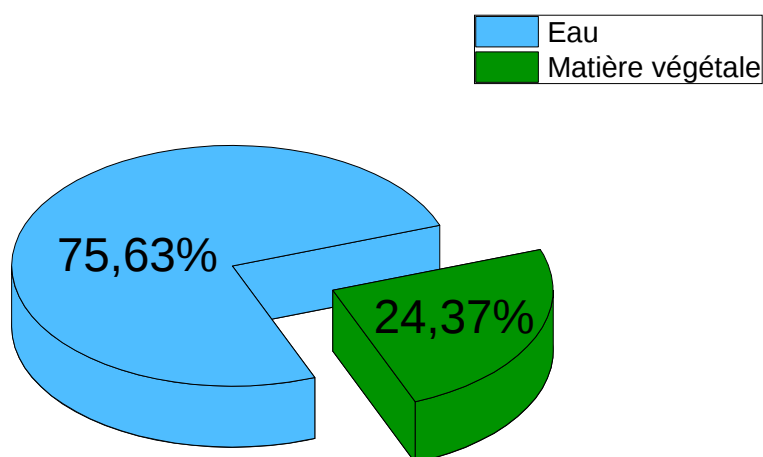


Figure IV. 1: Taux d'humidité de la matière végétale.

IV.2. Optimisation du rendement d'extrait brut

IV.2.1. Analyse de la surface de réponse d'extrait brut :

Plusieurs méthodes d'extraction conventionnelles ont été utilisées pour l'extraction des composés bioactifs, cependant, il y a des lacunes qui doivent être résolues. L'un des inconvénients est le temps d'extraction prolongé, ce qui entraîne une consommation élevée du temps et d'énergie. Les méthodes d'extraction conventionnelles rencontrent également une consommation élevée du solvant pour le processus d'extraction [85]. L'extraction assistée par

ultrasons (EAU) est une technique peu coûteuse, utilisable avec n'importe quel type de solvant et simple à mettre en place. En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultra-sons, ce qui par-ailleurs permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément [86]. Les figures (IV.2, IV.3 et IV.4) montrent l'effet de température d'extraction, temps d'extraction et rapport solvant/solide sur le rendement d'extraits bruts.

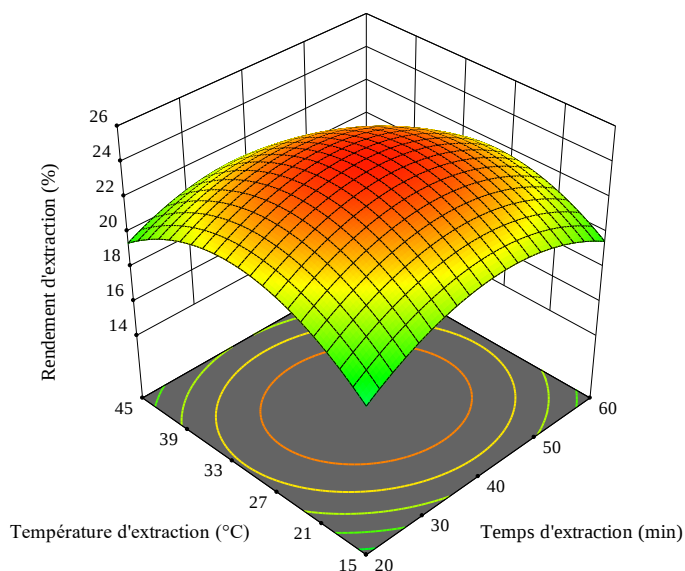


Figure IV. 2: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le rendement d'extrait brut.

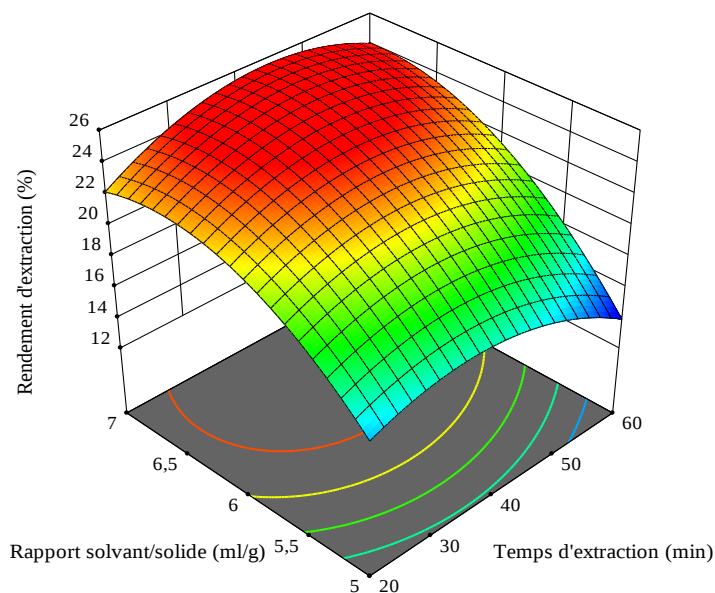


Figure IV. 3: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le rendement d'extrait brut.

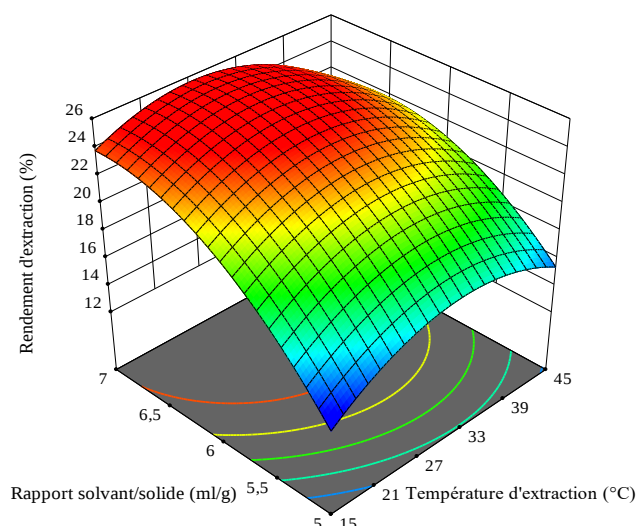


Figure IV. 4: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le rendement d'extrait brut.

Ces figures montrent les effets de deux facteurs sur la réponse du rendement d'extrait brut à la fois. Dans tous les figures présentés, le troisième facteur a été maintenu au niveau zéro. À partir des résultats expérimentaux obtenus, les quantités des extraits bruts au cours du processus d'extraction variaient de 14.27 à 24.53 %. L'augmentation de la température (X_1) de 15 à environ 33 °C conduit à une augmentation du rendement d'extraction, ensuite ce rendement a commencé à diminuer, comme indiquent les Figures IV.2 et IV.4. L'augmentation du rendement d'extraction est également proportionnelle à l'augmentation du rapport solvant / solide (X_3) de 5 ml / g à 7 ml / g, comme indiquent les figures IV.3 et IV.4. Le temps d'extraction (X_1) avait un effet significatif sur le rendement d'extraction environ de 20 à 45 min, ensuite ce rendement commence à diminuer comme montrent les figures IV.2 et IV.3. Plusieurs études ont montré que les E.A.U pourraient être utilisées comme une méthode efficace pour l'extraction des composés polyphénoliques à partir de matière végétal [87]. D'autres auteurs ont fait valoir que les effets mécaniques générés par les E.A.U modifient la morphologie des parois cellulaires et une surface plus poreuse est obtenue, facilitant ainsi l'extraction [76]. Ainsi, les composants à l'état libre migrent du matériau vers la solution. De plus, le traitement par ultrasons accélère le mouvement moléculaire de la solution et aide ainsi à combiner rapidement et efficacement les composants avec la solution [62]. Ultrason avec effet d'agitation mécanique, effet de cavitation et effet thermique peut améliorer le transport de masse et faciliter la libération de composés à partir des matériaux extraits. L'effet fort de cavitation des ondes ultrasonique accélère le processus de diffusion des composés bioactives dans le solvant d'extraction [88]. L'extraction par ultrasons raccourcit considérablement le temps nécessaire et économise de l'énergie. Par

conséquent, la méthode d'extraction assistée par ultrasons peut améliorer l'efficacité de l'extraction [89].

IV.2. 2. Montage du modèle du rendement d'extraits brut :

Les données obtenues à partir de Design Box-Behnken sont générées dans un modèle de fonction de réponse polynomiale du second ordre, qui prédit le rendement d'extrait brut des feuilles de *Moringa Oleifera*, exprimé par les variables codées (X_1 , X_2 et X_3) dans l'équation 1 :

$$Y = Y_0 - AX_1 + BX_2 - CX_3 + DX_1X_2 - E X_1X_3 - FX_2X_3 + GX_1^2 - HX_2^2 + IX_3^2$$

équation (IV.1)

Où

Y : est les rendements d'extrait brut des feuilles de *Moringa Oleifera*.

X_1 , X_2 et X_3 : sont les variables codées (Tableau III.2).

IV.2. 3. Analyse de la variance du modèle les rendements d'extraits brut :

L'ajustement de la fonction de réponse et des données expérimentales, la linéarité et l'effet quadratique des variables indépendantes, leurs interactions et les coefficients de régression sur les variables de réponse ont été évalués par analyse de variance (ANOVA) (Tableau IV. 1).

Tableau IV. 1: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour le rendement d'extrait brut.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F	valeur-P
Model	207,70	9	23,08	31,13	0,0007
Temps d'extraction	0,1568	1	0,1568	0,2115	0,6649
Température d'extraction	0,2888	1	0,2888	0,3896	0,5599
Rapport solvant/solide	127,84	1	127,84	172,47	< 0.0001
X_1X_2	1,30	1	1,30	1,75	0,2428
X_1X_3	4,33	1	4,33	5,84	0,0604
X_2X_3	4,58	1	4,58	6,18	0,0555
X_1^2	20,09	1	20,09	27,10	0,0035

X_2^2	31,32	1	31,32	42,25	0,0013
X_3^2	28,28	1	28,28	38,15	0,0016
R^2	98.25	-	-	-	-

Le modèle était très significatif en raison d'une valeur de probabilité très faible ($p = 0,0007$) comme indiqué par l'ANOVA des modèles de régression. Le coefficient de détermination (R^2) et la signification du manque d'ajustement ont été utilisés pour vérifier l'aptitude et l'adéquation de modèle. La valeur R^2 pour le modèle de régression du rendement d'extraits brut était de 98.25%, ce qui était très proche à 1. Cela suggérait que le modèle polynomial du second ordre prévu définissait bien le comportement réel du système. Selon les résultats d'analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour le rendement d'extrait brut (Tableau IV. 1), les facteurs étudiés peuvent être classés en fonction de leurs influences et de leurs importances comme suit : rapport solvant/solide ($p = 0.0001$), température d'extraction ($p = 0,5599$) et temps d'extraction ($p = 0,6649$).

IV.2.1.4. Validation du modèle de rendement d'extrait brut :

Les conditions optimales de rendement d'extrait brut obtenu à l'aide du modèle étaient les suivantes : temps d'extraction, 32 min ; température d'extraction, 30 °C ; et rapport solvant / solide 6.4 ml / g. Dans ces conditions, le modèle a prédit une réponse maximale de 24.93 %, pour optimiser et valider le modèle mathématique prédit, une nouvelle vérification expérimentale a été effectuée dans les mêmes conditions optimales, où la valeur résultante a été de 24.69 %.

Tableau IV. 2: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale d'extrait brut.

Les conditions optimales			Rendement d'extrait brut (%)	
Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Rapport solvant/solide (ml /g)	Expérimental	Prédite
32	30	6.4	24.69	24.93

Cela indique que le modèle est bien adapté pour extraire d'extrait brut des feuilles de *Moringa Oleifera* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

IV.3. Étude de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques :

Les tests en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux sont les deux méthodes qui ont été retenues pour détermination de la teneur en composés phénoliques des extraits de *Moringa Oleifera*. Le dosage a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à UV-Visible à double faisceaux de type SHIMADZU UV-1800 (Annexe I), la technique à double faisceaux permet d'éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats sont fiables, le dosage de chaque composé phénolique a été réalisé en trois essais, après on a calculé la moyenne des densités optique mesurées.

IV.3.1. Optimisation d'extraction des polyphénols totaux (PPT)

IV.3.1.1. Analyse de la surface de réponse des polyphénols totaux :

Les polyphénols sont des puissants antioxydants, bien que leurs action protectrice dépasse la modulation du stress oxydatif [90], ainsi, ils ont été utilisés comme compléments nutritionnels, additifs dans les aliments fonctionnels, produits pharmaceutiques pour prévenir les maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et certains types de cancers [62]. Dans ce contexte, l'impact de la méthode et les conditions d'extraction jouant un rôle important sur les composés extractibles et leurs activités biologiques associées [68]. Les figures (IV.5, IV.6 et IV.7) montrent l'effet de température d'extraction, temps d'extraction et rapport solvant / solide sur le rendement des polyphénols totaux.

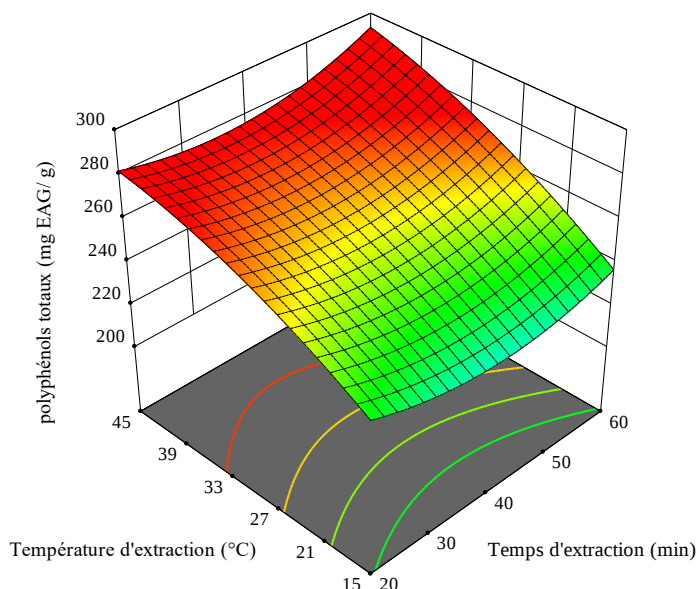


Figure IV. 5: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur les polyphénols totaux.

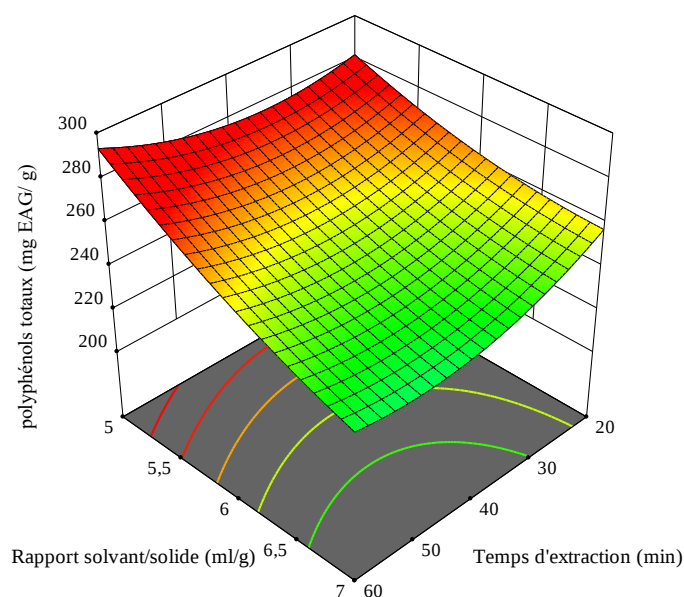


Figure IV. 6: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur les polyphénols totaux.

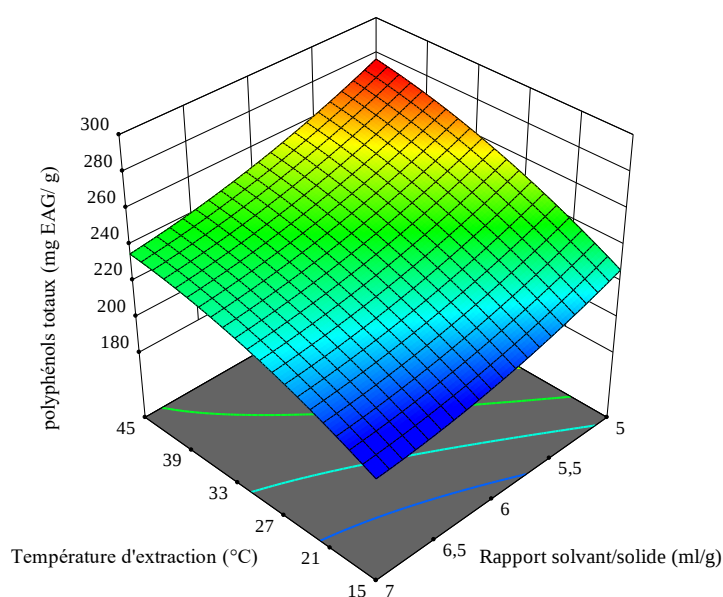


Figure IV. 7: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur les polyphénols totaux.

Ces figures montrent les effets de deux facteurs sur la réponse des polyphénols totaux à la fois. Dans tous les figures présentés, le troisième facteur a été maintenu au niveau zéro. À partir des résultats expérimentaux obtenus, les quantités des polyphénols totaux au cours du processus d'extraction variaient de 205.2 à 275.2 mg EAG/g. Figure IV.7 a indiqué que la température d'extraction (X_2) avait une influence plus significative que le rapport solvant/solide (X_3). L'augmentation du rendement des polyphénols est proportionnel avec élévation de la

température d'extraction (X_2) de 15 °C jusqu'à 45 °C et est diminué inversement proportionnel lorsque le rapport solvant/solide (X_3) augmentait d'environ de 5 à 7 ml/g. Le temps d'extraction (X_1) n'avait pas un effet significatif sur le rendement en polyphénols comme montrent les figures IV.5 et IV.6. La composition phénolique des extraits est conditionnée par le rapport liquide/solide, le temps d'extraction et la température d'extraction [19]. Le temps d'extraction est crucial pour minimiser l'énergie et le coût du processus d'extraction. [37] a expliqué que le processus d'extraction prolongé pouvait conduire à une oxydation phénolique due à l'exposition à la lumière ou à l'oxygène. D'après nos recherches et les données présentées dans les figures IV.5 et IV.6, il n'y a pas un effet significatif du temps d'extraction sur les polyphénols totaux. L'augmentation du temps d'extraction n'a pas amélioré les récupérations. Ceci pourrait s'expliquer par la deuxième loi de diffusion de Fick qui prédit un équilibre final entre les concentrations de soluté dans la matrice solide et dans la solution en vrac après un certain temps [91]. Par conséquent, un temps plus long n'est pas nécessaire pour extraire plus des composés phénoliques.

IV.3.1.2. Montage du modèle des polyphénols totaux :

Les données obtenues à partir de Design Box-Behnken sont générées dans un modèle de fonction de réponse polynomiale du second ordre, qui prédit le rendement en polyphénols totaux des feuilles de *Moringa Oleifera*, exprimé par les variables codées (X_1 , X_2 et X_3) dans l'équation 2 :

$$Y = Y_0 - AX_1 + BX_2 - CX_3 + DX_1X_2 - E X_1X_3 - FX_2X_3 + GX_1^2 - HX_2^2 + IX_3^2 \quad \text{équation (IV.2)}$$

Où

Y : est le rendement en polyphénols totaux des feuilles de *Moringa Oleifera*.

X_1 , X_2 et X_3 : sont les variables codées (Tableau III.2).

IV.3.1.3. Analyse de la variance du modèle des polyphénols totaux :

L'ajustement de la fonction de réponse et des données expérimentales, la linéarité et l'effet quadratique des variables indépendantes, leurs interactions et les coefficients de régression sur les variables de réponse ont été évalués par analyse de variance (ANOVA) (Tableau IV. 3).

Tableau IV. 3: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les polyphénols totaux.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F	valeur-P
Model	7538,94	9	837,66	15,19	0,0040
Temps d'extraction	270,28	1	270,28	4,90	0,0777
Température d'extraction	3801,92	1	3801,92	68,94	0,0004
Rapport solvant/solide	2397,78	1	2397,78	43,48	0,0012
X₁X₂	45,56	1	45,56	0,8262	0,4051
X₁X₃	262,44	1	262,44	4,76	0,0810
X₂X₃	34,22	1	34,22	0,6206	0,4665
X₁²	422,07	1	422,07	7,65	0,0395
X₂²	164,92	1	164,92	2,99	0,1443
X₃²	105,35	1	105,35	1,91	0,2255
R²	96.47	-	-	-	-

Le modèle était très significatif en raison d'une valeur de probabilité très faible ($p = 0,004$) comme indiqué par l'ANOVA des modèles de régression. Le coefficient de détermination (R^2) et la signification du manque d'ajustement ont été utilisés pour vérifier l'aptitude et l'adéquation de modèle. La valeur R^2 pour le modèle de régression du rendement des polyphénols totaux était de 96.47%, ce qui était très proche à 1. Cela suggérait que le modèle polynomial du second ordre prévu définissait bien le comportement réel du système. Selon les résultats de l'analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les polyphénols totaux (Tableau IV. 3), les facteurs étudiés peuvent être classés en fonction de leurs influences et de leurs importances comme suit : température d'extraction ($p = 0,0004$), rapport solvant/solide ($p = 0,0012$) et temps d'extraction ($p = 0,0777$).

IV.3.1.4. Validation du modèle des polyphénols totaux :

Les conditions optimales obtenues à l'aide du modèle étaient les suivantes : temps d'extraction, 20 min; température d'extraction, 42 °C et rapport solvant/solide, 5 ml/g. Dans ces conditions, le modèle a prédit une réponse maximale de 280,41 mg EAG/g, pour optimiser et

valider le modèle mathématique prédit, une nouvelle vérification expérimentale a été effectuée dans les mêmes conditions optimales, où la valeur résultante a été de 278,64 mg EAG /g.

Tableau IV. 4: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale des polyphénols totaux.

Les conditions optimales			Polyphénols Totaux (mg EAG/g)	
Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Rapport solvant/solide (ml /g)	Expérimental	Prédite
20	42	5	278.64	280.41

Cela indique que le modèle est bien adapté pour extraire les polyphénols totaux des feuilles de *Moringa Oleifera* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

IV.3.2. Optimisation d'extraction des flavonoïdes totaux (FVT)

IV.3.2.1. Analyse de la surface de réponse des flavonoïdes totaux :

Les flavonoïdes 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, les herbivores et les attaques microbiennes [20]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits, légumes, céréales, jus de fruits et thé..). Les figures (IV.8, IV.9 et IV.10) montrent l'effet de température d'extraction, temps d'extraction et rapport solvant/solide sur le rendement des flavonoïdes totaux.

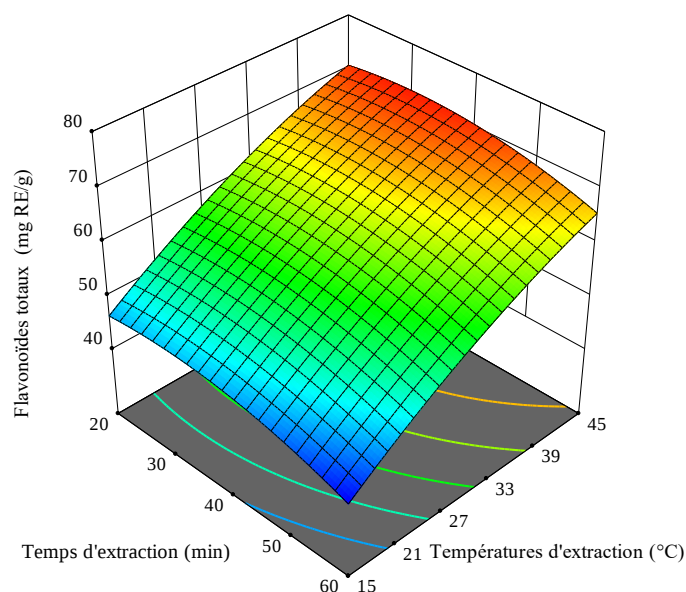


Figure IV. 8: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur les flavonoïdes totaux.

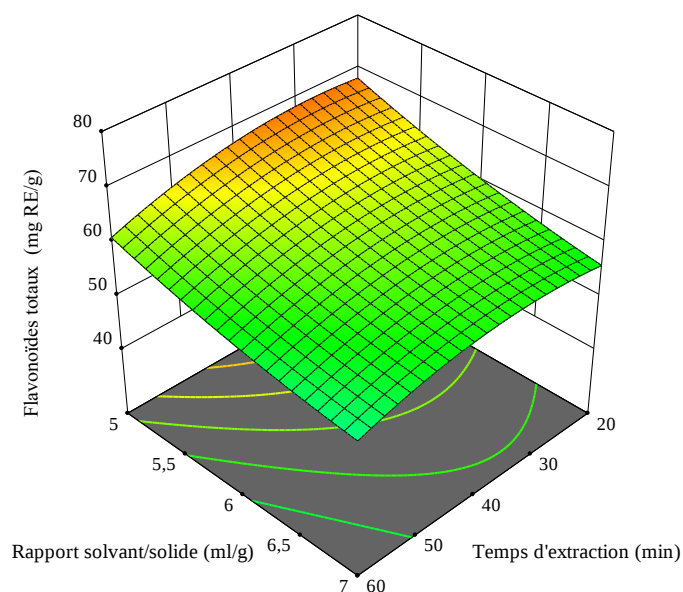


Figure IV. 9: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur les flavonoïdes totaux.

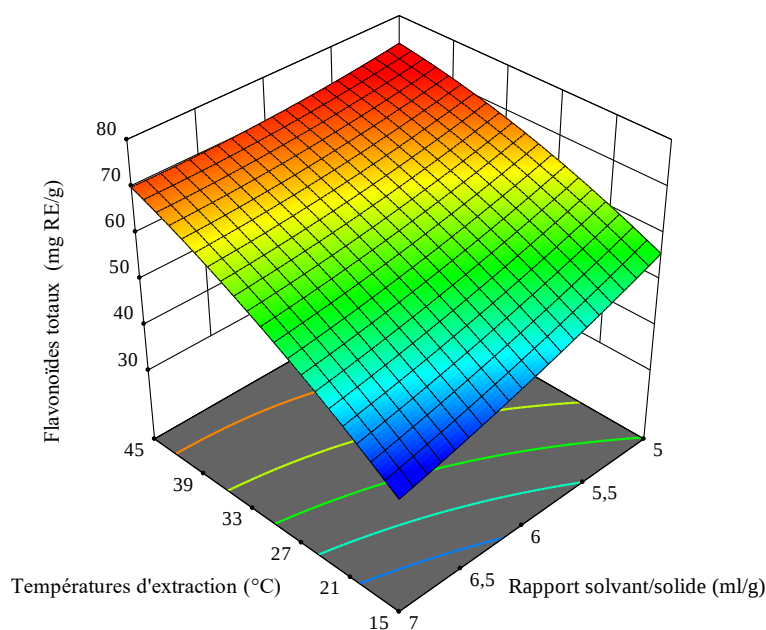


Figure IV. 10: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur les flavonoïdes totaux.

Ces figures montrent les effets de deux facteurs sur la réponse des flavonoïdes totaux à la fois. Dans tous les figures présentés, le troisième facteur a été maintenu au niveau zéro. À partir des résultats expérimentaux obtenus, les quantités des flavonoïdes totaux au cours du processus d'extraction variaient de 40.83 à 72.25 mg ER/g. Comme prévu, une augmentation plus importante du rendement en flavonoïdes totaux lorsque la température d'extraction (X_2) a été augmentée dans la plage de 15 à 45 °C, ce qui peut indiquer qu'une température d'extraction

de 45 °C (X_2) est nécessaire pour obtenir une augmentation maximale (Figures IV.8 et IV.10). De même, une augmentation du rendement en flavonoïdes totaux s'est produite lorsque le rapport solvant/solide (X_3) a été diminué dans la plage de 5 à 7 ml/g. La courbe du rapport solvant/solide ne s'est pas stabilisée à 5 ml/g, ce qui peut indiquer qu'il faut un peu du rapport solvant/solide pour atteindre l'augmentation maximale (Figures IV.9 et IV.10). La température d'extraction (X_2) et le rapport solvant/solide (X_3) utilisés ont tous deux eu un impact positif sur l'extraction des flavonoïdes totaux (Figures IV.8 et IV.9). À l'inverse, le temps d'extraction n'a pas eu d'effet appréciable sur l'extraction des flavonoïdes. La température d'extraction pourrait adoucir le tissu végétal et affaiblir les interactions phénol-protéine et phénol-polysaccharide, donc plus des flavonoïdes totaux migreraient dans le solvant [73]. Cela pourrait expliquer l'augmentation du rendement en flavonoïdes totaux lors de l'augmentation de la température d'extraction puisque les composés flavonoïdes sont généralement trouvés sous forme de glycosides [10]. Il est noté que l'augmentation de la température au-delà des certaines valeurs peut favoriser une éventuelle décomposition concomitante des composés phénoliques qui étaient déjà mobilisés à une température plus basse ou même la décomposition des composés phénoliques qui sont encore restés dans la matrice végétale, de plus, une température élevée peut favoriser perte de solvant par vaporisation et augmentation du coût du processus d'extraction du point de vue de l'industrialisation [92]. On peut dire que l'effet des facteurs d'extraction sur les polyphénols était le même que celui des facteurs d'extraction sur les flavonoïdes car les flavonoïdes sont l'un des groupes des polyphénols

IV.3.2.2. Montage du modèle les flavonoïdes totaux :

Les données obtenues à partir de Design Box-Behnken sont générées dans un modèle de fonction de réponse polynomiale du second ordre, qui prédit le rendement en flavonoïdes totaux des feuilles de *Moringa Oleifera*, exprimé par les variables codées (X_1 , X_2 et X_3) dans l'équation 3 :

$$Y = Y_0 - AX_1 + BX_2 - CX_3 + DX_1X_2 - E X_1X_3 - FX_2X_3 + GX_1^2 - HX_2^2 + IX_3^2$$

équation (IV.3)

Où

Y : est le rendement en flavonoïdes totaux des feuilles de *Moringa Oleifera*.

X_1 , X_2 et X_3 : sont les variables codées (Tableau III.2).

IV.3.2.3. Analyse de la variance des flavonoïdes totaux :

L'ajustement de la fonction de réponse et des données expérimentales, la linéarité et l'effet quadratique des variables indépendantes, leurs interactions et les coefficients de régression sur les variables de réponse ont été évalués par analyse de variance (ANOVA) (Tableau IV. 5).

Tableau IV. 5: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les flavonoïdes totaux.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F	valeur-p
Model	1588,79	9	176,53	25,13	0,0012
Temps d'extraction	56,45	1	56,45	8,04	0,0365
Température d'extraction	1206,88	1	1206,88	171,82	< 0.0001
Rapport solvant/solide	219,98	1	219,98	31,32	0,0025
X₁X₂	0,1024	1	0,1024	0,0146	0,9086
X₁X₃	2,81	1	2,81	0,3994	0,5552
X₂X₃	46,24	1	46,24	6,58	0,0503
X₁²	29,39	1	29,39	4,18	0,0962
X₂²	21,96	1	21,96	3,13	0,1373
X₃²	4,83	1	4,83	0,6877	0,4447
R²	97,84	-	-	-	-

Le modèle était très significatif en raison d'une valeur de probabilité très faible ($p = 0,004$) comme indiqué par l'ANOVA des modèles de régression. Le coefficient de détermination (R^2) et la signification du manque d'ajustement ont été utilisés pour vérifier l'aptitude et l'adéquation de modèle. La valeur R^2 pour le modèle de régression du rendement des flavonoïdes totaux était de 97,84%, ce qui était très proche à 1. Cela suggérait que le modèle polynomial du second ordre prévu définissait bien le comportement réel du système. Selon les résultats de l'analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour les flavonoïdes totaux (Tableau IV. 5), les facteurs étudiés peuvent être classés en fonction de leurs influences et de leurs importances comme suit : température d'extraction ($p < 0.0001$), rapport solvant/solide ($p = 0,0025$) et temps d'extraction ($p = 0,0365$).

IV.3.2.4. Validation de modèle des flavonoïdes totaux :

Les conditions optimales obtenues à l'aide du modèle étaient les suivantes : temps d'extraction, 23 min ; température d'extraction, 44 °C ; et rapport solvant/solide, 5.05 ml / g. Dans ces conditions, le modèle a prédit une réponse maximale de 74.34 mg RE/g, pour optimiser et valider le modèle mathématique prédit, une nouvelle vérification expérimentale a été effectuée dans les mêmes conditions optimales, où la valeur résultante a été de 72.65 mg RE/g.

Tableau IV. 6: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale des flavonoïdes totaux.

Les conditions optimales			Flavonoïdes totaux (mg RE/g)	
Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Rapport solvant/solide (ml /g)	Expérimental	Prédite
23	44	5.05	72.65	74.34

Cela indique que le modèle est bien adapté pour extraire les flavonoïdes totaux des feuilles de *Moringa Oleifera* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

IV.4. Étude de l'optimisation de l'activité anti-oxydante :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante in vitro par le piégeage des différents radicaux, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygène); TRAP (Total radical- trapping anti-oxidant parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique) ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH•. Parmi ces différentes méthodes, les tests DPPH et FRAP sont les deux méthodes qui ont été retenues pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits de *Moringa Oleifera* étudiée dans ce travail.

IV.4.1. Optimisation du piégeage du radical DPPH

IV.4.1.1. Analyse de la surface de réponse du piégeage du radical DPPH :

Une molécule anti-oxydante est une substance qui même à faible concentration peut entraver ou retarder l'oxydation d'un substrat et capable de réduire le radical stable DPPH [93]. IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% [78]. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. La concentration

de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations des extraits préparés [63]. Les figures (IV.11, IV.12 et IV.13) montrent l'effet de température d'extraction, temps d'extraction et rapport solvant/solide sur le piégeage du radical DPPH.

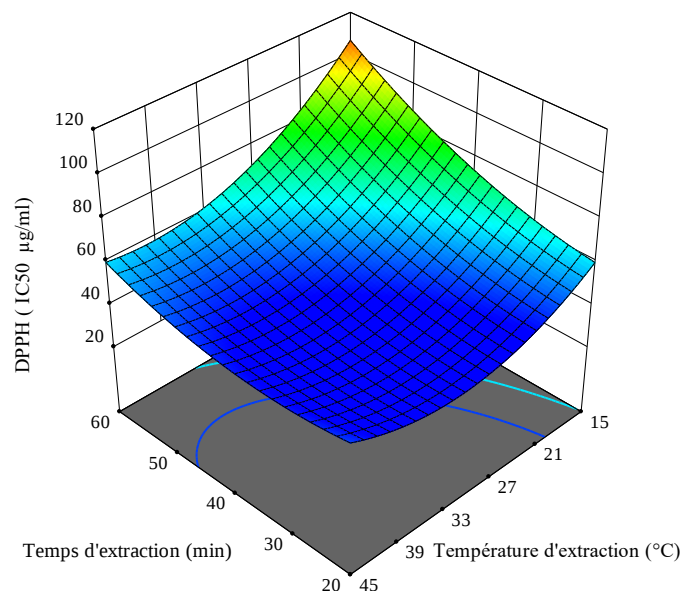


Figure IV. 11: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le piégeage du radical DPPH.

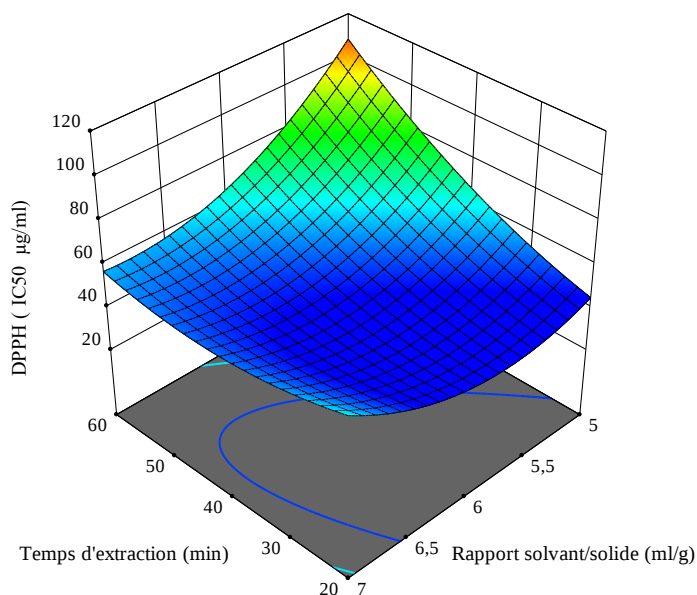


Figure IV. 12: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le piégeage du radical DPPH.

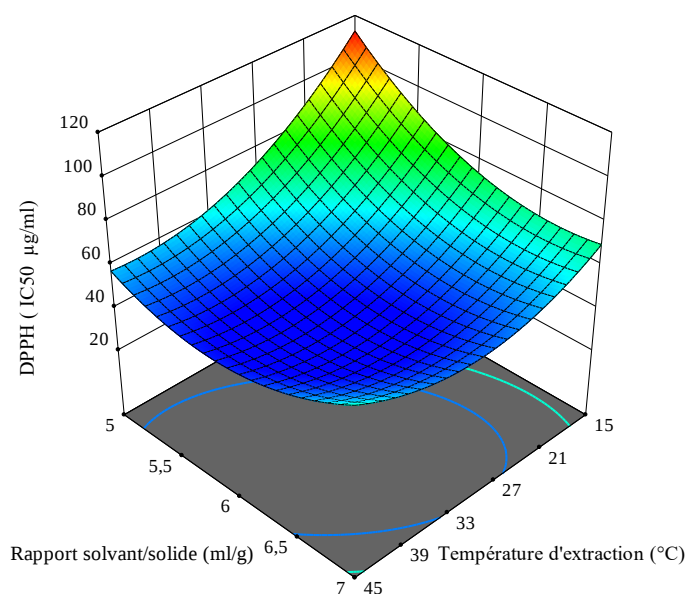


Figure IV. 13: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le piégeage du radical DPPH.

Ces figures montrent les effets de deux facteurs sur la réponse des valeurs IC_{50} à la fois. Dans tous les figures présentés, le troisième facteur a été maintenu au niveau zéro. À partir des résultats obtenus, les valeurs expérimentales d' IC_{50} au cours du processus d'extraction variaient de 45.05 à 114.64 $\mu g/ml$. Une diminution plus importante de la valeur IC_{50} lorsque la température d'extraction (X_2) a été augmentée dans la plage de 15 à 45 $^{\circ}C$, ce qui peut indiquer qu'une température d'extraction de 45 $^{\circ}C$ (X_2) est nécessaire pour obtenir une diminution maximale (Figures IV.11 et IV.13). De même, une diminution de la valeur IC_{50} s'est produite lorsque le temps d'extraction (X_1) a été diminué dans la plage de 20 à 60 min (Figures IV.11 et IV.12). La courbe du temps d'extraction s'est stabilisée à 20 min, ce qui peut indiquer qu'il n'est pas nécessaire de prolonger le temps d'extraction pour atteindre la diminution maximale. À l'inverse, le rapport solvant/solide (X_3) n'a pas un effet remarquable sur la valeur IC_{50} (Figures IV.12 et IV.13). D'après les résultats, nous notons qu'il y a une corrélation semi-proportionnelle entre la concentration de IC_{50} et la teneur en polyphénols et flavonoïdes. Ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante [94]. Les composés phénoliques sont des antioxydants puissants qui complètent et ajoutent aux fonctions des vitamines l'effet antioxydant ainsi qu'aux enzymes et cela en améliorant la défense contre le stress oxydatif causé par l'excès d'espèces réactives de l'oxygène [95]. Par contre pour l'activité antioxydante des extraits ne sont pas liée à la

présence des composés phénoliques [20]. La variance des résultats entre les composés phénoliques et leurs activités anti-oxydantes peuvent s'expliquer par le fait qu'il existe des autres éléments chimiques que les composés phénoliques qui ont une activité anti-oxydante [96].

IV.4.1.3. Montage du modèle de DPPH :

Les données obtenues à partir de Design Box-Behnken sont générées dans un modèle de fonction de réponse polynomiale du second ordre, qui prédit le rendement en le piégeage du radical DPPH (IC₅₀) des feuilles de *Moringa Oleifera*, exprimé par les variables codées (X₁, X₂ et X₃) dans l'équation 4 :

$$Y = Y_0 - AX_1 + BX_2 - CX_3 + DX_1X_2 - E X_1X_3 - FX_2X_3 + GX_1^2 - HX_2^2 + IX_3^2$$

équation (IV.4)

Où

Y : est le piégeage du radical DPPH (IC₅₀) des feuilles de *Moringa Oleifera*.

X₁, X₂ et X₃ : sont les variables codées (Tableau III.2).

IV.4.1.3. Analyse de la variance du modèle de DPPH :

L'ajustement de la fonction de réponse et des données expérimentales, la linéarité et l'effet quadratique des variables indépendantes, leurs interactions et les coefficients de régression sur les variables de réponse ont été évalués par analyse de variance (ANOVA) (Tableau IV.7).

Tableau IV. 7: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour DPPH.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F	valeur-P
Model	7927,86	9	880,87	109,31	< 0.0001
Temps d'extraction	1665,22	1	1665,22	206,64	< 0.0001
Température d'extraction	1658,59	1	1658,59	205,82	< 0.0001
Rapport solvant/solide	542,69	1	542,69	67,34	0,0004
X₁X₂	312,76	1	312,76	38,81	0,0016
X₁X₃	1181,64	1	1181,64	146,63	< 0.0001

X_2X_3	677,04	1	677,04	84,01	0,0003
X_1^2	227,38	1	227,38	28,22	0,0032
X_2^2	1013,17	1	1013,17	125,72	< 0.0001
X_3^2	897,98	1	897,98	111,43	0,0001
R^2	99,49	-	-	-	-

Le modèle était très significatif en raison d'une valeur de probabilité très faible ($p < 0.0001$) comme indiqué par l'ANOVA des modèles de régression. Le coefficient de détermination (R^2) et la signification du manque d'ajustement ont été utilisés pour vérifier l'aptitude et l'adéquation de modèle. La valeur R^2 pour le modèle de régression du piégeage du radical DPPH était de 99,49%, ce qui était très proche à 1. Cela suggérait que le modèle polynomial du second ordre prévu définissait bien le comportement réel du système. Selon les résultats de l'analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour DPPH (Tableau IV. 7), les facteurs étudiés peuvent être classés en fonction de leurs influences et de leurs importances comme suit : temps d'extraction ($p < 0.0001$), température d'extraction ($p < 0.0001$) et rapport solvant/solide ($p = 0,0004$).

IV.4.1.4. Validation de modèle de DPPH :

Les conditions optimales obtenues à l'aide du modèle étaient les suivantes : temps d'extraction, 41 min ; température d'extraction, 42 °C ; et rapport solvant/solide, 5.95 ml / g. Dans ces conditions, le modèle a prédit une réponse maximale de 44.76 µg/ml, pour optimiser et valider le modèle mathématique prédit, une nouvelle vérification expérimentale a été effectuée dans les mêmes conditions optimales, où la valeur résultante a été de 43.08 µg/ml.

Tableau IV. 8: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de DPPH.

Les conditions optimales			DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	
Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Rapport solvant/solide (ml /g)	Expérimental	Prédite
41	42	5.95	43.08	44.76

Cela indique que le modèle est bien adapté pour le piégeage du radical DPPH des feuilles de *Moringa Oleifera* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

IV.4.2. Optimisation le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

IV.4.2.1. Analyse de la surface de réponse du pouvoir réducteur de l'ion ferrique :

La réduction directe du complexe Fe^{+3} ferricyanure qu'est une méthode relativement rapide, simple et économique est utilisée pour le dépistage du pouvoir réducteur des extraits des plantes médicinales [78]. Le pouvoir réducteur d'un l'extrait, qui peut servir comme réflexion de son activité anti-oxydante, est déterminé en utilisant le test de réduction Fe^{+3} en Fe^{+2} , par lequel la couleur jaune de la solution d'essai change en couleur bleue-verte et cela selon la puissance réductrice de l'échantillon. La présence des anti-oxydants dans l'échantillon cause la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure en Fe^{2+} , Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm. L'absorbance la plus importante indique le pouvoir de réduction le plus grand [97]. Les figures (IV.14, IV.15 et IV.16) montrent l'effet de température d'extraction, temps d'extraction et rapport solvant/solide sur le rendement de pouvoir réducteur de l'ion ferrique.

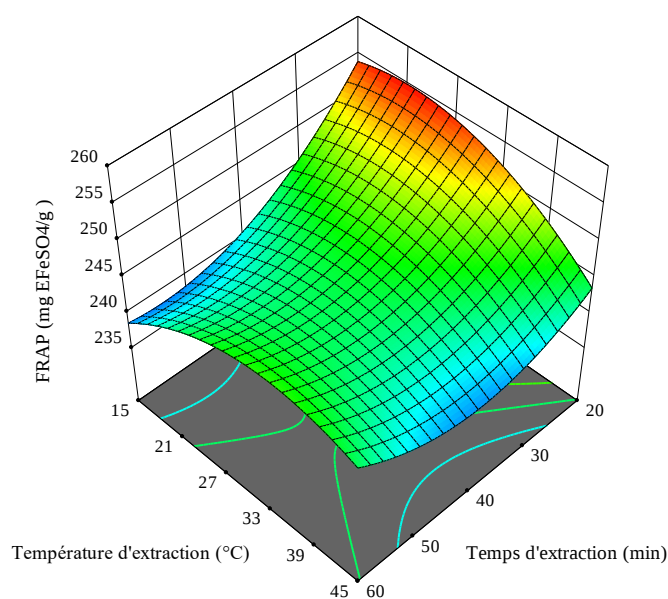


Figure IV. 14: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du temps d'extraction sur le FRAP.

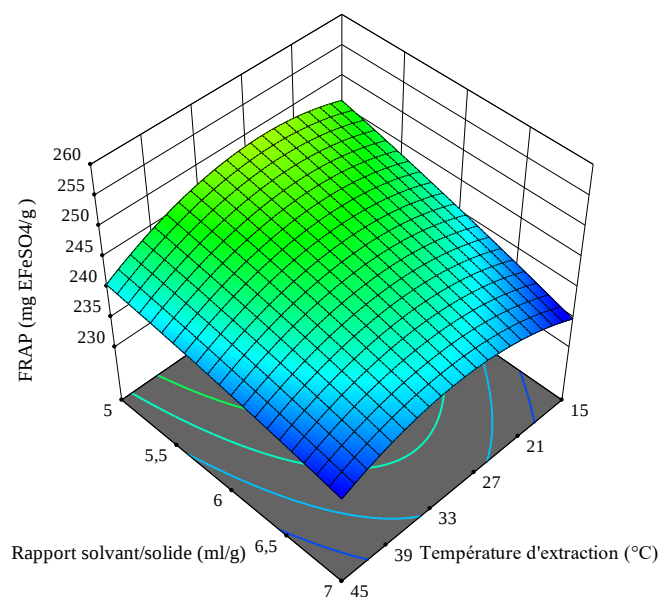


Figure IV. 15: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et du rapport solvant/solide sur le FRAP.

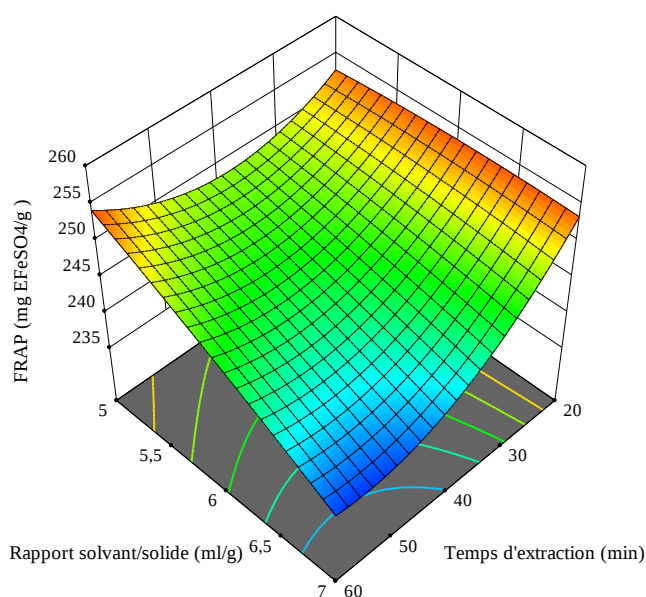


Figure IV. 16: Diagramme de surface de réponse montrant l'effet du rapport solvant/solide et du temps d'extraction sur le FRAP.

Ces figures montrent les effets de deux facteurs sur la réponse du pouvoir réducteur de l'ion ferrique à la fois. Dans tous les figures présentés, le troisième facteur a été maintenu au niveau zéro. À partir des résultats obtenus, les valeurs expérimentales du pouvoir réducteur de l'ion ferrique au cours du processus d'extraction variaient de 235.86 à 255.57 mg EFeSO₄/g. L'augmentation de la température (X_2) de 15 à environ 30 °C conduit à une augmentation du pouvoir réducteur de l'ion ferrique, ensuite ce pouvoir commence à diminuer, comme indiquent

les Figures IV.15 et IV.17. L'augmentation du pouvoir réducteur de l'ion ferrique est également proportionnelle à la diminution du rapport solvant/solide (X_3) de 5 ml/g à 7 ml/g, comme indiquent les figures IV.16 et IV.17. À l'inverse, le temps d'extraction (X_1) n'a pas eu d'effet appréciable sur le pouvoir réducteur de l'ion ferrique comme montrent les figures IV.15 et IV.16. La réduction du fer est une analyse de l'activité anti-oxydante rapide, reproductible et facile à exécuter. Le pouvoir réducteur de nos extraits est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons [1]. L'activité anti-oxydante attribuée aux polyphénols s'expliquent en partie par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux. En tant que bons donneurs d'électrons, ce type de composés montre la capacité réductrice sur la réduction de Fe^{+3} en Fe^{+2} [98].

IV.4.2.2. Montage du modèle de FRAP :

Les données obtenues à partir de Design Box-Behnken sont générées dans un modèle de fonction de réponse polynomiale du second ordre, qui prédit le pouvoir réducteur de l'ion ferrique des feuilles de *Moringa Oleifera*, exprimé par les variables codées (X_1 , X_2 et X_3) dans l'équation 5 :

$$Y = Y_0 - AX_1 + BX_2 - CX_3 + DX_1X_2 - E X_1X_3 - FX_2X_3 + GX_1^2 - HX_2^2 + IX_3^2$$

équation (IV.5)

Où

Y : est le rendement en flavonoïdes des feuilles de *Moringa Oleifera*.

X_1 , X_2 et X_3 : sont les variables codées (Tableau III.2).

IV.4.2.3. Analyse de la variance du modèle de FRAP :

L'ajustement de la fonction de réponse et des données expérimentales, la linéarité et l'effet quadratique des variables indépendantes, leurs interactions et les coefficients de régression sur les variables de réponse ont été évalués par analyse de variance (ANOVA) (Tableau IV. 9).

Tableau IV. 9: Analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour FRAP.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F	valeur-P
Model	609,42	9	67,71	29,39	0,0008
Temps d'extraction	118,66	1	118,66	51,51	0,0008
Température d'extraction	12,28	1	12,28	5,33	0,0690
Rapport solvant/solide	136,46	1	136,46	59,24	0,0006
X₁X₂	62,81	1	62,81	27,26	0,0034
X₁X₃	73,62	1	73,62	31,96	0,0024
X₂X₃	8,82	1	8,82	3,83	0,1077
X₁²	98,55	1	98,55	42,78	0,0013
X₂²	82,04	1	82,04	35,61	0,0019
X₃²	1,06	1	1,06	0,4609	0,5273
R²	98,15	-	-	-	-

Le modèle était très significatif en raison d'une valeur de probabilité très faible ($p = 0,0008$) comme indiqué par l'ANOVA des modèles de régression. Le coefficient de détermination (R^2) et la signification du manque d'ajustement ont été utilisés pour vérifier l'aptitude et l'adéquation de modèle. La valeur R^2 pour le modèle de régression du pouvoir réducteur de l'ion ferrique était de 96.47%, ce qui était très proche à 1. Cela suggérait que le modèle polynomial du second ordre prévu définissait bien le comportement réel du système. Selon les résultats de l'analyse de la variance du modèle quadratique de surface de réponse pour FRAP (Tableau IV. 9), les facteurs étudiés peuvent être classés en fonction de leurs influences et de leurs importances comme suit : rapport solvant/solide ($p = 0,0006$), temps d'extraction ($p = 0,0008$) et température d'extraction ($p = 0,0690$).

IV.4.2.4. Validation de modèle de FRAP :

Les conditions optimales obtenues à l'aide du modèle étaient les suivantes : temps d'extraction, 20 min ; température d'extraction, 20 °C ; et rapport solvant/solide, 5.18 ml/g. Dans ces conditions, le modèle a prédit une réponse maximale de 255.35 mg EFeSO₄/g, pour optimiser et valider le modèle mathématique prédit, une nouvelle vérification expérimentale a

été effectuée dans les mêmes conditions optimales, où la valeur résultante a été de 257.86 mg EFeSO₄/g.

Tableau IV. 10: Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de FRAP.

Les conditions optimales			FRAP (mg EFeSO ₄ /g)	
Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Rapport solvant/solide (ml/g)	Expérimental	Prédite
20	20	5.18	257.86	255.35

Cela indique que le modèle est bien adapté pour réduction de l'ion ferrique des feuilles de *Moringa Oleifera* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

CONCLUSION

GÉNÉRAL

Conclusion général

La famille des polyphénols renferme de nombreux composés d'intérêt nutritionnel et valorisables dans l'industrie alimentaire et la cosmétologie en raison de leurs propriétés réductrices (anti-oxydantes) et de leur capacité à interagir avec les ions métalliques et une grande variété de protéines.

Le présent travail de thèse consiste à déterminer les conditions optimales d'extraction pour maximiser le rendement en polyphénols et leurs capacités anti-oxydantes à partir des feuilles de *Moringa Oleifera*, en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le design Box-Behnken (BBD) et en utilisant de l'extraction assistée par ultrasons comme nouvelle technique.

À partir des expériences effectuées, les résultats des conditions optimales et des rendements maximaux dans cette étude sont présentés comme suit :

- Temps d'extraction 32 min ; Température d'extraction 30 ° C ; Rapport solvant / solide est de 6,4 ml /g pour obtenir un rendement de extrais brut atteint jusqu'à 24.69 %.
- Temps d'extraction 20 min ; Température d'extraction 42 ° C ; Rapport solvant / solide est de 5 ml /g pour obtenir un rendement maximale des polyphénols totaux atteint jusqu'à 278.64 mg EAG/g.
- Temps d'extraction 23 min ; Température d'extraction 44 °C ; Rapport solvant / solide est de 5.05 ml /g pour obtenir un rendement maximale des flavonoïdes totaux atteint jusqu'à 72.65 mg ER/g.
- Temps d'extraction 41 min ; Température d'extraction 42 °C ; Rapport solvant / solide est de 5.95 ml /g pour obtenir une valeur maximale du piégeage du radical DPPH atteint jusqu'à 43.08 µg/ml.
- Temps d'extraction 20 min ; Température d'extraction 20 °C ; Rapport solvant / solide est de 5.18 ml /g Pour obtenir une valeur maximale du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP) atteint jusqu'à 257.86 mg EFeSO₄/g.

Les valeurs de R^2 indique que les valeurs obtenus expérimentalement très proche aux valeurs prédites, a également suggéré que les modèles étaient très efficaces pour prédire des résultats optimaux.

En outre, ces résultats indiquent que l'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Moringa Oleifera*,

ces dernières peuvent être considérées comme source naturelle des composés phénoliques connus par leur bonne capacité anti-oxydante. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées : Elargir le panel des activités anti-oxydantes in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques: antibactérien, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIS



Références bibliographiques

- [1] **Sumner, J.** (2000). The natural history of medicinal plants. Timber press.
- [2] **Mradu, G., Saumyakanti, S., Sohini, M., & Arup, M.** (2012). HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 4(3), 162-167.
- [3] **Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., & Chen, N.** (2018). Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa Oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3), 343.
- [4] **Tragulpakseerojn, J., Yamaguchi, N., Pamonsinlapatham, P., Wetwitayaklung, P., Yoneyama, T., Ishikawa, N., & Apirakaramwong, A.** (2017). Anti-Proliferative Effect of *Moringa Oleifera* Lam (Moringaceae) Leaf Extract on Human Colon Cancer Hct116 Cell Line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2), 371-378.
- [5] **Masum, N. H. M., Hamid, K., Zulfiker, A. H. M., Hossain, M. K., & Urmi, K. F.** (2012). In Vitro Antioxidant Activities of Different Parts of the Plant *Moringa Oleifera* Lam. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 5(12), 1532-1537.
- [6] **Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H.** (2004). Antioxidant activity and phenolic compound of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157-2184.
- [7] **Omodanisi, E. I., Aboua, Y. G., & Oguntibeju, O. O.** (2017). Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules*, 22(4), 439.
- [8] **Malbert, Y.** (2014). Flavonoid Glucodiversification With Engineered Sucrose-Active Enzymes Thèse De Doctorat, L'université De Toulouse, Insa.
- [9] **Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., & Khodir, M.** (2015). Comparison of Microwave, Ultrasound and Accelerated-Assisted Solvent Extraction for Recovery of Polyphenols from *Citrus Sinensis* Peels. *Food Chemistry*, 187, 507-516.
- [10] **Bashi, D. S., Mortazavi, S. A., Rezaei, K., Rajaei, A., & Karimkhani, M. M.** (2012). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Yarrow (*Achillea Beibrestinii*) By Response Surface Methodology. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1005-1011.
- [11] **Bindes, M. M. M., Reis, M. H. M., Cardoso, V. L., & Boffito, D. C.** (2019).

- Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Green Tea Leaves and Clarification with Natural Coagulants (Chitosan and Moringa Oleífera Seeds). *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 111-119.
- [12] **Varo, M. A., Jacotet-Navarro, M., Serratosa, M. P., Mérida, J., Fabiano-Tixier, A. S., Bily, A., & Chemat, F.** (2019). Green Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds Determined By High Performance Liquid Chromatography from Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) Juice By-Products. *Waste and Biomass Valorization*, 10(7), 1945-1955.
- [13] **Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F.** (2010). Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols (Flavanone Glycosides) From Orange (*Citrus Sinensis* L.) Peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- [14] **Zhao, Z. Y., Zhang, Q., Li, Y. F., Dong, L. L., & Liu, S. L.** (2015). Optimization of Ultrasound Extraction of *Alisma Orientalis* Polysaccharides by Response Surface Methodology and Their Antioxidant Activities. *Carbohydrate Polymers*, 119, 101-109.
- [15] **Khanahmadi, M., Ghaffarzadegan, R., Khalighi-Sigaroodi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., & Hajiaghaee, R.** (2018). Optimization of the Glycyrrhizic Acid Extraction from Licorice by Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (Ijcce)*, 37(1), 121-129
- [16] **Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W.** (2013). Maximizing Total Phenolics, Total Flavonoids Contents And Antioxidant Activity Of *Moringa Oleifera* Leaf Extract By The Appropriate Extraction Method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
- [17] **Vengal Rao, P., Krishnamurthy, P. T., Dahapal, S. P., & Chinthamaneni, P. K.** (2018). An Updated Review on “Miracle Tree”: *Moringa Oleifera*. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(1), 101-108.
- [18] **Fahey, J. W.** (2015). *Moringa Oleifera*: A Review of the Medicinal Potential. In *I International Symposium on Moringa* 1158 (Pp. 209-224).
- [19] **Prabakaran, M., Kim, S. H., Sasireka, A., Chandrasekaran, M., & Chung, I. M.** (2018). Polyphenol Composition And Antimicrobial Activity Of Various Solvent Extracts From Different Plant Parts Of *Moringa Oleifera*. *Food Bioscience*, 26, 23-29.
- [20] **Castillo-Lopez, R. I., Leon-Felix, J., Angulo-Escalante, M. A., Gutierrez-Dorado, Muy-Rangel, M. D., & Heredia, J. B.** (2017). Nutritional And Phenolic Characterization Of *Moringa Oleifera* Leaves Grown In Sinaloa, Mexico. *Pakistan*

- Journal of Botany, 49(1), 161-168.
- [21] **Saini, R. K., Sivanesan, I., & Keum, Y. S.** (2016). Phytochemicals of *Moringa Oleifera*: A Review of Their Nutritional, Therapeutic and Industrial Significance. *3 Biotech*, 6(2), 203.
- [22] **Bichi, M. H.** (2013). A Review of the Applications of *Moringa Oleifera* Seeds Extract in Water Treatment. *Civil and Environmental Research*, 3(8), 1-10.
- [23] **Rajanandh, M. G., & Kavitha, J.** (2010). Quantitative estimation of β -sitosterol, total phenolic and flavonoid compounds in the leaves of *Moringa oleifera*. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1409-1414.
- [24] **Krishnaveni, J., & Ananthi, T.** (2011). Hepatoprotective Effect of *Moringa Oleifera* in Isoniazid Induced Rats. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 4(12), 1901-1903.
- [25] **Kholif, A. E., Gouda, G. A., Anele, U. Y., & Galyean, M. L.** (2018). Extract Of *Moringa Oleifera* Leaves Improves Feed Utilization Of Lactating Nubian Goats. *Small Ruminant Research*, 158, 69-75.
- [26] **Cui, C., Chen, S., Wang, X., Yuan, G., Jiang, F., Chen, X., & Wang, L.** (2019). Characterization of *Moringa Oleifera* Roots Polysaccharide Mrp-1 with Anti-Inflammatory Effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 844-851.
- [27] **Gao, X., Xie, Q., Liu, L., Kong, P., Sheng, J., & Xiang, H.** (2017). Metabolic Adaptation To The Aqueous Leaf Extract Of *Moringa Oleifera* Lam.-Supplemented Diet Is Related To The Modulation Of Gut Microbiota In Mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5115-5130.
- [28] **Mahfuz, S., & Piao, X. S.** (2019). Application of *Moringa* (*Moringa Oleifera*) As Natural Feed Supplement in Poultry Diets. *Animals*, 9(7), 431.
- [29] **Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L.** (2018). Nutritional And Medicinal Applications Of *Moringa Oleifera* Lam.—Review Of Current Status And Future Possibilities. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 1-11.
- [30] **Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S.** (2016). *Moringa Oleifera*: A Review on Nutritive Importance and Its Medicinal Application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49-56.
- [31] **Manjula, B., Hunasagi, R., & Shivalinge, G. K.** (2011). Anti-Obesity Activity Of Ethanolic Extract Of *Moringa Oleifera* Seeds In Experimental Animals. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*, 3(6), 318-328.

- [32] **Shamim, Q. M., Jitendra, P., Reddy, A. V., Safiullah, S., & Mohapatra, P.** (2010). Phytochemicals and Pharmacological Activities of Moringa Oleifera Lam. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*, 2(2), 183-186.
- [33] **Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F., & Asoodeh, A.** (2019). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Moringa Peregrina Oil With Response Surface Methodology and Comparison with Soxhlet Method. *Industrial Crops and Products*, 131, 106-116.
- [34] **Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., & Okada, M.** (2001). Coagulation Mechanism Of Salt Solution-Extracted Active Component In Moringa Oleifera Seeds. *Water Research*, 35(3), 830-834.
- [35] **Patel, S., Thakur, A. S., Chandy, A., & Manigauha, A.** (2010). Moringa Oleifera: A Review of There Medicinal and Economical Importance to the Health and Nation. *Drug Invention Today*, 2(7), 339–342.
- [36] **Karak, P.** (2019). Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.
- [37] **Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C.** (2018). Extraction and Characterization of Phenolic Content from Purple and Black Rice (*Oryza Sativa* L) Bran and Its Antioxidant Activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 332-345.
- [38] **Oboh, G., Nwanna, E. E., Oyeleye, S. I., Olasehinde, T. A., Ogunsuyi, O. B., & Boligon, A. A.** (2016). In Vitro Neuroprotective Potentials of Aqueous and Methanol Extracts from Heinsia Crinita Leaves. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 95-102.
- [39] **Cheaib, D., El Darra, N., Rajha, H. N., Maroun, R. G., & Louka, N.** (2018). Systematic And Empirical Study Of The Dependence Of Polyphenol Recovery From Apricot Pomace On Temperature And Solvent Concentration Levels. *The Scientific World Journal*, 2018.
- [40] **Al-Bukhaiti, W. Q., Noman, A., Mahdi, A. A., Ali, A. H., Abed, S. M., Rashed, M. M., & Wang, H.** (2019). Profiling Of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Cissus Rotundifolia* (Forssk.) As Influenced By Ultrasonic-Assisted Extraction Conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 634-647.
- [41] **Salah Eddine Laouini.** (2014). Etude Phytochimique Et Activité Biologique D ' Extrait De Des Feuilles De Phoenix Dactylifera L Dans La Région Du Sud D ' Algérie (La Région D ' Oued Souf). Thèse De Doctorat, Université Mohamed Khider Biskra.
- [42] **Madrau, M. A., Piscopo, A., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Poiana, M., Romeo,**

- F. V., & Piga, A.** (2009). Effect of Drying Temperature on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Apricots. *European Food Research and Technology*, 228(3), 441-448.
- [43] **Hamed, Y. S., Abdin, M., Akhtar, H. M. S., Chen, D., Wan, P., Chen, G., & Zeng, X.** (2019). Extraction, Purification By Macrospores Resin And In Vitro Antioxidant Activity Of Flavonoids From *Moringa Olifera* Leaves. *South African Journal of Botany*, 124, 270-279.
- [44] **Mahdi, A. A., Rashed, M. M., Al-Ansi, W., Ahmed, M. I., Obadi, M., Jiang, Q., & Wang, H.** (2019). Enhancing Bio-Recovery Of Bioactive Compounds Extracted From *Citrus Medica* L. Var. *Sarcodactylis*: Optimization Performance Of Integrated Of Pulsed-Ultrasonic/Microwave Technique. *Journal Of Food Measurement And Characterization*, 13(3), 1661-1673.
- [45] **Boubekri, C.** (2014). Etude De L'activité Antioxydante Des Polyphénols Extraits De *Solanum Melongena* Par Des Techniques Electrochimiques. Thèse De Doctorat, Université Mohamed Khider Biskra.
- [46] **D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R.** (2007). Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 348.
- [47] **Trabelsi, N., Falleh, H., Jallali, I., Daly, A. B., Hajlaoui, H., Smaoui, A., ... & Ksouri, R.** (2012). Variation Of Phenolic Composition And Biological Activities In *Limoniastrum Monopetalum* L. Organs. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 87-96.
- [48] **Benzie, I. F., & Strain, J. J.** (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (Frap) As A Measure of "Antioxidant Power": The Frap Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [49] **Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P.** (2005). Phenolic Profile And Antioxidant Activity Of The Algerian Ripe Date Palm Fruit (*Phoenix Dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411-420.
- [50] **Biglari, F., AlKarkhi, A. F., & Easa, A. M.** (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food chemistry*, 107(4), 1636-1641.
- [51] **Ref'at, A. A., Takruri, H. R., & Al-Sayyed, H.** (2008). Tannin Contents Of Selected Plants Used In Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 265–274.
- [52] **Allaith, A. A. A.** (2008). Antioxidant Activity Of Bahraini Date Palm (*Phoenix*

- Dactylifera L.) Fruit Of Various Cultivars. International Journal Of Food Science & Technology, 43(6), 1033-1040.
- [53] **Kashmiri, Z. N., & Mankar, S. A.** (2014). Free Radicals and Oxidative Stress in Bacteria. Int J Curr Microbiol App Sci, 3(9), 34-40.
- [54] **Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B.** (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia Officinalis* L.) Extracts. Food Technology and Biotechnology, 51(1), 84-91.
- [55] **Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G., & Zhao, M.** (2011). Ultrasound-Assited Extraction and Structural Identification of Polysaccharides from *Isodon Lophanthoides* Var. *Gerardianus* (Bentham) H. Hara. Carbohydrate Polymers, 85(3), 541-547.
- [56] **Bouchouka, E.** (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat, Université BADJI MOKHTAR–ANNABA. ALGERIA.
- [57] **Cigeroglu, Z., Kirbaslar, S. I., Sahin, S., & Koprucu, G.** (2017). Optimization and Kinetic Studies of Ultrasound-Assisted Extraction on Polyphenols from Satsuma Mandarin (*Citrus Unshiu* Marc.) Leaves. Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition, 36(5), 163-171.
- [58] **Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G.** (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition, 18(10), 872-879.
- [59] **Stohs, S. J., & Hartman, M. J.** (2015). Review of the Safety and Efficacy of *Moringa Oleifera*. Phytotherapy Research, 29(6), 796-804.
- [60] **Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L.** (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30(1), 11-26.
- [61] **Kalpana, V. N., Payel, C., & Rajeswari, V. D.** (2017). *Lagenaria Siceraria* Aided Green Synthesis of ZnO Nps: Anti-Dandruff, Anti-Microbial and Anti-Arthritic Activity. Research Journal of Chemistry and Environment, 21(11), 14-19.
- [62] **Vega, A. J. D., Hector, R. E., Jose, L. G. J., Paola, H. C., Raúl, A. S., & Enrique, O. V. C.** (2017). Effect of Solvents and Extraction Methods on Total Anthocyanins, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Renealmia Alpina* (Rottb.) Maas Peel. Czech Journal of Food Sciences, 35(5), 456-465.
- [63] **Bilal, G. M.** (2016). Composition Chimique, Activité Antimicrobienne Et Antioxydante

- De Trois Plantes Aromatiques. Thèse De Doctorat, Université Kasdi Merbah–Ouargla.
- [64] **Goleij, M., & Fakhraee, H.** (2017). Response Surface Methodology Optimization of Cobalt (Ii) and Lead (Ii) Removal from Aqueous Solution Using Mwcnt-Fe₃O₄ Nanocomposite. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (Ijccce)*, 36(5), 129-141.
- [65] **Nuapia, Y., Cukrowska, E., Tutu, H., & Chimuka, L.** (2020). Statistical Comparison of Two Modeling Methods on Pressurized Hot Water Extraction of Vitamin C And Phenolic Compounds From Moringa Oleifera Leaves. *South African Journal of Botany*, 129, 9-16.
- [66] **Ashrini, B. S., & Varalakshmi, K. N.** (2019). Statistical Optimization of Media Components by Taguchi Design and Response Surface Methodology for Enhanced Production of Anticancer Metabolite by *Penicillium* Sp. *Jufp2. Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(2), 463-471.
- [67] **Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X.** (2008). Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.
- [68] **Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S.** (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction (Uae) Of Phenolics and Antioxidant Compounds from Rhizomes of *Rheum Moorcroftianum* Using Response Surface Methodology (Rsm). *Industrial Crops and Products*, 119, 218-225.
- [69] **Aybastier, Ö. Işık, E., Sahin, S., & Demir, C.** (2013). Optimization Of Ultrasonic-Assisted Extraction Of Antioxidant Compounds From Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.
- [70] **Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q.** (2013). Optimisation of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Sparganii Rhizoma* with Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846-854.
- [71] **Benkerrou, F., Amrane, M., & Louaileche, H.** (2018). Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Phenolic Contents from *Phoenix Dactylifera* and Evaluation of Antioxidant Activity: Statistical Optimization of Extraction Process Parameters. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1910-1916.
- [72] **Benarima, A., Laouini, S. E., Seghir, B. B., Belaiche, Y., Ridha Ouahrani,** (2020). Optimization Of Ultrasonic-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds From *Moringa Oleifera* Leaves Using Response Surface Methodology. *Asian Journal of Research in*

- Chemistry, 13(5), 307-311.
- [73] **Wang, J., Zhao, Y. M., Guo, C. Y., Zhang, S. M., Liu, C. L., Zhang, D. S., & Bai, X. M.** (2012). Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Inula Helenium*. *Pharmacognosy Magazine*, 8(30), 166.
 - [74] **Xiao, S., Zhang, Y., Xie, J., & Wen, Z.** (2018). Ultrasonic-Assisted Extraction of Squalene and Vitamin E Based Oil from *Zizyphi Spinosae Semen* and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2844-2854.
 - [75] **Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z.** (2007). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins in Red Raspberries and Identification of Anthocyanins in Extract Using High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767-778.
 - [76] **Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M. R., Khalajzadeh, S., & Ghasemi, E.** (2019). Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Fatty Acids from *Aesculus Hippocastanum* Fruit By Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 271, 762-766
 - [77] **Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C.** (2012). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (*Origanum Majorana* L.) Using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582-590.
 - [78] **Xu, Y. B., Chen, G. L., & Guo, M. Q.** (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa Oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants*, 8(8), 296.
 - [79] **Clark, B. J., Frost, T., & Russell, M. A. (Eds.).** (1993). *Uv Spectroscopy: Techniques, Instrumentation And Data Handling* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
 - [80] **Lagnika, L.** (2005). *Etude Phytochimique Et Activité Biologique De Substances Naturelles Isolées De Plantes Béninoises*. Thèse De Doctorat, Strasbourg.
 - [81] **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lwt-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
 - [82] **Sánchez-Moreno, C.** (2002). Methods Used To Evaluate The Free Radical Scavenging Activity In Foods And Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.

- [83] **Guelcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R.** (2004). Antioxidant Activity Of Saponins Isolated From Ivy: Alpha-Hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E And Hederacolchiside-F. *Planta Medica*, 70(6), 561-563.
- [84] **Rakotosamimanana, V. R.** (2014). Etude Des Pratiques Et Croyances Alimentaires Pour Comprendre La Malnutrition A Madagascar: Intérêt De L'introduction De Feuilles De Moringa Oliefara. Thèse De Doctorat.
- [85] **Rodríguez- Pérez, C., Gilbert- López, B., Mendiola, J. A., Quirantes- Piné, R., Segura- Carretero, A., & Ibáñez, E.** (2016). Optimization Of Microwave- Assisted Extraction And Pressurized Liquid Extraction Of Phenolic Compounds From Moringa Oleifera Leaves By Multiresponse Surface Methodology. *Electrophoresis*, 37(13), 1938-1946.
- [86] **Chen, X., Wang, W., Li, S., Xue, J., Fan, L., Sheng, Z., & Chen, Y.** (2010). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Lingzhi Polysaccharides Using Response Surface Methodology and Its Inhibitory Effect on Cervical Cancer Cells. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 944-948.
- [87] **Cui, C., Chen, S., Wang, X., Yuan, G., Jiang, F., Chen, X., & Wang, L.** (2019). Characterization of Moringa Oleifera Roots Polysaccharide Mrp-1 with Anti-Inflammatory Effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 844-851.
- [88] **Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J.** (2012). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction (Uae) Of Flavonoids Compounds (Fc) From Hawthorn Seed (Hs). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490.
- [89] **Raza, A., Li, F., Xu, X., & Tang, J.** (2017). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Polysaccharides from the Stem of Trapa Quadrispinosa Using Response Surface Methodology. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 94, 335-344.
- [90] **Chouana, T., Pierre, G., Vial, C., Gardarin, C., Wadouachi, A., Cailleu, D., ... & Delattre, C.** (2017). Structural Characterization and Rheological Properties of a Galactomannan from Astragalus Gombo Bunge Seeds Harvested In Algerian Sahara. *Carbohydrate Polymers*, 175, 387-394.
- [91] **Panchal, B., Deshmukh, S., & Sharma, M.** (2014). Optimization of Oil Extraction and Characterization from Tamarindus Indica Linn Seed Oil. *International Journal of Oil, Gas and Coal Engineering*, 2(1), 1.
- [92] **Mokrani, A., & Madani, K.** (2016). Effect of Solvent, Time and Temperature on the

- Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Peach (*Prunus Persica* L.) Fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76
- [93] **Shahwar, D., & Raza, M. A.** (2012). Antioxidant Potential Of Phenolic Extracts Of *Mimusops Elengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(7), 547-550.
- [94] **Mokrani, A., & Madani, K.** (2016). Effect of Solvent, Time and Temperature on the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Peach (*Prunus Persica* L.) Fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76
- [95] **Mohamed, A. A., Ali, S. I., Sameeh, M. Y., & El-Razik, T. M. A.** (2016). Effect of Solvents Extraction on Hplc Profile of Phenolic Compounds, Antioxidant and Anticoagulant Properties of *Origanum Vulgare*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(11), 2009-2016.
- [96] **Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F.** (2005). Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 93(1), 47-56.
- [97] **Muanda, F. N.** (2010). Identification De Polyphénols, Evaluation De Leur Activité Antioxydante Et Etude De Leurs Propriétés Biologiques. Thèse De Doctorat En Chimie Organique. Ecole Doctorale Sesames Université Paul Verlaine-Metz,
- [98] **Guemari, F., Laouini, S. E., Rebiai, A., & Bouafia, A.** (2020). Phytochemical Screening And Identification Of Polyphenols, Evaluation Of Antioxidant Activity And Study Of Biological Properties Of Extract *Silybum Marianum* (L.). *Asian Journal Of Research In Chemistry*, 13(3), 190-197.

ANNEXES



Annexes

Annexe I

les appareils utilisés

ULTRASONIQUE-H 3000869

Fonctionnalités

Conteneur à double corps, entièrement en acier inoxydable et avec dispositif de vidange.

Panneau de Configuration

Interrupteur principal éclairé.

Bouton poussoir marche-arrêt.

Augmentez / diminuez le bouton-poussoir de temps en minutes (de 0 'à 60').

Augmenter / diminuer le bouton-poussoir de température en °C.



Spectrophotomètre ultraviolet visible : UV-1800

Nom du produit : spectrophotomètre ultraviolet visible

Nom du modèle : UV-1800

Fabricant : Shimadzu Corporation analytical & Measuring Instruments Division

Résolution : < 1 nm sur toute la gamme (1100-190 nm)

Précision garantie : ± 0.1 nm

Bande passante fixe : 1 nm

Lumière parasite : < 0,02% NaI à 220 nm

Dimension : L : 450 mm, P : 490 mm, H : 270 mm



Annexe II

Les logiciels utilisés

ChemDraw Professional 16.0

ChemDraw s'est imposé depuis longtemps comme la référence des logiciels de dessin de structures moléculaires. Afin de proposer à chaque utilisateur l'outil adapté à ses besoins, le logiciel existe maintenant en trois versions : ChemDraw Prime, ChemDraw Professional et ChemOffice Professional. Cette déclinaison permet de satisfaire les besoins de tous les chercheurs, étudiants et professeurs impliqués dans la chimie et les domaines connexes.



Design Expert 12

Design-Expert vous offre les dernières techniques d'analyse de données multivariées et de plans d'expériences, vous permettant ainsi de réduire votre nombre d'expériences, et donc le temps et le coût de développement de vos produits tout en vous assurant les meilleurs process. Il contient également des techniques d'analyse de données multi-variées poussées, de fonctions d'optimisation élaborées et d'outils de visualisation sophistiqués (2D, 3D, rotations).



COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

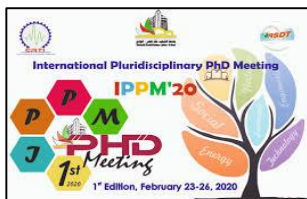


Communications et Publications

Communications Internationales



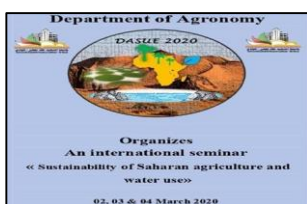
Benarima Abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Optimization of ultrasound-assisted extraction from Moringa Oleifera seeds using response surface methodology', 30^{ème} Congrès international de l'ATSB 25-28 Mars 2019, Sousse Tunisie.



Benarima Abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavanols from Moringa Oleifera leaves', International Pluridisciplinary PhD Meeting (IPPM'20) 23-26 Février 2020, El-Oued, Algérie.



Benarima Abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Determine the optimal conditions for extraction phenolic compounds from Moringa Oleifera Leaves using response surface methodology' international seminar on green chemistry and sustainable engineering (ISGCSE) 17-18 Déc. 2019, El-Oued, Algérie.



Benarima Abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Effect of temperature on extraction phenolic compounds and their antioxidant activity from Moringa Oleifera Leaves' International conference of sustainability of Saharan agriculture and water use (SSAWU) 2-3 Mars 2020, El-Oued, Algérie.

Communications Nationales



Benarima abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Optimization of ultrasound-assisted extraction from Moringa Oleifera Leaves using response surface methodology', 1^{er} séminaire national sur la biodiversité et la valorisation des produits biologiques dans les régions arides et semi-arides, 06-07 Mars 2019, El-Oued, Algérie.



Benarima abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Optimisation de l'extraction assistée par ultrason de flavanols de feuilles de Moringa Oleifera à l'aide de la méthodologie de surface de réponse', Le Séminaire National sur la biodiversité dans les parcours Steppiques dégradés (SNBS), 28-29 Octobre 2019, Tébessa, Algérie.



Benarima abdelhakim, laouini Salaheddine, 'Determine the optimal conditions for extraction flavanols from Moringa Oleifera Leaves using response surface methodology' 1^{er} séminaire national : L'apport des biotechnologies sur la protection de l'environnement 15-16 Déc 2019, M'sila, Algérie.

Publications Scientifiques Internationales



Abdelhakim Benarima, Salah Eddine Laouini, Bachir Ben Seghir, Yassine Belaiche, Mohammed Ridha Ouahrani. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Moringa Oleifera Leaves using Response Surface Methodology. *Asian J. Research Chem.* 2020 ; 13(5) :307-311.