

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Mouloud Mammeri

Faculté de Médecine Tizi-Ouzou

Département de Pharmacie

N° D'ORDRE :



جامعة مولود معمري

كلية الطب تيزي وزو

قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

**Optimisation d'un procédé d'extraction des
composés polyphénoliques à partir des racines de
Carthamus caeruleus L**

Réalisé par :

- M. BOUMGHAR Mayas
- M. HAICHEUR Mohamed Amine
- M. BOUSSA Oussama
- M. KHOUDI Walid

Encadré par : Dr **BOURSOUTI** Mourad

Co-encadré par : Dr **ABDENNOURI** Abdelhamid

Membres de Jury :

Pr MAMOU.M

MCAHU

UMMTO

Président de jury

Dr BENSISAID.H

MAHU

UMMTO

Examineur

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Ce long parcours a été une magnifique expérience pleine de défis, d'objectifs, de satisfaction et de fierté. Par ces quelques mots, nous voulons témoigner notre gratitude et notre reconnaissance envers celles et ceux qui nous ont accompagné durant ces années.

Avant tout, nous tenons à remercier « Allah » le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir ouvert les portes du savoir, donné la volanté, la force, le courage et la patience, pour mener à terme notre travail.

Nous tenons d'abord à remercier notre encadreur Dr BOURSOUTI Mourad. Merci d'avoir supervisé ce travail. Merci pour ton encadrement, pour ta patience, pour ta confiance, pour ta présence et pour ton soutien. Merci de nous avoir fait confiance, cru en nous et en ce projet.

Nous voulons également remercier, notre Co-encadreur Dr ABDENNOURI Abdelhamid. Merci d'avoir été toujours présent. Merci pour ton écoute, tes précieux conseils, tes remarques et tes critiques constructives qui ont été très bénéfiques et qui nous ont orienté et aidé tout au long de ce parcours. Tu nous as accompagné durant les moments de joie et tu nous as épaulé et soutenu durant les moments les plus difficiles. Merci de nous avoir redonné confiance dans les moments de doute. Ton expertise, tes conseils judicieux et ton encadrement rigoureux ont été d'un grand apport dans la concrétisation de ce travail. Nous te serons toujours reconnaissants !

La réalisation de ce projet nous a permis de rencontrer nos collègues du laboratoire de Chimie Analytique. Merci à tous ceux qui ont pris part à ce que notre pratique soit réalisable. Merci pour votre présence et vos commentaires lors de notre pratique ainsi que pour votre soutien moral et vos encouragements à divers moments au cours de ces quatre derniers mois. Ce fut un plaisir pour nous de vous côtoyer et de partager avec vous de beaux moments au laboratoire.

C'est avec chaleur et sincérité que je remercie professeur MAMOU et docteur BENSISAID pour nous avoir fait l'honneur de faire part des membres du jury. Merci au temps que vous avez consacré à la lecture et à l'évaluation de notre travail, soyez en assuré de toute notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

Nos vifs remerciements s'adressent également à nos enseignants du département de pharmacie qui, durant ces années, nous ont gratifié de leur riche enseignement et ont contribué à enrichir nos cercles de connaissance. Merci avant tout d'avoir contribué à notre formation.

Dédicace

Je remercie le seigneur Allah, le très-Savant, de m'avoir donné la force et prodiguer le savoir pour atteindre mes objectifs

Pour ces derniers moments et après 6 ans d'étude passées dans la faculté de médecine. Une page se tourne mais cette étape de mon parcours académique restera toujours comme une très belle période de ma vie. Ce changement de cap, même s'il est voulu et stimulant, me remplit d'émotions au moment d'écrire ce message.

Par ces quelques mots je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance sans failles à mes très chères parents et ma petite sœur, qui, plus que quiconque dans ce monde souhaitent me voir réussir et arriver à ce moment.

Je ne sais point comment vous rendre le trésor de sollicitude et d'affection manifesté que vous m'avez apporté pour me soutenir dans ces moments difficiles que j'ai traversés. Votre attention et votre disponibilité ont été d'une aide précieuse pour moi.

Merci pour m'avoir encouragé et soutenue tout au long de ce travail mais également de m'avoir donné tout au long de ma vie les outils me permettant de prétendre maintenant au grade de Docteur. Cette réalisation est en grande partie possible grâce à vous et je suis heureux que vos inquiétudes n'étaient pas en vains.

Que ce sincère message de remerciement vous dise combien je vous suis reconnaissant et combien vous êtes placés haut sur l'échelle de mon estime personnelle. Vous étiez et vous resterez toujours une source d'inspiration pour moi.

Enfin, j'adresse à travers ces mots mon remerciement à toute personne ayant participé à l'achèvement de ce travail dont mes chères amis et camarades de travail : Amine, Oussama et Walid. Mais aussi à toute autre personne m'ayant aidé à terminer ce parcours, que ce soit avec une action, une prière ou un mot d'encouragement.

MAYAS

Dédicace

Au nom de grand **dieu** « **Allah** » tout puissant, J'ai l'honneur et le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A mes très chers parents, mon père

Que dieu lui fasse miséricorde.

A ma mère,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. J'ai l'honneur et le plaisir d'être votre fils.

A mes chers frères Yacine et Anis.

A mes amis Mayas, Amine et Cussama,

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, c'était un grand plaisir de partager ce travail avec vous.

A ma famille,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués. Merci d'être toujours là pour moi.

WALID

Dédicace

Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux louange à **ALLAH** le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail,

A mes très chers parents,

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point vous remercier comme il se doit. Votre affection me couvre, votre bienveillance me guide, vos sacrifices, vos prières et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Mon profond respect, ma gratitude, ma reconnaissance, et mes sincères remerciements sont infinis pour vous.

A mes très chères sœurs Djahida et Lamia,

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant mes années d'études. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A mes frères Mahrez et Amine,

Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et réussite.

Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A ma deuxième mère Leila et sa fille Rayane

Je vous remercie pour votre soutien, vos conseils, vos encouragements. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, santé et succès. Merci de faire partie de ma vie.

A mes chers confrères Sidali, Abdelghani, Slimane, Yova, Chemsou et Nabil,

A mes chers quadrinômes Mayas, Mohamed amine et Walid,

Je vous remercie pour tous.

A toute ma famille,

A tous mes chers amis,

A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu ou encouragé au long de mes études.

OUSSAMA.

Dédicace

**Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux louange à
ALLAH le tout puissant.**

Je dédie ce modeste travaille accompagné d'un profond amour

À ma très chère mère

Elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À mon défunt père

Que Dieu lui fasse miséricorde

À ma famille

Particulièrement à mes deux tantes Farida et Akila, et ma grand-mère que je remercie pour leur soutien et leur bienveillance

À mes petites sœurs

À mes amies de la faculté de médecine

Amine, Chabane, Fouad, mayas, Oussama, Walid, Yacine

À mes cousins

Anis, Adel, Billel, Rahim, Wassim, Walim

À mes amies d'enfance

Rafik, Sid Ahmed, Khalil

Mohamed Amine

Table de matière

Remerciement

Dédicaces

Table de matière	i
Liste des abréviations	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Introduction	1
Objectif de l'étude	2

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : *Carthamus caeruleus* L

1. Classification phylogénique.....	3
2. Noms communs de la cardoncelle bleue.....	3
3. Répartition géographique et floraison.....	3
4. Description et identification botanique.....	4
5. Récolte et conservation.....	5
6. Utilisation en médecine traditionnelle.....	6
7. Propriétés pharmacologiques.....	6
7.1. Propriété antioxydante.....	6
7.2. Activité anti-inflammatoire.....	7
7.3. Activité antimicrobienne.....	7
7.4. Activité cicatrisante.....	7
8. Composition chimique.....	7

CHAPITRE II : Les polyphénols

1. Présentation générale sur les polyphénols.....	9
2. Classification des polyphénols	9
2.1. Flavonoïdes.....	9
2.2. Acide phénolique	10
2.3. Tanins.....	11
2.4. Stilbènes	11

Table de matière

2.5. Lignines.....	11
3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols.....	12
3.1. Absorption de la lumière ultraviolette.....	12
3.2. Propriétés réductrices	13
3.3. Acidité	13
4. Toxicité des polyphénols	13
5. Biodisponibilité des polyphénols	14
6. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	14
7. Dosage des polyphénols	15

CHAPITRE III : Méthodes d'extraction

1. Historique des extractions à travers l'âge	16
2. Types de méthodes	16
3. Extraction solide-liquide	16
3.1. Techniques conventionnelles	17
3.1.1. Extraction par l'appareil de Soxhlet	17
3.2. Techniques nouvelles (non-conventionnelles)	18
3.2.1. Extraction assistée par microondes	18
3.2.2. Extraction accélérée par solvants	18
3.2.3. Extractions par ultrasons	19
4. Extraction liquide-liquide	20
4.1. Techniques conventionnelles.....	20
4.1.1. Décantation.....	20
4.1.2. Hydrodistillation.....	21
4.2. Techniques non conventionnelles.....	21
4.2.1. Extraction par coalescence.....	21
4.2.2. Extraction à membrane.....	22

CHAPITRE IV : Méthodologie des plans d'expériences

1. Introduction sur les plans d'expériences	23
2. Définition du plan d'expérience	23
3. Terminologie des plans d'expériences	23
3.1. Réponse et facteur	23
3.2. Domaine d'étude	24

Table de matière

3.3. Domaine de variation du facteur	24
3.4. Domaine expérimental d'intérêt	24
3.5. Variable centre réduite	24
3.6. Matrice d'expérience.....	25
3.7. Plan d'expérimentation	25
3.8. Plan factoriel	25
3.8.1. Plan factoriel complet	26
3.9. Notion d'interaction	26
4. Méthodologie expérimentale	26
5. Les objectifs des plans d'expériences	27
5.1. Recherche exploratoire	27
5.2. Criblage de facteurs	27
5.3. Etude quantitative de facteurs	27
5.4. Etude des surfaces de réponses	27
6. Intérêt d'optimisation du plan d'expérience	27

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels	28
1.1. Appareillage	28
1.2. Verreries et autres	30
1.3. Réactifs et matière première	31
1.4. Matière première végétale	32
2. Méthodes	32
2.1. Prétraitement de la matière première végétale	32
2.2. Choix des facteurs	33
2.3. Choix de la réponse	34
2.4. Type de plan choisi	34
2.5. Construction du plan	34
2.6. Méthode d'extraction	36
2.6.1. Préparation des solutions d'extraction	36
2.6.1.1. Solution acide à pH = 2 et pH = 5.5	36
2.6.1.2. Solution basique pH=9	36

Table de matière

2.6.2. Protocole d'extraction	36
2.7. Réalisation du plan d'expérience	37
2.8. Méthode de dosage	37
2.8.1. Préparation des réactifs	37
2.8.1.1. Réactif de Folin-Ciocalteu	37
2.8.1.2. Réactif Carbonate de sodium	37
2.8.2. Préparation des standards	37
2.8.3. Protocole de dosage	38
2.8.4. Traitement des données expérimentales	38

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Courbe d'étalonnage.....	39
2. Résultats des expériences.....	41
3. Validation du modèle mathématique	42
3.1. Adéquation du modèle	42
3.2. Défaut d'ajustement	43
3.3. Analyse de la variance	44
4. Interprétation des coefficients	45
4.1. Estimation des coefficients	45
4.2. Signification des coefficients	46
5. Analyse de résidus	48
6. Courbe isoréponse	49
7. Comparaison avec d'autres techniques d'extractions	51
Conclusion et perspective.....	52
Références bibliographiques	53

Liste des abréviations

% : Pourcent.

°C : Degré Celsius

°OH : radical hydroxyle

µl : microlitre

A : absorbance

ANOVA : analyse de variance

ASE : extraction accélérée par solvants

CG/SM : chromatographie phase gazeuse couplée spectroscopie de masse

cm³ : centimètre cube

dBa : décibel pondéré A

DE : durée d'extraction

E : extrait

EAG : équivalent en acide gallique

ELL : extraction liquide-liquide

FDA : Food and Drug Administration

g : gramme

GHz : gigahertz

h : heur

H⁺ : Hydron

HPLC : chromatographie phase liquide haute performance

IC50 : concentration inhibitrice médiane

IMP : Interface Message Processor

k : au nombre de facteurs dans un plan expérimental

kg : kilogramme

kHz : kilohertz

L : litre

LDL : lipoprotéine de base densité

m : mètre

m/v : masse / volume

mg : milligramme

MHz : megahertz

min : minute

ml : millilitre

mol ou M : mole

Liste des abréviations

M^f : masse molaire

MSLE : extraction solide-liquide à moyenne pression

mv : millivolt

N : nombre de niveaux dans un plan expérimental

n° : numéro

N_0 : centre du domaine d'étude

nm : nanomètre

PC : personal computer

PDAI : modèle polynomial du premier degré avec interaction

pH : potentiel d'hydrogène

pKa : Constante d'acidité d'un équilibre acido-basique

R^2 : coefficient de détermination

R_a^2 : coefficient de détermination ajusté

Rapport F : rapport de Fisher

RSS : ratio soluté :solvant

sec : second

$t_{1/2}$:demi-vie

UV :ultra-violets

V : volte

Vis : visible

W : watt

X : variable

α : risque d'erreur

μ : moyenne arithmétique

ρ : masse volumique

σ : écart-type

Liste des figures

Figure 01 : Quelques espèces de <i>Carthamus</i> : A = <i>Carthamus creticus</i> L. ; B = <i>Carthamus tinctorius</i> L. ; C = <i>Carthamus caeruleus</i> L ; D = <i>Carthamus leucocaulos</i> L.....	3
Figure 02 : Structure et morphologie <i>Carthamus caeruleus</i> L.....	5
Figure 03 : Crème issue de rhizome de <i>Carthamus caeruleus</i> L.....	6
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes.....	10
Figure 05 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.....	17
Figure 06 : Réacteur micro-ondes pour extractions assistées par micro-ondes.....	18
Figure 07 : Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	18
Figure 08 : Extracteur par solvant (Dionex).....	19
Figure 09 : Mécanisme libération des substances actives lors d'une extraction aux ultrasons.....	20
Figure 10 : Etapes de l'extraction liquide-liquide en utilisant l'ampoule à décanter.....	21
Figure 11 : Etapes de préparation de la poudre à partir racines de <i>Carthamus caeruleus</i> L.....	33
Figure 12 : Poudre issue du broyage des rhizomes de <i>Carthamus caeruleus</i> L.....	33
Figure 13 : Droite d'étalonnage représentant l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique.....	39
Figure 14 : Graphique en cube des points d'expériences.....	42
Figure 15 : Représentation graphique du rendement observé en fonction du rendement estimé pour la quantité des polyphénols.....	43
Figure 16 : Profileur de prévision du rendement en fonction des facteurs.....	46
Figure 17 : Profils d'interactions.....	48
Figure 18 : Représentation graphique des résidus quantité polyphénols en fonction des valeurs prévues.....	49
Figure 19 : Courbe isoréponse de la quantité des polyphénols en fonction du ratios soluté:solvant, du pH et de la durée d'extraction.....	50

Liste des tableaux

Tableau I : Résultats des analyses des composés bioactive identifié dans l'extrait méthanolique de <i>Carthamus caeruleus</i> L par chromatographie phase gazeuse couplée spectroscopie de masse (CG/SM).....	8
Tableau II : Principales classes de composés phénoliques	12
Tableau III : Exemple d'une matrice d'expérience avec 4 expériences (N=4) et 2 facteurs (K=2).....	25
Tableau IV : Appareillages utilisés dans ce présent travail.....	28
Tableau V : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail.....	30
Tableau VI : Matières première utilisées dans le présent travail.....	31
Tableau VII : Réactifs utilisés dans le présent travail	31
Tableau VIII : Matrice d'expérience	35
Tableau IX : Matrice d'expérimentation.....	36
Tableau X : Gamme d'étalonnage.....	38
Tableau XI : Absorbances de la série des standards (acide gallique).....	39
Tableau XII : Résultats expérimentaux.....	41
Tableau XIII : Résumé de l'ajustement.....	42
Tableau XIV : Défaut d'ajustement.....	44
Tableau XV : Analyse de la variance.....	44
Tableau XVI : Estimation des coefficients.....	45
Tableau XVII : Estimation des effets.....	46
Tableau XVIII : tableau comparatif des rendements des différents techniques d'extraction.....	51

Introduction

Introduction

Le nouvel intérêt des populations pour les bienfaits des extraits naturels sur la santé a incité les chercheurs à analyser les ressources naturelles pour déterminer leurs composants phénoliques totaux et leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

Dans le règne végétal, plusieurs espèces contiennent une grande variété de ces polyphénols. Des méthodes d'extraction conventionnelles sont utilisées à de nombreuses fins, notamment pour l'extraction de ces composés actifs. Cependant, l'utilisation de ces techniques nécessite des durées d'extractions plus longues, une consommation des solvant plus importante, et des extractions à des températures élevés, provoquant ainsi une perte de temps, de solvant et une dégradation des composants naturels thermosensibles.

En revanche, les extractions par ultrasons présentent de nombreux avantages, notamment une meilleure reproductibilité, une altération moindre de l'extraction, la possibilité d'ajuster la température d'extraction et un temps d'extraction plus court.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de l'extraction des polyphénols contenus dans les racines *Carthamus caeruleus* L. Cette plante originaire des pays méditerranéens, et dont l'usage en médecine traditionnelle est très répandu notamment dans le traitement des brûlures et les inflammations cutanées.

Pour réaliser à bien notre étude, nous l'avons organisé en deux parties, la première partie, théorique, a été subdivisée en 4 chapitres : Le premier a été consacré aux caractéristiques morphologiques, pharmacologiques et à la composition chimique de la plante *Carthamus caeruleus* L. Dans le second chapitre, on a exposé les types de polyphénols qu'on peut rencontrer dans le règne végétal mais aussi leurs propriétés physico-chimiques et leurs intérêts thérapeutiques. Pour ce qui est du troisième chapitre, il a été sujet sur les principes des méthodes d'extraction des composés polyphénoliques, et enfin le dernier chapitre de la partie théorique a été consacré pour la méthodologie du plan expérimental où on a introduit les termes utilisés, les méthodes qui existent et son intérêt.

Pour ce qui est de la partie pratique, il y a deux chapitres, dans le premier, on a introduit les matériels et les méthodes utilisées pour l'extraction des polyphénols. Dans le deuxième, on a traité et analysé les données obtenues après réalisation des expériences.

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

Notre travail consiste à extraire les polyphénols contenus dans les racines *Carthamus caeruleus* L, connu pour ces propriétés thérapeutiques ; pour cela nous nous sommes basé sur l'extraction liquide-solide qui nous permettra de séparer plusieurs constituants contenus dans la phase solide.

Notre intérêt se portera sur l'optimisation de ce procédé par l'usage des plans d'expériences qui sont des approches mathématiques, ayant pour but de réduire le nombre d'essais. Cette approche peut se résumer par une variation des facteurs préalablement choisie afin de trouver un optimum qui fournit un rendement d'extraction maximum.

Dans ce travail, plusieurs compétences ont été acquises. On a pu :

- Faire connaissance et maîtriser la verrerie de laboratoire tout en respectant les bonnes pratiques de laboratoire ;
- Faire connaissance des appareils de mesure tel que le spectrophotomètre ;
- Analyser les données expérimentales obtenues avec le logiciel JMP®14 pro ;
- Maîtriser le protocole d'extraction des polyphénols dans le sonicateur et leurs dosages par la méthode Folin-Ciocalteu.

PARTIE
THEORIQUE

Chapitre I :

***Carthamus caeruleus* L**

1. Classification phylogénique

La cardoncelle bleue est une plante connue sous le nom latin *Carthamus caeruleus* L. Le genre *Carthamus* comprend environ 40 espèces méditerranéennes et asiatiques [1]. Il regroupe des plantes angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Asterales et la famille des Astéracées (*Asteraceae*) [2]. Le mot générique de la plante découle du mot arabe Kurthum, signifiant « teinture » (Kartam) [3].

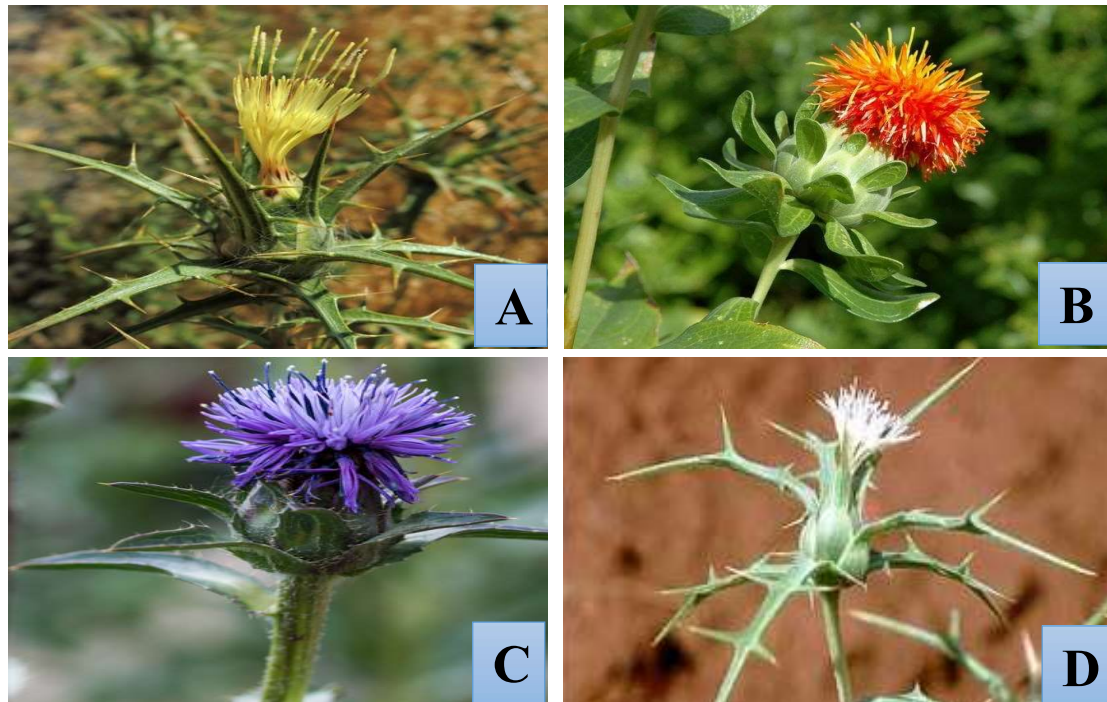


Figure 01 : Quelques espèces de *Carthamus* : A = *Carthamus creticus* L. ; B = *Carthamus tinctorius* L. ; C = *Carthamus caeruleus* L ; D = *Carthamus leucocaulos* L [4–7]

2. Noms communs de la Cardoncelle bleue

Il existe plusieurs noms vernaculaires de *Carthamus caeruleus* L :

Arabe : Merghes Ghers, Kendjar [3]

Berbère : Taga lekhlâ, Amersgus.

Français : Cardoncelle bleue.

3. Répartition géographique et floraison

Son aire de répartition est très étendue à travers les régions côtières méditerranéennes ; les populations sont plus denses dans la péninsule Ibérique (Espagne et Portugal) et aussi en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie) , ainsi que dans le nord de la Libye et l'ouest du Liban, passant par le sud de la Turquie et de la Grèce [8].

En Algérie, la cardoncelle bleu pousse principalement dans les régions du Tell : Bejaia, Tizi-Ouzou, Boumerdès, Sidi bel-abbés et Bouira, ainsi que dans les hauts plateaux de Sétif et dans certains pâturages pierreux des montagne arides [9]. Pour ce qui est de la floraison, elle s'étale de Avril à Juillet [3].

4. Description et identification botanique

La cardoncelle bleue est une plante annuelle ou bisannuelle, de 40-100 cm ou plus, odorante, pubescente-aranéuse (Couvert de poils fins et courts) (Figure 2 : photo A) [9].

Son Rhizome est composé d'une racine principale qui évolue horizontalement et des racines secondaires, elles sortent de la racine principale et évoluent verticalement (Figure 2 : Photos D) [9].

La tige est dressée, rameuse (qui se divise) au sommet et à rameaux étalés [9].

Les feuilles sont coriaces, épineuses sur les bords, fortement nerviées (nerfs visibles); "radicales"(zone assurant la transition entre la tige et les racine) en rosette(feuilles étalées en cercle à partir du collet de la plante), grandes (15-30 cm), pétiolées(connectées à la tige grâce aux pétioles), entières ou (le plus souvent), pennatipartites ; les "supérieures" sessiles (directement attaché à la tige), ovales-lancéolées, fortement dentées-épineuses (Figure 2 : Photos C) [9].

Capitules (toute la fleur) plus petits (1.5-2 cm de large sur 2 cm de long), disposés en corymbe ovoïde, solitaires au sommet de la tige et des rameaux, aranéeux. Les fleurs sont tubuleuses, égales, toutes hermaphrodites (porte à la fois les organes mâles (étamines) et femelles (pistil)). Pour ce qui est de la corolles (ensemble de pétales), elle est de couleur bleue (Figure 2: Photos B) [9].

Les bractées proprement dites sont inermes (sans aiguillons ni épines), simplement acuminées (terminaison pointue) [9].

Involucre (ensemble de bractées ; feuilles au-dessous de la fleur) à bractées imbriquées sur plusieurs rangs, acuminées (terminaison pointue) et inermes (sans aiguillons ni épines), ou les intérieures comportant un appendice fimbrié ou entier et les extérieurs pectinées-ciliées (en forme de peigne). Il est complété par un involucre supplémentaire constitué par des bractées

étalées, acuminées, foliacées (aspect d'une feuille), très épineuses et vulnérantes (qui blesse) (Figure 2 : Photos B) [9].

Le réceptacle est plan, très paléacé (consistance paille) [9].

Les akènes sont luisants, les périphériques chauves et les intérieurs à longue aigrette (touffe de poils sur les grains) nulle ou constituée par des paillettes ou des soies non plumeuses, simple ou double dont les soies internes sont bien plus courtes que les externes et conniventes (Figure 2 : Photos E) [9].

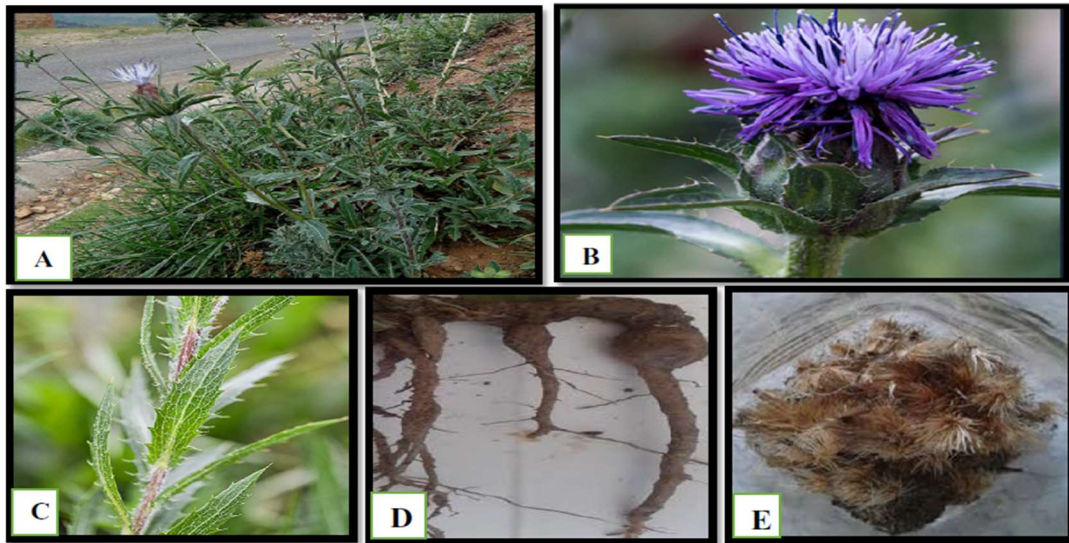


Figure 02 : Structure et morphologie de *Carthamus caeruleus* L [10]

5. Récolte et conservation

Après la récolte des racines et du rhizome de *Carthamus caeruleus* L, ils sont lavés, épluchés, puis découpés en petits morceaux. La technique la plus rentable pour obtenir une meilleure conservation de cette drogue est le séchage à l'air libre pendant plusieurs jours, jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant [11-12].

Cette technique permet de récolter une grande quantité de la drogue tout en conservant les caractéristiques organoleptiques pour la préparation semi solide. Par contre la drogue fraîche se conserve uniquement une semaine à 4°C, car au-delà de ce délai, des signes de détériorations apparaissent [13].

6. Utilisation en médecine traditionnelle

L'utilisation de *Carthamus caeruleus* L est répandue en Algérie (les régions côtières méditerranéennes et les hauts plateaux), les études ethnobotaniques sur cette espèce montrent que la majorité de la population locale (74.98%) utilisent les racines pour leurs effets cicatrisants dans le cas des brûlures cutanées mais aussi pour soulager les inflammations articulaires. Les préparations traditionnelles se présente généralement sous forme de crème (Figure 03) [14].

Pour préparer la crème, les rhizomes sont nettoyés, épluchés, coupés en petits morceaux et ensuite bouillis dans de l'eau ou du lait. Après avoir refroidis, on filtre le tous, ce qui nous donnera une crème qui est prête pour l'utilisation. Des résultats spectaculaires ont été observés chez des personnes traités par cette dernière [14].

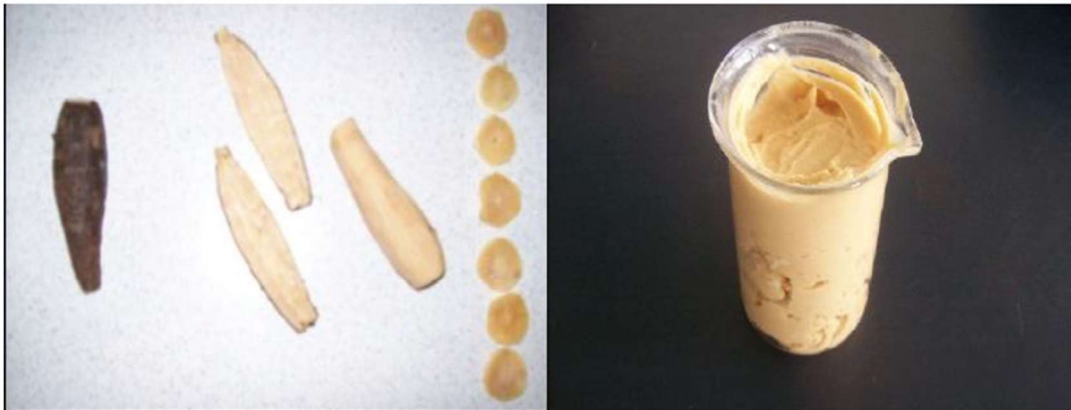


Figure 03 : Crème issue de rhizome de *Carthamus caeruleus* L [14]

7. Propriétés pharmacologiques

En corrélation avec leur usage traditionnel, deux études ont été menées afin de confirmer les effets pharmacologiques de *Carthamus caeruleus* L. La première a démontré une forte activité antioxydante [15]. La seconde s'est focalisée sur l'activité anti microbienne [16].

7.1. Propriété antioxydante

La richesse du rhizome de *Carthamus caeruleus* L en composés polyphénoliques lui confère une activité antioxydante très importante. L'analyse de l'activité antioxydante faite sur l'extrait polyphénolique de ce rhizome a montré un pouvoir réducteur élevé supérieur à celui exercé par l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique, ainsi une activité anti-radicalaire importante représentée par une IC50 (concentration inhibitrice médiane) relativement similaire à celle de l'acide ascorbique [17].

7.2. Activité anti-inflammatoire

L'extrait des racines de *Carthamus caeruleus* L provoque une inhibition d'un œdème consécutif de l'infiltration des cellules inflammatoires et d'une sécrétion importante de médiateurs inflammatoires, cela est expliqué par sa richesse en flavonoïdes [17].

Les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui leur permettent de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Ils sont capables de diminuer la libération d'histamine des polynucléaires basophiles et des mastocytes, donc l'intensité de la réaction inflammatoire [17].

7.3. Activité antimicrobienne

Le nombre de pathogènes résistants aux antibiotiques augmente sans cesse depuis quelques années. La découverte de nouveaux agents antimicrobiens se trouve la solution pour combattre ce problème. De ce fait, plusieurs scientifiques à la recherche de nouveaux agents commencent à porter une attention particulière aux végétaux [17].

L'étude de l'activité antimicrobienne de la plante *Carthamus caeruleus* L a fait ressortir un pouvoir inhibiteur important sur les germes multi-résistants responsables des maladies infectieuses [17].

7.4. Activité cicatrisante

Le pouvoir cicatrisant des plantes médicinales est expliqué par leurs compositions en substances phénoliques qui possèdent des capacités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes, ainsi qu'un niveau élevé de stérols végétaux. Le genre *Carthamus* est connu par sa richesse en stérols végétaux et en composants phénoliques [17].

Le test d'évaluation de l'activité cicatrisante a permis de mettre en évidence le potentiel cicatrisant de la crème des racines de *Carthamus caeruleus* L sur le modèle animal [17].

8. Composition chimique

Le screening photochimique de rhizome de la plante a fait ressortir une richesse en polyphénols (flavonoïdes, tanins, anthraquinones...), coumarines et quinones [12].

Les polyphénols constituent donc un groupe important de substances naturelles largement répandues dans le règne végétal. Les scientifiques ont identifié plus de 8000 types de molécules,

allant de molécule simple à des composés hautement complexes. Leur accumulation dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à une autre [18].

Tableau I : Résultats des analyses des composés bioactives identifiés dans l'extrait méthanolique de *Carthamus caeruleus* L par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) [12]

Peak	Retention time	Area (%)	Name of compounds
1	4.9	0.61	Furfural
2	12.86	2.24	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one
3	13.63	0.56	7-octenoic acid
4	15.07	9.16	5-HMF
5	20.62	0.42	1-pentadecene
6	22.8	2.54	Caryophyllene oxide
7	23.76	1.64	Caryophylla-3(15),7(14)-dien-6-ol
8	24.03	1.12	13-tetradec-11-yn-1-ol
9	24.13	8.94	8-methylene-3-oxatricyclo[5.2.0.0(2,4)]nonane
10	24.17	0.97	E,Z-2,13-octadecadien-1-ol
11	24.58	1.01	1-octadecene
12	25.93	0.44	Tetradecanoic acid
13	28.7	1.41	Methyl isohexadecanoate
14	29.35	12.88	n-hexadecanoic acid (palmitic acid)
15	31.41	0.9	9,12-octadecadienoic acid, methylester, (E, E)-
16	32.08	2	9,12-octadecadienoic acid (Z, Z)-
17	32.17	1.38	Octadec-9-enoic acid
18	32.51	1.65	2-ethylhexyl trans-4-methoxycinnamate
19	37.44	4.24	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester
20	37.66	12.75	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2 ethylhexyl) ester or MEHP
21	44.02	2.18	Gamma-sitosterol

MEHP=Mono (2-ethylhexyl) phthalate, 5-HMF=5-hydroxymethyl, 2-furancarboxaldehyde

CHAPITRE II :

Les polyphénols

1. Présentation générale sur les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvés dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées [19], allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins [20]. Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) [21].

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [22]. Les composés sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base, ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins [23].

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer [24], les maladies dégénératives et cardiovasculaires [25]. Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en composés phénoliques constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les composés phénoliques apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme [26].

2. Classification des polyphénols

2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols [27]. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones (figure 04), constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C. Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C [22].

Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont :

- Flavonols : les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments, ils possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable à piéger des radicaux libres [28] ;
- Flavones : les flavones sont abondants chez les plantes supérieures. Ils ont des activités antimicrobiennes et antivirales [29] ;
- Flavanones : les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées [30] ;
- Isoflavones : les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, on les rencontre aussi dans les légumineuses [31] ;
- Flavanol : les flavanols existent sous forme de monomères : l'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés pro anthocyanidines [18] ;
- Anthocyanes : les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes, ils possèdent une propriété très importante qui réside dans leur aptitude antioxydante [32].

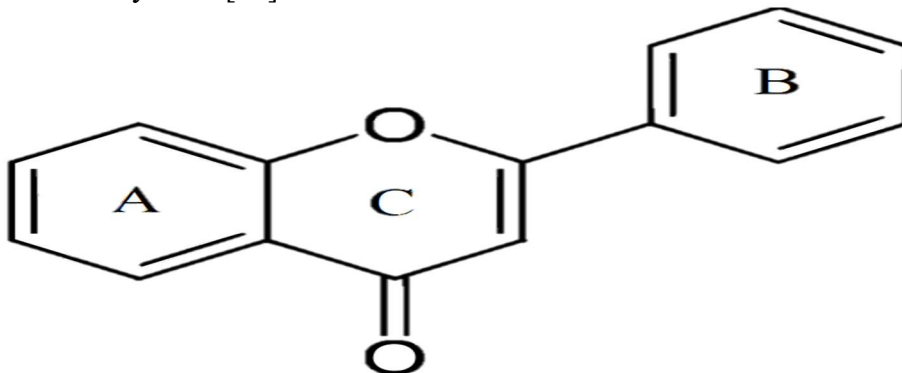


Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes [33]

2.2. 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 hydroxy-benzoïques, dont les plus répandus sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique [33].

Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique [33].

2.3. Tanins

Les tanins sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles, ayant la propriété de précipiter la gélatine et d'autres protéines et de se colorer par les sels ferriques. Sur le plan chimique, ils sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, qui diffèrent par leur structure chimique et leur origine biogénétique [34].

2.4. Stilbènes

Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol, qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales [35].

2.5. Lignines

Les lignines sont des polymères, considérés comme principaux composants du bois avec la cellulose et l'hémicellulose, leurs principales fonctions sont d'apportées une rigidité, une imperméabilité à l'eau et une grande résistance à la décomposition [36].

Tableau II : Principales classes de composés phénoliques [33]

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	P-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes · Flavonols · Anthocyanes · Flavanols · Flavanones Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, Catéchine Naringénine daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fruit rouge Pomme, raisin Citrus soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyaux des Fruits
(C ₁₅) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

Sur la base d'innombrable littérature, les polyphénols présentent une large gamme de propriétés [37].

3.1. Absorption de la lumière ultraviolette

Tous les composés phénoliques présentent une absorption intense dans la région UV du spectre, et certains composés colorés absorbent également dans le visible. Chaque classe de composés phénoliques a des caractéristiques d'absorption distinctes. Par exemple, les phénols et les acides

phénoliques présentent un maximum d'absorbance compris entre 250 et 290 nm ; les flavones et les flavonols présentent des bandes d'absorption d'approximativement la même intensité à environ 250 et 350 nm ; les anthocyanes et les bétacyanines présentent une absorption assez similaire dans la région visible (475–560 nm et 535–545 nm, respectivement) et un pic subsidiaire à environ 270–275 nm [37].

3.2. Propriétés réductrices

Sont dû aux réactions de transfert de proton et/ou d'électron avec conversion d'un radical réactif en radical aryloxy stabilisé [38].

3.3. Acidité

Les composés phénoliques sont, en général, des acides faibles. Comparable au groupement hydroxyle des alcools aliphatiques non substitués, cependant, le groupe OH phénolique est plus acide. La raison en est que l'anion formé après avoir extrait le proton du groupe hydroxyle est relativement stable en raison de l'existence de plusieurs structures mésomères [38].

Par conséquent, le phénol est un acide faible, avec une valeur de pKa de 10. Cela place le phénol entre les acides carboxyliques (pKa = 4-5) et les alcools aliphatiques (pKa = 16-19) [38].

Le pKa est important car il affecte la manière dont certains composés phénoliques sont extraits. Si l'on considère un mélange de phénols allant des acides faibles aux acides forts, l'ajout de carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) au mélange permettra la séparation de ces phénols. La base faible capte le proton des acides forts ou des phénols plus acides. Il en résulte la formation de sels phénolates solubles dans l'eau [38].

Les phénols les moins acides ne sont pas neutralisés ou ne perdent pas de proton, ont tendance à rester sous forme de « phénols libres » et ne seront pas aussi solubles dans l'eau. Ces composés peuvent ensuite être extraits avec des solvants organiques [38].

4. Toxicité des polyphénols

La majeure partie des intoxications aux polyphénols est généralement dû aux tanins et plus précisément aux tanins condensés, car ils sont plus répandus dans l'alimentation humaine par rapport aux tannins hydrolysables [39].

Les symptômes de ces intoxications sont divers et leurs intensités varient selon la voie d'absorption, On peut citer :

- ✓ Une diminution des apports alimentaires ;
- ✓ Une inhibition des enzymes digestives ;
- ✓ Une augmentation de l'élimination des protéines endogènes ;
- ✓ Une anomalie fonctionnelle du tractus digestive ;
- ✓ Une toxicité des tanins absorbés ou de leurs métabolites.

5. Biodisponibilité des polyphénols :

La majorité des polyphénols sont caractérisés par leurs faibles stabilités surtout dans le milieu biologique ce qui peut expliquer leurs faibles toxicités (sauf dans les cas des pathologies intestinales ou syndromes métaboliques) [40], sans oublier que leurs faibles compositions en lipide diminuent fortement leurs passages transmembranaires et par conséquent leurs capacités à atteindre la circulation générale [41].

De plus, une fois ingérés, la majorité d'entre eux sont métabolisés dans l'intestin grêle en subissant une méthylation puis ils seront modifiés dans le foie par des réactions de glucuronidation et de sulfatation [42].

6. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon (produit à base de diosmine qui est lui-même de la famille des flavones) [43].

Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants :

- ✓ **Activité anticancéreuse**
- ✓ **Prévention contre les maladies cardiovasculaires.**
- ✓ **Prévention contre les maladies hormono-dépendantes.**
- ✓ **Prévention contre les maladies neurodégénératives.**
- ✓ **Activité anti inflammatoire.**
- ✓ **Activité antimicrobienne.**

7. Dosage des polyphénols

Différents types de méthodes sont utilisés pour analyser la teneur en composés phénoliques, comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), l'électroséparation et surtout les méthodes optiques. L'une des méthodes les plus utilisées et les plus simples pour la détermination des polyphénols totaux est la méthode spectrophotométrique utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Son principe est basé sur l'oxydation des composés phénoliques en milieu alcalin avec le molybdène et le phosphate de tungstène pour former un complexe de couleur bleue. L'intensité de la couleur bleue est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 760 nm [44].

CHAPITRE III :

Méthodes d'extraction

1. Historique des extractions à travers l'âge

Depuis l'antiquité, l'homme a utilisé certaines techniques d'extraction pour séparer des espèces chimiques naturelles présentes dans des végétaux ou des organes d'animaux, parmi ces méthodes on trouve la macération, qui est utilisée pour produire un bouillie qui peut être séparée physiquement en fractions solides et liquides [45].

Après le 19ème siècle, de nouvelles techniques d'extraction plus performantes ont été développées tel que : l'extraction par dioxyde de carbone supercritique, l'hydrodistillation et l'extraction par les ultrasons [45].

2. Types de méthodes

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Il existe deux types de techniques : les conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et les nouvelles (développées plus récemment) [46]. Parmi les techniques conventionnelles, on trouve l'entraînement à la vapeur (hydrodistillation), l'extraction par Soxhlet, l'extraction en mode batch et l'extraction assistée par sonication. Pour les techniques nouvelles, on peut citer l'extraction assistée par microondes, l'extraction accélérée par solvants (ASE) et l'extraction avec des fluides supercritiques. Il existe également d'autres techniques, moins répandues, comme l'extraction solide-liquide à moyenne pression (MSLE) [47].

3. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de séparation qui consiste à extraire un composant d'une phase solide vers une phase liquide, soit par simple dissolution, soit par l'intermédiaire d'une réaction chimique [48].

Pour effectuer cette opération, le solide dispersé est généralement mis en suspension au sein du liquide dans des cuves mécaniquement agitées, mais on peut avoir recours à d'autres procédés de mise en suspension du solide [48].

3.1. Techniques conventionnelles

3.1.1. Extraction par l'appareil de Soxhlet

L'appareil de Soxhlet est constitué de plusieurs entités : ballon à fond rond, tube de siphon, chemin de distillation, adaptateur d'expansion, condenseur, entrée et sortie d'eau de refroidissement, source de chaleur et un dé à coudre [49].

Dans cette méthode d'extraction, l'échantillon en poudre est enfermé dans un sac poreux ou "dé à coudre". Le solvant d'extraction est prélevé dans le ballon à fond rond et chauffé en utilisant une source de chaleur comme un manteau de chauffage. En raison de la chaleur, le solvant contenu dans le ballon de fond s'évapore dans le condenseur et s'égoutte sur le dé à coudre de l'échantillon [49].

L'avantage de l'extraction Soxhlet est que l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction [55].

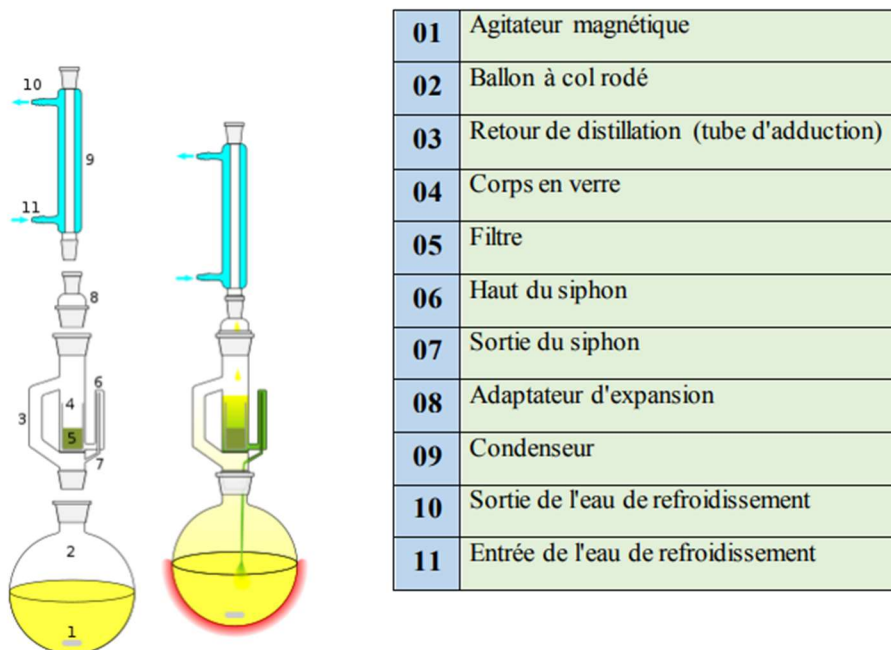


Figure 05 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet [50]

3.2. Techniques nouvelles (non-conventionnelles)

3.2.1. Extraction assistée par microondes

C'est une méthode récente qui combine l'utilisation de micro-ondes (300 MHz à 800 GHz) à la méthode conventionnelle d'extraction par solvant [50]. L'énergie délivrée dans le milieu est absorbée et est convertie en énergie thermique (100 – 150 °C) [51]. Les micro-ondes augmentent donc la température du solvant et de la plante, ce qui augmentera les cinétiques d'extraction [52]. Cette méthode offre des avantages, tels que l'augmentation de la pureté des extraits, la réduction des coûts et du temps d'opération [53].

Cependant, elle présente certains inconvénients comme l'augmentation de manière significative de la température de la cellule, ce qui peut détruire certaines molécules thermolabiles [56-57].



Figure 06 : Réacteur micro-ondes pour extractions assistées par micro-ondes [56]

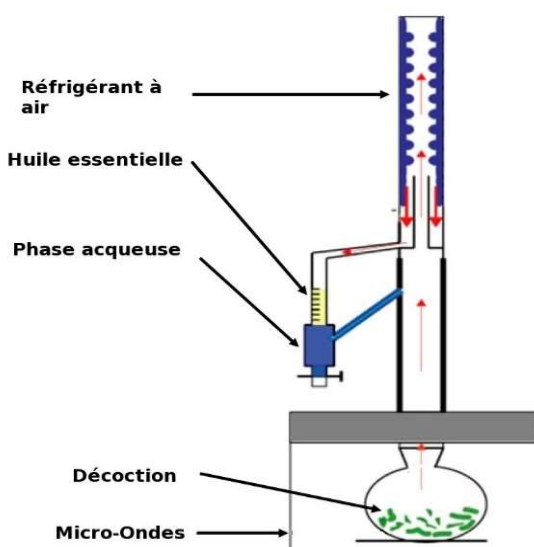


Figure 07 : Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes [56]

3.2.2. Extraction accélérée par solvants

Il s'agit d'une technique d'extraction rapide, entièrement automatisée, des composés organiques à partir des matrices solides et semi-solides. Cette technique utilise des solvants courants à des températures supérieures au point d'ébullition et des pressions élevées pour augmenter l'efficacité de l'extraction. Les avantages de la méthode comprennent la réduction spectaculaire des solvants, la large gamme d'applications et la manipulation des matrices acides et alcalines [57].



Figure 08 : Extracteur par solvant (Dionex) [58]

3.2.3. Extractions par ultrasons

La technologie des bains à ultrasons est basée sur des ondes mécaniques à une fréquence supérieure au seuil de l'audition humaine (>16 kHz). Ces ondes se propagent soit dans la masse d'un matériau soit sur sa surface à une vitesse caractéristique de la nature de l'onde et du matériau dans lequel elle se propage [59–62]. Les effets des ultrasons sur les systèmes liquides sont principalement liés au phénomène de cavitation. Les ultrasons sont propagés par l'intermédiaire d'une série d'ondes de compression et de raréfaction induites sur les molécules du milieu traversé [63].

A une puissance suffisamment élevée, le cycle de raréfaction peut dépasser les forces d'attraction des molécules du liquide et la cavité peut se former à partir des noyaux de gaz existant dans le fluide. Ces bulles, réparties dans tout le liquide, croissent au cours de quelques cycles jusqu'à atteindre une taille critique et deviennent instables et s'effondrent violemment [63-66-67]. L'implosion des bulles de cavitation provoquent des impacts de micro-jets et des dommages induits par l'onde de choc sur la paroi cellulaire de la plante libérant ainsi son contenu dans le solvant [66].

De plus, cette implosion conduit à des accumulations d'énergie dans des points chauds qui produisent, à leur tour, des ondes d'énergie de cisaillement très élevées et des turbulences dans la zone de cavitation [67].

Un autre phénomène résultant de la variation de la taille des bulles et de l'effondrement ultérieur est le développement de micro-courants, associés à des gradients de vitesse élevés et à des contraintes de cisaillement qui modifient les caractéristiques du milieu [68]. Un autre effet

important, est que les molécules d'eau peuvent être brisées en générant des radicaux libres très réactifs ($H_2O \Rightarrow H + \cdot OH$) qui peuvent réagir avec d'autres molécules [69].

Ce large éventail de mécanismes impliqués dans le traitement par ultrasons peut induire des effets physiques et chimiques avec plusieurs applications potentielles dans différents domaines [70]. Les principaux avantages de l'ultrason sont son efficacité, sa simplicité et son faible coût (coût de l'instrument et de l'opération) [71]. Elle peut également fonctionner à température modérée, ce qui convient aux composés thermosensibles [72].

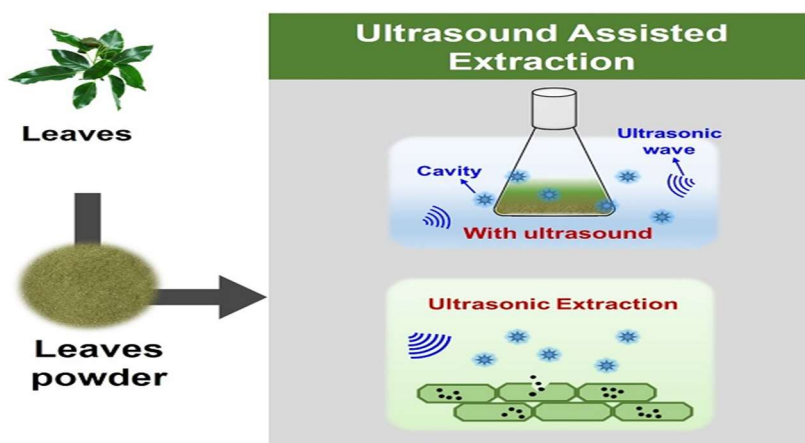


Figure 09 : Mécanisme de libération des substances actives lors d'une extraction aux ultrasons [73]

4. Extraction liquide – liquide

4.1. Techniques conventionnelles

4.1.1. Décantation

Les méthodes d'extraction liquide-liquide (ELL) permettent le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible (appelée extracteur) en utilisant une ampoule à décanter. Elles sont couramment employées pour purifier et concentrer les échantillons destinés à une analyse par méthode chromatographique. Divers paramètres physico-chimiques régissent la réalisation d'une ELL, propres aux solvants employés (miscibilité à l'eau, sa constante d'acidité, sa densité...etc) et aux solutés à extraire (sa structure, sa constante d'acidité, sa lipophilie...etc) [74].

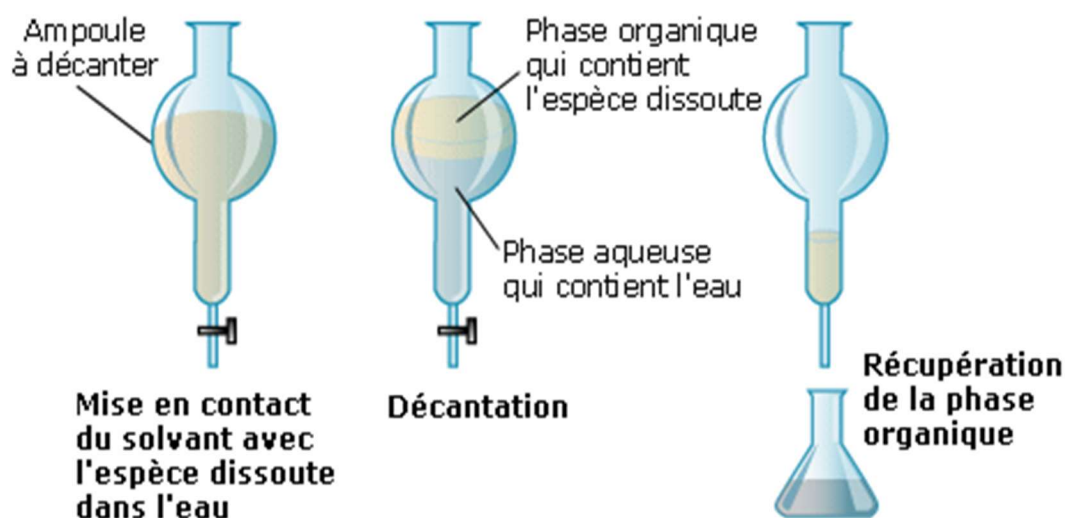


Figure 10 : Etapes de l'extraction liquide-liquide en utilisant l'ampoule à décanter [49]

4.1.2. Hydrodistillation

La distillation est un procédé qui consiste à séparer physiquement un mélange en deux ou plusieurs produits ayant un point d'ébullition différent, en faisant bouillir de préférence les composants les plus volatils du mélange.

Lorsqu'un mélange liquide de deux matières volatiles est chauffé, la vapeur qui se dégage aura une concentration plus élevée de la matière la plus volatile que le liquide dont elle est issue. Inversement, si une vapeur est refroidie, la matière la moins volatile a tendance à se condenser sur une plus grande proportion que la matière la plus volatile [75].

4.2. Techniques non conventionnelles

4.2.1. Extraction par coalescence

Elle repose sur la capacité de certains solvants organiques à passer de l'état non miscibilité dans l'eau à celui de miscibilité totale par un simple changement modéré de température. Ainsi, en changeant la température, la phase organique et la phase aqueuse sont mises en contact intime. La surface à travers laquelle le transfert de soluté peut se produire atteint sa limite théorique, et l'équilibre est atteint presque instantanément. Une fois cet équilibre atteint, le simple fait de refroidir la solution entraîne la séparation des deux phases, chaque espèce étant répartie dans la phase appropriée. Le grand avantage de cette technique est qu'ils nécessitent moins de temps pour effectuer le processus d'extraction que les systèmes qui nécessitent une agitation [76].

4.2.2. Extraction à membrane

Le principe de la technique est identique à celui de l'extraction liquide-liquide et présente la spécificité d'une interface stabilisée dans les pores d'une membrane. La membrane a uniquement un rôle de support permettant la stabilisation de l'interface et n'apporte pas de sélectivité. Les pores de la membrane sont remplis par l'une des deux phases (dite phase mouillante) en fonction de l'affinité entre le matériau et le liquide. Afin d'éviter le passage de la phase mouillante au travers de la membrane et par conséquent l'apparition d'une émulsion dans l'autre phase, une légère surpression est appliquée côté liquide non mouillant afin de stabiliser l'interface [77].

CHAPITRE IV :

**Méthodologie des plans
d'expériences**

1. Introduction sur les plans d'expériences

Le concept du plan d'expérience est né dans le secteur agronomique à la suite des travaux entrepris par Ronald A. Fisher en Grande-Bretagne en 1919. Ce concept a ensuite été introduit dans le secteur industriel comme étant une opération permettant de trouver le meilleur de quelque chose (maximum de produit, de rendement, ou minimum de cout d'énergie...) [78].

Il occupe également une place importante dans d'autres secteurs, dont la recherche médicale ou pharmaceutique, et les sciences de l'éducation [78].

2. Définition du plan d'expérience

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manières efficaces et économique [79]. En d'autres termes, l'étude par expérience consiste à provoquer les phénomènes auxquels on s'intéresse, en maîtrisant certains facteurs, puis on observe les conséquences qui en résultent sans perdre de vue le fait qu'ils subsistent en réalité un nombre important de facteurs non maîtrisés ou non contrôlés [78].

La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats [79].

3. Terminologie des plans d'expériences

3.1. Réponse et facteur

La réponse est une grandeur d'intérêt lors de l'étude d'un phénomène particulier, elle représente le résultat d'une expérience ou d'une simulation numérique. Ainsi, une étude peut se traduire par plusieurs réponses [80].

Un facteur est une variable qui peut éventuellement avoir une influence sur la réponse observée. Il peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu (discret). Parmi ces facteurs, on distingue [80] :

- Les facteurs contrôlables : qui dépendent directement du choix du technicien (température, pression, matériau...);

- Les facteurs non-contrôlables : qui varient indépendamment du choix du technicien (conditions climatiques, environnement...). Les facteurs incontrôlables sont des variables perturbatrices, difficiles à maîtriser et les plans d'expériences peuvent nous aider à nous affranchir ou du moins à les atténuer.

En général, un facteur varie entre deux bornes [80] :

- La borne inférieure (niveau bas), généralement noté -1 ;
- La borne supérieure (niveau haut) généralement noté +1.

Ces variables sont dites codées, normées ou centrées réduites [80].

3.2. Domaine d'étude

C'est la partie expérimentale sélectionnée par l'expérimentateur pour réaliser son étude. Il est défini par les niveaux hauts et bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs [80].

3.3. Domaine de variation du facteur

Il s'agit de l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau haut et le niveau bas [80].

3.4. Domaine expérimental d'intérêt

La réunion des domaines de variation de chaque facteur. Ainsi, les informations tirées des résultats expérimentaux ne seront valables que dans ce domaine [80].

3.5. Variable centrée réduite

C'est la transformation d'une variable aléatoire par une application affine, de telle sorte que sa moyenne soit nulle et son écart type égal à un. Centrer une variable consiste à soustraire sa moyenne arithmétique (espérance) à chacune de ses valeurs initiales, par contre réduire une variable consiste à diviser toutes ses valeurs par son écart type. On peut illustrer cette définition par un exemple d'une variable X caractérisée par une moyenne arithmétique μ et un écart-type

σ [81] :

$$x = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

On peut dire qu'une variable centrée réduite a : une moyenne arithmétique (espérance) nulle, une variance égale à 1 et un écart type égal à 1 [81].

Et pour terminer, l'intérêt de cette transformation est d'obtenir des données indépendantes de l'unité ou de l'échelle choisie mais aussi d'obtenir des variables ayant une même moyenne et une même dispersion ce qui nous permettra à la suite de comparer plus aisément les variations [81]. Dans une matrice donnée, un élément X_{ij} correspond au niveau de la $i^{\text{ème}}$ et de la $j^{\text{ème}}$ variable [82].

3.6. Matrice d'expérience

Elle est toujours écrite sous forme codée, elle représente l'ensemble des expériences à réaliser. Elle comprend N lignes et K colonnes correspondant respectivement à N expériences à réaliser et à K facteurs à faire varier [80].

Tableau III : Exemple d'une matrice d'expérience avec 4 expériences (N=4) et 2 facteurs (K=2) [80]

N° essai	Vitesse <i>Facteur 1</i>	Surcharge <i>Facteur 2</i>	Consommation (l/100 km)
1 (A)	-1	-1	8,3
2 (B)	+1	-1	10,7
3 (C)	-1	+1	9,7
4 (D)	+1	+1	12,3
Niveau -1	80 km/h	0 kg	
Niveau +1	120 km/h	300 kg	

3.7. Plan d'expérimentation

C'est la traduction de la matrice d'expérience en une matrice directement utilisable par l'expérimentateur. Il doit faire l'objet d'une analyse minutieuse pour voir si toutes les expériences sont réalisables et si elles ne présentent aucun risque [82].

3.8. Plan factoriel

C'est la forme la plus courante de plan d'expériences simultanées. Dans ce cas, on choisit un ensemble de niveaux pour chaque facteur (variable) à étudier, puis on décide d'une série

d'expériences à effectuer, soit une fois, soit éventuellement plusieurs fois, avec chacune des combinaisons des différents facteurs [83].

3.8.1. Plan factoriel complet

C'est un plan dans lequel les chercheurs mesurent les réponses pour toutes les combinaisons de niveaux de facteurs et on trouve deux types [80] :

- Des plans factoriels complets à 2 niveaux : Le nombre d'essais nécessaires est égal à 2^k où k correspond au nombre de facteurs. Plus le nombre de facteurs figurant dans ce plan augmente, plus le nombre d'essais nécessaires augmente rapidement. Par exemple, un plan factoriel complet à 2 niveaux avec 6 facteurs requiert 64 essais [80].
- Des plans factoriels complets généraux comprenant des facteurs à plus de deux niveaux : dans ce cas-là, le nombre d'essais nécessaires est égal à N^k où N correspond au nombre de niveaux et k au nombre de facteurs [80].

3.9. Notion d'interaction

C'est l'action combinée de deux ou plusieurs variables qui s'additionnent à l'effet principal de ces variables [80].

4. Méthodologie expérimentale

Dans toute étude, il est utile de respecter la démarche suivante [82] :

- Définition de l'objectif.
- Choix des réponses expérimentales.
- Choix des facteurs et du domaine expérimental d'intérêt.
- Établissement de la stratégie expérimentale.
- Construction de la matrice d'expériences.
- Construction du plan d'expérimentation.
- Expérimentation.
- Calcul des estimations des informations recherchées.
- Interprétation des résultats.

5. Les objectifs des plans d'expériences

La stratégie choisie doit apporter les informations sensées répondre à l'objectif fixé. Ainsi, le choix de la stratégie dépend du type d'objectif et ces derniers peuvent être classés en quatre classes :

5.1. Recherche exploratoire

Il s'agit du cas où on ne connaît presque rien sur le domaine. La méthode de recherche expérimentale propose des techniques permettant de rationaliser la démarche pour éviter de mener les expériences d'une manière anarchique [82].

5.2. Criblage de facteurs

Le criblage consiste à identifier rapidement parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents, ceux qui le sont réellement, mais aussi de connaître l'effet des éventuelles interactions entre ces facteurs [82].

5.3. Etude quantitative de facteurs

Contrairement à la stratégie classique où le nombre d'essais est élevé, la méthode de recherche expérimentale permet d'avoir les informations désirées avec un minimum d'essais. En d'autres termes, obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expériences [84].

5.4. Etude des surfaces de réponses

Les surfaces de réponses permettent de calculer toutes les valeurs de la réponse dans le domaine expérimental d'intérêt avec une précision au moins égale à celle qu'on obtiendra si on faisait l'expérience. Ainsi, l'expérimentateur peut accéder à la zone la plus intéressante du domaine [80].

6. Intérêt d'optimisation du plan d'expérience

Pour autant, l'intérêt majeur des plans d'expériences réside dans le fait qu'ils permettent [80]:

- D'établir la modélisation du phénomène étudié et mieux organiser ces expériences ;
- D'éviter de réaliser des expériences inutiles et permettre d'avancer à coup sûr ;
- D'obtenir la meilleure précision possible sur les résultats ;
- D'arriver rapidement aux meilleurs résultats possibles et découvrir la solution optimale.

PARTIE
PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels


1.1. Appareillage

Dans le tableau suivant (tableau IV), sont mentionnés les appareils utilisés pour la réalisation de notre plan expérimental.

Tableau IV : Appareillages utilisés dans ce présent travail

Désignation (Spécification)	Caractéristiques	Usage	Illustration
Spectrophotomètre (PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis)	<ul style="list-style-type: none"> *Gamme des longueurs d'onde : 190-1100 nm. *Précision des longueurs d'onde : ± 0.1 nm. *Gamme d'absorbance : -3 à 4 A. *Précision d'absorbance : ± 0.001 A. *Vitesse d'analyse (max) : 2880 nm/min. *Réseau de diffraction : holographique avec 1053 lignes/mm *Poids : 26 kg 	<ul style="list-style-type: none"> *Détermination de l'absorbance d'une substance chimique en solution en fonction d'une longueur d'onde donnée (grâce à la loi de Beer-Lambert). 	
Bain à ultrasons (Advantage-Lab AL04-06-230)	<ul style="list-style-type: none"> *Cuve inox. *Capacité : 5.75 L. *Avec ou sans chauffage. *Température max : 80°C (réglage par bouton). *Raccord coudé pour vidange. *Poids : 5 kg. 	<ul style="list-style-type: none"> *Nettoyage rapide et délicat des tamis d'analyse et des outils de broyage. *Homogénéisation, dissolution et dégazage intensifs des produits. 	

<p>Hotte (Labtech LFH-2120V)</p>	<p>*Volume d'air : 1300 CMH (+/-10%) *Vitesse d'air : 0.3-1 m/sec *Niveau de bruit : 50-60 dBA *porte coulissante en verre de sécurité trempé avec un cadre en acier inoxydable *Alimentation électrique : 110V60Hz ou 220V50/60Hz</p>	<p>*Protection contre le risque d'inhalation de polluants sous forme de fumées, gaz, vapeurs, poussières dangereuses. *Protection contre les éclaboussures de produits et les bris de verre en cas d'éclatements.</p>	
<p>Distillateur d'eau (Nuve ND12)</p>	<p>*Capacité de produire de l'eau distillée : 12L/h. *Capacité du réservoir de l'eau distillée : 24 L. *Les composants en acier inoxydable (pas de risque de détérioration).</p>	<p>*Distillation de l'eau.</p>	
<p>PH-mètre (Mettler Toledo FE20 FiveEasy)</p>	<p>*Gamme pH : 0-14 *Résolution (pH) : 0.01 *Interface RS-232 *Compensation thermique manuelle ou automatique *Connexions PC ou IMP. *Poids : 0.6 kg.</p>	<p>*Préparations des tampons *Détermination de pH/Mv et de conductivité de haute qualité.</p>	
<p>Balance de précision (Kern ALT 220-5DAM)</p>	<p>*Calibrage interne automatique. *Une interface RS-232 et GPL avec date et heure. *Connexions PC ou IMP. *Châssis métallique, carter ABS, plateau inox. *Précision : 0.1 mg.</p>	<p>*Pesage tare/brut/net. *Pesage en pourcentage, comptage, totalisation, détermination de la densité.</p>	

<p>Étuve (Memmert UNB 100)</p>	<p>*Contenu : 13 L. *Plage de température : 220°C. *Tension : 230V, 50-60Hz. *Puissance : 600 W. *Avec une convection forcée et une étagère.</p>	<p>*Séchage de matériaux. *Exécution de processus de traitement thermique. *Des contrôles de qualité et des tests de vieillissement dans l'industrie.</p>	
--------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

1.2. Verreries et autres

Dans le tableau qui suit (tableau V), on a énuméré la verrerie et les autres types de matériels utilisés au cours de notre pratique au laboratoire.

Tableau V : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail

Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none"> • Fioles jaugées 20 ml, 25 ml, 100 ml ; • Erlenmeyer à différents volumes ; • Tubes à essais ; • Bêchers à différents volumes ; • Pipettes jaugées 5 ml, 25 ml ; • Entonnoir en verre ; • Verre de montre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pissettes ; • Pro pipette (poire en caoutchouc) ; • Spatule en inox ; • Papier filtre ordinaire ; • Papier aluminium ; • Micropipette réglable 100-1000 µl ; • Mortier ; • Tamis

1.3. Réactifs et matière première

Dans les tableaux ci-dessous (tableau VI et tableau VII), sont mentionnés les matières premières et les réactifs utilisés dans notre partie pratique.

Tableau VI : Matières première utilisées dans le présent travail









Matière première	Données physicochimiques	Précaution
Acide gallique	<ul style="list-style-type: none"> - Poudre cristalline blanche ou jaune pâle, inodore, saveur astringente et acide, très soluble dans l'eau. - Formule moléculaire : $C_7H_6O_5$ -N° CAS : 149-91-7 -M^r : 170.12 g/mol - ρ : 1.694 g/cm³ (à 6°C) 	 

Tableau VII : Réactifs utilisés dans le présent travail

Réactifs	Données physicochimique	Précaution
Acide chlorhydrique	<ul style="list-style-type: none"> - La solution aqueuse est incolore avec une odeur forte et qui produit une vapeur irritante ; - Formule moléculaire : HCl ; -N° CAS : 7647-01-0 ; -M^r : 36.46 g/mol ; - ρ : 0.63 g/cm³ (à 46°C). 	 
Hydroxyde de sodium	<ul style="list-style-type: none"> -A température ambiante, il se présente sous forme de cristaux blanchâtres qui sont très hygroscopique. Sa dissolution dans l'eau est exothermique ; - Formule moléculaire : NaOH ; -N° CAS : 1310-73-2 ; -M^r : 39.997 g/mol ; - ρ : 2.13 g/cm³ (à 46°C). 	

Carbonate de sodium	-Poudre blanchâtre hygroscopique ; - Formule moléculaire : Na_2CO_3 ; -N° CAS : 497-19-8 ; -M ^r : 105.988 g/mol ; - ρ : 2.54 g/cm ³ (à 25°C).	
Réactif de Folin-Ciocalteu	- Solution jaunâtre avec une odeur âcre ; - Formule moléculaire : $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{NaO}_5\text{S}$; -N° CAS : 521-24-4 ; -M ^r : 260.2 g/mol ; - ρ : 1.24 g/cm ³ (à 20°C).	 
Eau distillée	- Formule moléculaire : H_2O ; -N° CAS : 7732-18-5 ; -M ^r : 18.015 g/mol ; - ρ : 0.9982 g/cm ³ (à 20°C).	

1.4. Matière première végétale

L'étude a été réalisée sur les racines de *Carthamus caeruleus* L, issue de la famille des Asteraceae. Ces racines ont subi plusieurs étapes de prétraitement afin d'obtenir une poudre fine et homogène. La conservation de cette dernière, a été faite dans un bocal en verre, à l'abri de l'air et la lumière pour éviter toute réaction avec le contenant et le milieu extérieur.

2. Méthodes

2.1. Prétraitement de la matière première végétale

La quantification des polyphénols totaux contenus dans les racines de la cardoncelle bleu nécessite une réduction de la matière végétale en poudre, Cette transformation est rendue possible en suivant les étapes ci-dessous :

- La récolte de la plante a été faite à la fin du mois d'avril dans la région de Draa-El-Mizan – Tizi Ouzou. L'identification et la reconnaissance de la plante one été effectuées au niveau du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ;
- Lavage des racines et découpage en petits rondelles ;

- Séchage à l'air libre pendant 20 jours ;
- Trituration des morceaux de racine préalablement séché dans un mortier propre en cuivre et obtention d'une poudre grossière ;
- Moulinage à l'aide d'un moulin électrique pour obtenir des granules plus fins dans le but de faciliter le contact entre le solvant et les espèces chimiques ce qui accélère leurs dissolutions ;
- Tamisage de la poudre à des fins d'éliminer les grosses particules et de ne retenir que les plus fines ;
- Conservation de la poudre obtenue à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un bocal en verre stériles hermétiquement fermés à une température ambiante.



Figure 11 : Etapes de préparation de la poudre à partir des racines de *Carthamus caeruleus* L



Figure 12 : Poudre issue du broyage des rhizome de *Carthamus caeruleus* L

2.2. Choix des facteurs

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs tels que : le pH du milieu, la durée d'extraction et le ratio soluté / solvant.

– Le pH du milieu est l'un des facteurs les plus influents car les polyphénols possèdent chacun une fonction hydroxyle comparable à celle des alcools aliphatiques non substitué et donc un milieu basique favorisera l'ionisation de la molécule et sa dissolution dans l'eau.

– La solubilisation des polyphénols, résulte de la formation de liaison avec les molécules de la solution d'extraction, cette réaction absorbe de l'énergie thermique dans le système (réaction

endothermique), et selon le principe de Le Chatelier, une augmentation de la température dans le sonicateur lors de l'extraction va favoriser positivement le rendement en augmentant la solubilité des polyphénols, de même, un allongement de la durée d'extraction avantagera la quantité de polyphénols qui passe de la phase solide vers la phase liquide.

– Le ratio soluté : solvant influence le rendement en saturant la solution d'extraction, en d'autres termes, une augmentation de la quantité de la poudre, augmentera inévitablement le taux de polyphénols dissout dans la phase liquide.

2.3. Choix de la réponse

Le nombre de réponses est spécifique à chaque étude, et dans notre cas, la réponse choisie caractérisant notre objectif est : la concentration des polyphénols exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de l'extrait (E) (mg EAG/g E).

2.4. Type de plan choisi

Nous avons utilisé un plan d'expérience de type factoriel complet comprenant uniquement des facteurs à 2 niveaux, car il nous permet d'étudier les effets que peuvent avoir plusieurs facteurs sur le rendement d'extraction des polyphénols et cela pour toutes les combinaisons de niveaux de facteurs, et par la même occasion il nous permettra d'optimiser (maximiser) les variables de réponse, de trouver un compromis satisfaisant entre elles et d'obtenir une meilleure précision sur la modélisation et la prédiction des résultats.

2.5. Construction du plan

Dans le cas de notre étude, il y a trois facteurs ($k=3$) et chaque facteur est défini par un niveau haut (+1) et bas (-1) qui seront constants pendant l'expérimentation, et d'après la relation $N=2^k$ du plan factoriel complet (où N est le nombre d'essais), notre étude nécessite la réalisation de 8 essais où chaque essai est répété trois fois ($N=8$), auxquels on rajoute 3 points supplémentaires au centre du domaine d'étude (N_0) dans le but d'évaluer l'erreur expérimentale.

Au final, le nombre d'essais à réaliser pour déterminer les facteurs influençant l'extraction des polyphénols s'élève à 27 essais.

La fonction qui lie la réponse aux facteurs est modélisée par un modèle polynomial du premier degré avec interaction (ou modèle PDAI) :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$$

Avec :

- Y : est le vecteur des réponses

- x : est la matrice du modèle qui dépend des points expérimentaux choisis pour exécuter le plan expérimental

- a : est le vecteur des coefficients

A la fin du plan d'expérience nous auront un système à 8 équations et 8 inconnus. Pour ce qui est des inconnus ils seront déterminés après expérimentation du modèle postulé.

On peut représenter le plan soit par une matrice d'expériences (unités codées) (tableau VIII) soit par une matrice d'expérimentation (unités non codées) (tableau IX), ces deux représentations comportent 4 colonnes : les noms des essais et les trois facteurs. Ces représentations sont particulièrement importantes, car elles permettent une meilleure interprétation des résultats.

Tableau VIII : Matrice d'expérience

Essai n°	Durée d'extraction (min)	pH	Ratio soluté/solvant (g:ml)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
-1	5	2	1:50
0	10	5.5	1:33
+1	15	9	1:25

Tableau IX : Matrice d'expérimentation

Essai n°	Durée d'extraction (min)	pH	Ratio soluté/solvant (g:ml)
1	5	2	1:50
2	15	2	1:50
3	5	9	1:50
4	15	9	1:50
5	5	2	1:25
6	15	2	1:25
7	5	9	1:25
8	15	9	1:25
9	10	5.5	1:33

2.6. Méthode d'extraction

2.6.1. Préparation des solutions d'extraction

2.6.1.1. Solution acide à pH = 2 et pH = 5.5

Dans un bécher de 500 ml remplie d'eau distillé, on introduit la sonde du pH-mètre et on attend la stabilisation de la valeur sur l'écran puis on ajoute progressivement quelques gouttes d'acide chlorhydrique (1 M) jusqu'à atteindre la valeur pH=2 pour la première solution, et on suit les mêmes étapes pour la préparation de la deuxième solution à pH=5.5.

2.6.1.2. Solution basique à pH=9

Dans un bécher de 500ml remplie d'eau distillé, on introduit la sonde du pH-mètre et on attend la stabilisation de la valeur sur l'écran puis on ajoute progressivement quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (1M) jusqu'à atteindre la valeur pH=9.

2.6.2. Protocole d'extraction

- Peser d'une quantité spécifique de la poudre (0.5 g, 0.75 g ou 1 g) dans une balance de précision (Kern ALT 220-5DAM).
- Transfère la poudre pesée dans un erlenmeyer préremplis avec 25 ml de solvant d'extraction.

- Placer les erlenmeyers dans un bain à ultrasons (Advantage-Lab AL04-06-230) et laisser extraire le mélange pendant une durée bien déterminée (5 min, 10 min ou 15 min) tout en couvrant le sonicateur afin d'éviter tout contact avec la lumière.

-Une fois l'extraction terminée, on filtre le mélange avec un papier filtre dans une autre fiole couvert de papier aluminium pour éviter une dégradation des polyphénols par la lumière.

2.7. Réalisation du plan d'expérience

Ayant trois facteurs à étudier, pérennant chacun deux niveaux, il convient donc de choisir un plan d'expériences factoriel complet 2^3 , où chaque essai sera répété trois fois et cela pour des raisons de fiabilité. On aura donc un nombre de 24 essais à réaliser.

Il convient aussi de mentionner qu'on désire avoir une estimation de l'erreur expérimentale, pour ce faire, on ajoute trois essais supplémentaires situés au centre du domaine d'étude. Au final, nous aurons un total de 27 essais à réaliser aléatoirement.

2.8. Méthode de dosage

La méthode décrite ci-dessous nous permet de doser les polyphénols totaux contenus dans les racines de *Carthamus caeruleus* L selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

2.8.1. Préparation des réactifs

2.8.1.1. Réactif de Folin-Ciocalteu

On prépare une dilution au 1/10 : dans une fiole de 100 ml on met 10 ml du Folin concentré + 90 ml de l'eau distillée et homogénéiser le mélange par agitation.

La conservation du réactif se fait à l'abri de la lumière et à température ambiante.

2.8.1.2. Réactif Carbonate de sodium

On prépare une solution à 10.75% (m/v) : dans une fiole de 100 ml, on met 10.75 g de la poudre de carbonate de sodium anhydre et on complète avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, puis solubiliser le mélange dans le sonicateur jusqu'à la disparition de la poudre.

2.8.2. Préparation des standards

Pour déterminer la concentration des polyphénols totaux dans notre échantillon à partir des absorbances obtenus, l'utilisation d'une courbe d'étalonnage est indispensable. Pour ce faire une série d'échantillon standard (acide gallique) a été préparée en respectant les mêmes conditions avec notre expérience.

Pour ce faire, on prépare 4 solutions (étalons) de concentration décroissante. Dans des fioles de 20ml, on introduit la quantité d'acide gallique correspondant et on complète jusqu'au trait de jauge. La gamme comprend également une solution « blanc » :

Tableau X : Gamme d'étalonnage

Solution	Pesée de l'acide gallique (mg)	Concentration (mg/ml)
S ₁ (étalon 1)	20	1
S ₂ (étalon 2)	16	0.8
S ₃ (étalon 3)	12	0.6
S ₄ (étalon 4)	08	0.4

2.8.3. Protocol de dosage

La quantification des polyphénols totaux se fait dans des tubes à essais recouvert d'aluminium selon la méthode de Folin-Ciocalteu, pour ce qui est du protocole suivit on procède comme suit:

400 µl de l'extrait + 200 µl du Folin + 2 ml de l'eau distillée + 2.4 ml de carbonate de sodium anhydre.

La préparation des solutions « blanc » et des étalons, suit la même procédure, on remplace uniquement le volume de l'extrait par de l'eau distillée.

Une fois que les mélanges préparés, on agite chaque tube pour homogénéiser puis on laisse incuber 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière avant d'être doser par spectrophotomètre à 760 nm.

2.8.4. Traitement des données expérimentales

Lors d'une expérimentation, des données brutes sont recueillies, ils se présentent généralement sous forme d'informations hétérogènes et de grandes tailles, les rendant ainsi difficiles à analyser pour l'expérimentateur, de plus et dans certains cas, de longs et fastidieux calculs peuvent être nécessaires. Pour ce faire, il existe de nos jours des logiciels composés d'outils statistiques complets permettant la mise en forme, l'exploration et l'analyse de ces données expérimentales. Dans cette présente étude, nous avons utilisé le logiciel JMP® Pro14 élaboré par la société SAS Institute Inc, ce dernier nous simplifie la construction et l'analyse des plans et de leurs variances, efface les difficultés de calcul et permis la réalisation rapide des graphes mettant ainsi en valeur les principaux résultats de l'expérimentation.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Courbe d'étalonnage

Voici le tableau XII où sont répertoriés les résultats des absorbances des différents solutions étalons.

Tableau XI : Absorbances de la série des standards (acide gallique)

Solution	Concentration en acide gallique (mg/ml)	Absorbance (nm)
S₁ (étalon 1)	1	0.54
S₂ (étalon 2)	0.8	0.387
S₃ (étalon 3)	0.6	0.301
S₄ (étalon 4)	0.4	0.165

En utilisant les données du tableau ci-dessus on peut représenter notre droit de régression linéaire (Figure 14), avec laquelle on a déterminé les concentrations de nos échantillons expérimentaux.

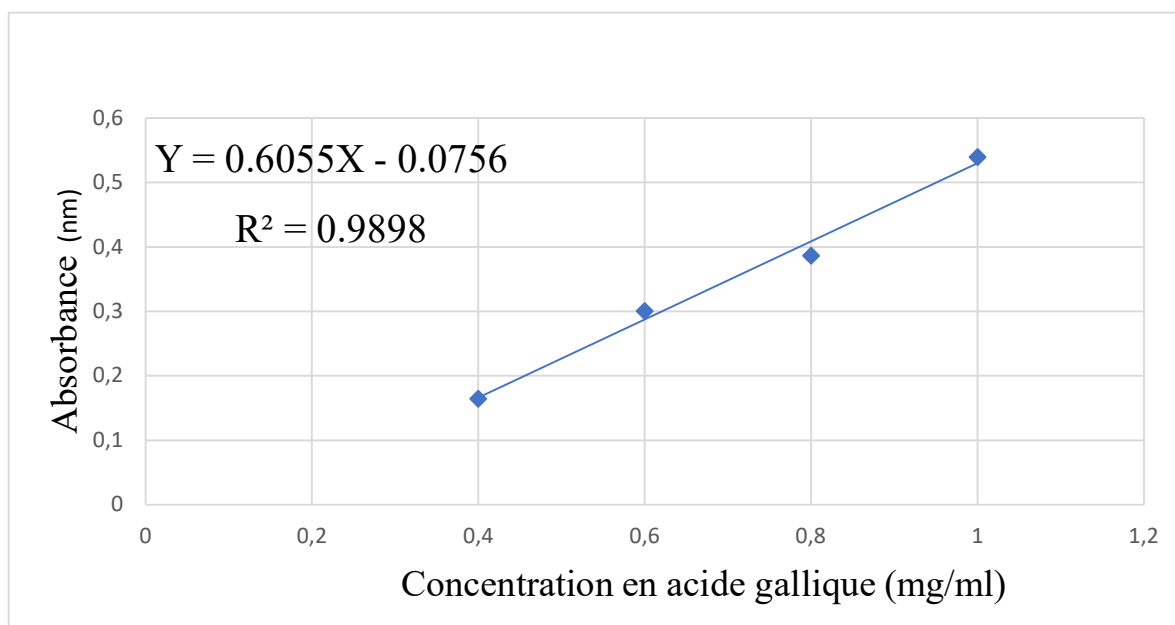


Figure 13 : Droite d'étalonnage représentant l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique

La qualité d'une méthode analytique dépend fortement de la linéarité de la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage linéaire est une indication positive que toutes les mesures futures seront proches des vraies valeurs du contenu de l'analyte dans l'échantillon [85].

Cette linéarité est généralement évaluée par le coefficient de détermination R^2 . On considère qu'un coefficient de corrélation proche de l'unité $R^2 = 1$ est suffisant pour conclure que la courbe d'étalonnage est linéaire. Le $R^2 = 0.9898$ obtenu pour notre courbe étalonnage, a montré la bonne relation linéaire entre la concentration et l'absorbance [86].

2. Résultats des expériences

Les résultats obtenus à partir des 27 expériences randomisées sont consignées dans le tableau XI, Le point au centre est positionné à la fin du plan pour la présentation des essais. Mais l'ordre d'exécution des essais ne suit pas forcément l'ordre de présentation.

Tableau XII : Résultats expérimentaux

Essai n°	Durée d'extraction	pH	Rapport volume/masse	Absorbances (nm)	Concentration polyphénols (mg EAG/ml)	Quantité polyphénols (mg EAG)	mg EAG/ g E
1	-1	-1	-1	0,15	0,373	9,315	18,629
				0,155	0,381	9,521	19,042
				0,155	0,381	9,521	19,042
2	+1	-1	-1	0,157	0,384	9,604	19,207
				0,159	0,387	9,686	19,372
				0,159	0,387	9,686	19,372
3	-1	+1	-1	0,2	0,455	11,379	22,758
				0,198	0,452	11,296	22,593
				0,204	0,462	11,544	23,088
4	+1	+1	-1	0,207	0,467	11,668	23,336
				0,204	0,462	11,544	23,088
				0,202	0,458	11,462	22,923
5	-1	-1	+1	0,209	0,470	11,751	11,751
				0,209	0,470	11,751	11,751
				0,212	0,475	11,874	11,874
6	+1	-1	+1	0,204	0,462	11,544	11,544
				0,201	0,457	11,420	11,420
				0,204	0,462	11,544	11,544
7	-1	+1	+1	0,224	0,495	12,370	12,370
				0,224	0,495	12,370	12,370
				0,222	0,491	12,287	12,287
8	+1	+1	+1	0,224	0,495	12,370	12,370
				0,223	0,493	12,329	12,329
				0,23	0,505	12,618	12,618
9	0	0	0	0,202	0,458	11,462	15,282
				0,212	0,475	11,874	15,833
				0,204	0,462	11,544	15,392

On peut représenter ce plan par un système à 3 dimensions (Figure 13) en indiquant le domaine d'étude et les points d'expériences. Les points d'expériences ont pour coordonnées les niveaux bas et hauts des facteurs.

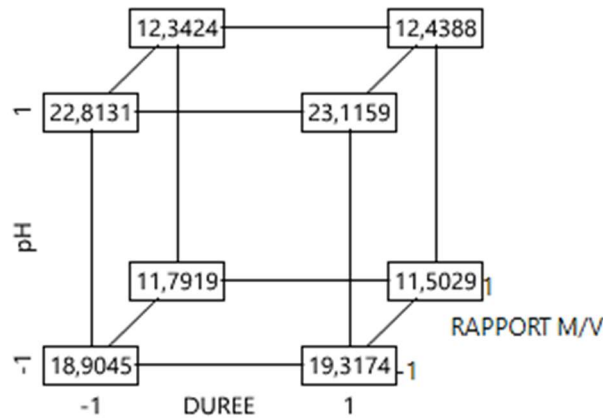


Figure 14 : Graphique en cube des points d'expériences

3. Validation du modèle mathématique

3.1. Adéquation du modèle

Grace au logiciel JMP® 14 Pro, Il est maintenant possible d'obtenir directement le modèle mathématique suivant :

$$Y = 16.528 + 0.0654x_1 + 1.149x_2 - 4.509x_3 + 0.034x_1x_2 - 0.114x_1x_3 - 0.778x_2x_3 + 0.062x_1x_2x_3$$

L'analyse de l'ajustement est représentée dans le tableau XIII, on remarque que le modèle mathématique a donné un coefficient de détermination $R^2 = 0.999216$, indiquant que seulement 0,001% de la variation n'a pas pu être expliquée par notre modèle.

Le coefficient de détermination ajusté $R^2_a = 0.998874$, a confirmé que le modèle était adéquat.

Tableau XIII : Résumé de l'ajustement

R carré	0.999216
R carré ajusté	0.998874
Racine de l'erreur quadratique moyenne	0.161895
Moyenne de la réponse	16.52835
Observations (ou sommes pondérées)	24

En termes de représentation, la figure 15, donne une évaluation visuelle du modèle établi des valeurs observées en fonction des valeurs prédites.

Nous remarquons dans la figure 15, que la major partie des points, représentant la différence entre la valeur prédite et la valeur observé, sont contenue dans l'intervalle de confiance (représenté en rouge) de la droite de la fonction d'identité. Ce qui se traduit mathématiquement par un coefficient de détermination qui est très acceptable, représentant ainsi la capacité du modèle mathématique à prédire les résultats.

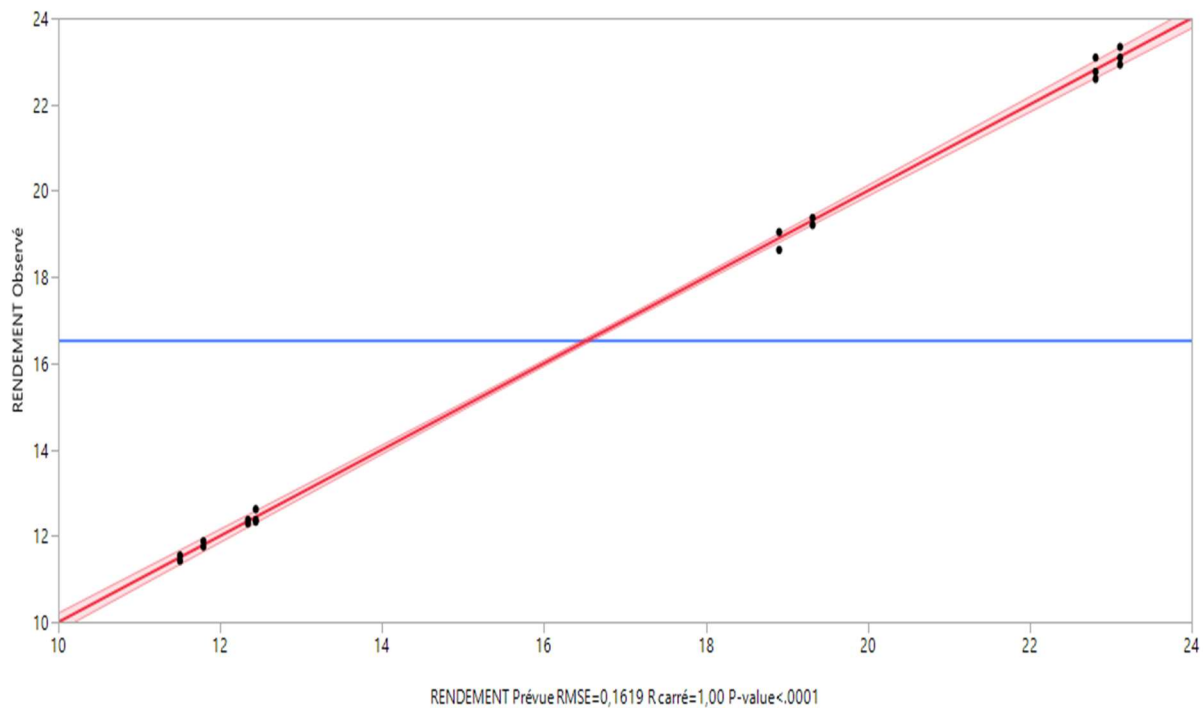


Figure 15 : Représentation graphique du rendement observé en fonction du rendement estimé pour la quantité des polyphénols

3.2. Défaut d'ajustement

Le tableau XIV affiche les deux composants de la variance des résidus, à savoir le manque d'ajustement du modèle mathématique choisie et l'erreur pur.

D'après les résultats du tableau ci-dessous, on observe que la probabilité $P = 0.0793$ est supérieure au risque $\alpha = 0.05$ ce qui signifie que les carrés moyens du défaut d'ajustement et de l'erreur pure sont comparable.

En d'autres termes, les erreurs engendrées par notre model sont dû aux erreurs expérimentales et le modèle choisi permet d'expliquer la majeure partie des variations observées lors de l'expérimentation.

Tableau XIV : Défaut d'ajustement

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Défaut d'ajustement	1	0.09205460	0.092055	3.5122
Erreur pure	16	0.41935984	0.026210	Prob. > F
Erreur totale	17	0.51141444		0.0793

3.3. Analyse de la variance

L'analyse de variance consiste à étudier la dispersion des réponses dues aux facteurs. Selon les données du tableau XV, la probabilité P est inférieure à la valeur du risque $\alpha = 0.05$ donc notre modèle permet d'expliquer la plus grande partie des dispersions des réponses.

Pour ce qui est de la partie inexpliquée, appelé résidus, elle est infime et selon l'étude du défaut d'ajustement faite précédemment, ce résidu correspond à l'erreur expérimental.

En conclusion, le plan factoriel complet choisi, a sus démontrer qu'il existait une relation entre la variation des facteurs et celle du rendement.

Tableau XV : Analyse de la variance

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	7	534.67082	89.1118	2962.178
Résidu (Erreur)	16	0.51141	0.0301	Prob. > F
Total corrigé	23	535.18223		<0.0001

4. Interprétation des coefficients

4.1. Estimation des coefficients

Pour faire ces calculs on ne tient en compte que des 24 essais du plan factoriel. On ne prend pas en compte les points centraux. En effet, ces points sont des points de contrôle et non des points de calcul. Ils servent à calculer une estimation de l'erreur expérimentale.

Le logiciel JMP® Pro14, calcule le coefficient constant, les effets principaux et les interactions d'ordre 2 et 3 (Tableau XVI).

Tableau XVI : Estimation des coefficients

Terme	Estimation
Constante	16.528
Durée d'extraction (DE)	0.0654
pH	1.149
Ration soluté:solvant (RSS)	-4.509
pH*DE	0.034
RSS*DE	-0.114
RSS*pH	-0.778
RSS*pH*DE	0.062

Selon le tableau XVI, en comparant les coefficients entre eux, on remarque que la durée d'extraction, l'interaction entre ce dernier et le pH et l'interaction entre trois facteurs sont les moins influents. Pour ce qui est du pH, du ratio soluté : solvant et des interactions impliquant ce dernier avec la durée d'extraction et le pH, ils ont tous une valeur du coefficient qui nous laisse à présager qu'il possède une influence sur le rendement. Mais aucun d'entre eux ne peut être négligé, pour le moment, car l'importance d'un coefficient est évaluée par des notions de probabilités qui seront détaillées par la suite.

La figure 16, qui représente l'évolution du rendement en fonction des niveaux des trois facteurs, montre que :

- Le rendement d'extraction diminue avec l'augmentation du ratio soluté : solvant, ce qui traduit un effet négatif sur la réponse ;

- Une augmentation du rendement est constaté avec l'augmentation du pH de la solution d'extraction, traduisant un effet positif sur la réponse ;
- Un rendement qui reste particulièrement stable malgré une variation dans la durée d'extraction, présumant une absence d'influence de ce facteur sur la réponse.

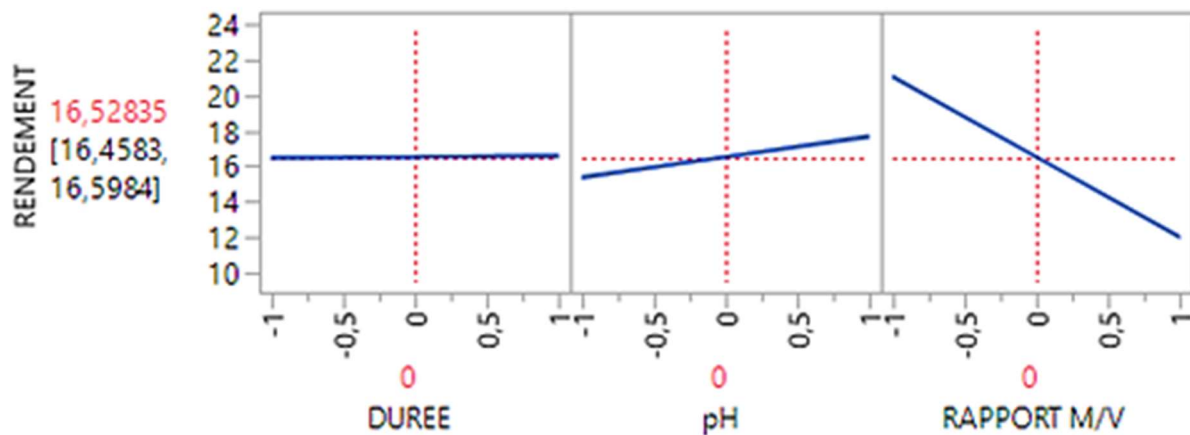


Figure 16 : Profileur de prévision du rendement en fonction des facteurs

4.2. Signification des coefficients

Jusqu'à présent, nous avons jugé l'importance des coefficients en les comparant entre eux. Mais nous n'avons aucun étalon pour comparer tous les coefficients et indiquer ceux qui doivent être conservés et ceux qui prouvent être éliminés du modèle mathématique final. Cet étalon est appelé variance des coefficients, il permet de tester si un coefficient est significatif ou non [80].

Dans le tableau ci-dessous (Tableau XVII), on a les p-value des facteurs et des interactions.

Tableau XVII : Estimation des effets

Source	Somme des carrés	<i>f</i> de Fisher	<i>p</i> -value
Durée d'extraction (DE)	0.10257	3.9133	0.0654
pH	31.69519	1209.279	<0.0001
Ratio soluté:solvant (RSS)	488.02357	18619.75	<0.0001
pH*DE	0.02841	1.0840	0.3133
RSS*DE	0.30941	11.8049	0.0034
RSS*pH	14.51167	553.6694	<0.0001
RSS*pH*DE	0.09205	3.5122	0.0793

Dans notre étude, la durée d'extraction à une p -value supérieur à α , il n'est donc pas significatif et les réponses calculées ne seront pas très différentes, que l'on utilise un modèle final avec ou sans ce coefficient. Cette non significativité peut être expliquée par l'étroitesse du domaine de variation du facteur, pour rappeler ce domaine est compris entre [5 – 15] min. On peut explorer des niveaux plus hauts pour vérifier cette hypothèse, mais dans notre cas, l'intervalle choisi n'a pas d'influence sur le rendement d'extraction.

Les deux facteurs restants, le pH et le rapport soluté : solvant, sont tous les deux significatifs car ils ont tous une p -value inférieure à la probabilité d'acceptation des coefficients = 0.05, la différence réside dans le fait que le pH influence positivement sur la réponse ce qui veut dire qu'une élévation du pH des milieu d'extraction a tendance à augmenter le taux de polyphénols totaux extrait. Par contre, le rapport soluté : solvant influence négativement. En effet, les extractions de poudre d'une masse supérieure à 0.5g produisent des rendements de plus en plus faibles. Ce phénomène peut être expliqué soit par une durée d'extraction qui n'est pas assez suffisante pour permettre le passage de tous les polyphénols contenus dans la phase solide vers la phase liquide, ou par le fait que le volume d'extraction est insuffisant pour permettre la dissolution des tous les composants contenus dans la matière végétale car on est arrivé à la limite de saturation.

Les interactions entre deux facteurs impliquant le ratio soluté : solvant, présentent toutes une p -value inférieure au risque alpha ainsi on peut dire qu'ils sont significatifs. En premier lieu nous avons l'effet du pH qui compense celui du ratio, car une augmentation du pH de la solution augmentera la fraction des polyphénols ionisée qui passera plus facilement dans la solution aqueuse, provoquant ainsi sa saturation. En deuxième lieu, la compensation de la durée d'extraction fait en sorte que les ultrasons auront le temps nécessaire pour faire éclater toutes les cellules et libérer les polyphénols dans la solution, par contre une fois la saturation atteinte cette compensation n'aura plus d'effet.

En observant les valeurs des coefficients qui sont de signe négatif, on peut comprendre que les facteurs, pH et durée d'extraction, impliqués dans cette interaction, compensent positivement l'effet négatif du ratio, mais cette compensation n'est pas assez pour que l'interaction influence positivement sur le rendement

Et puis, nous avons l'interaction entre la durée d'extraction et le pH avec une p -value qui est supérieur au alpha ce qui veut dire que l'interaction est non significative, en d'autres termes l'effet d'augmenter le pH n'influence pas l'effet d'augmenter la durée d'extraction.

Pour ce qui est de l'interaction entre trois facteurs, l'analyse de la variance a démontré une p -value supérieure à la valeur du risque alpha et par conséquent l'interaction elle-même n'est pas significative.

On peut donc représenter notre modèle mathématique sans inclure les facteurs non significatifs :

$$Y = 16.528 + 1.149x_2 - 4.509x_3 - 0.114x_1x_3 - 0.778x_2x_3$$

Enfin, il existe une représentation graphique qui permet de visualiser les interactions significatives et celle qui ne sont pas. En principe, chaque facteur est représenté par une droite, si une interaction est significative donc les deux droites représentant les facteurs de l'interaction ne seront pas parallèles par contre si elles sont parallèles cela signifie que l'interaction n'a aucun effet sur la réponse. Dans la figure 17, on peut observer qu'il y a deux interactions avec des droites non parallèles, l'interaction entre deux facteurs impliquant le ratio, confirmant une autre fois l'analyse faite précédemment. Pour les autres interactions entre deux facteurs impliquant le pH avec la durée et l'interaction entre trois facteurs, la notion de parallélisme peut être observée ce qui confirme que ces interactions sont non significatives.

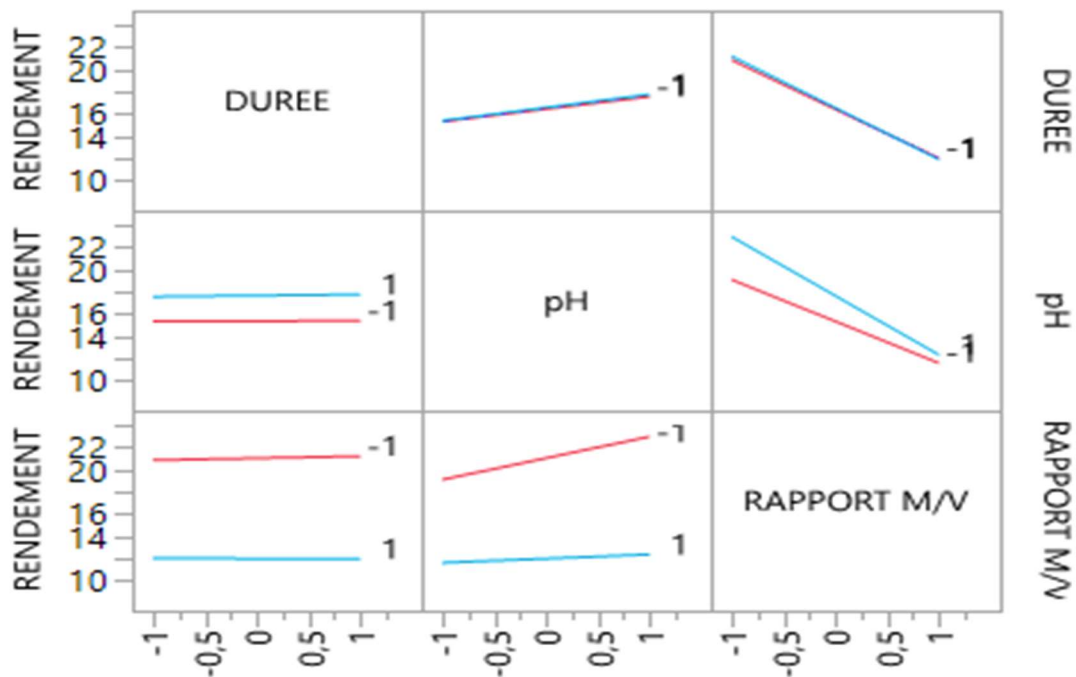


Figure 17 : Profils d'interactions

5. Analyse de résidus

On peut encore s'assurer qu'il ne reste plus d'information structurée dans les résultats en examinant le graphe des résidus. Il est donc important de regarder comment les résidus se

répartissent en fonction de différents critères. Si le nuage de point est aligné aléatoirement le long d'une droite on conclut que les résidus sont normalement distribués. Seules des causes aléatoires sont alors à l'origine de la dispersion des résidus autour de leurs moyennes. D'après les résultats obtenus et représentés dans la figure 18, l'analyse des résidus fait apparaître des dispositions remarquables, il reste donc un peu d'information à extraire.

Dans ce cas, l'hypothèse d'un modèle du premier degré avec interactions (modèle PDAI) est probablement à remettre en cause et il faut passer à un modèle du second degré.

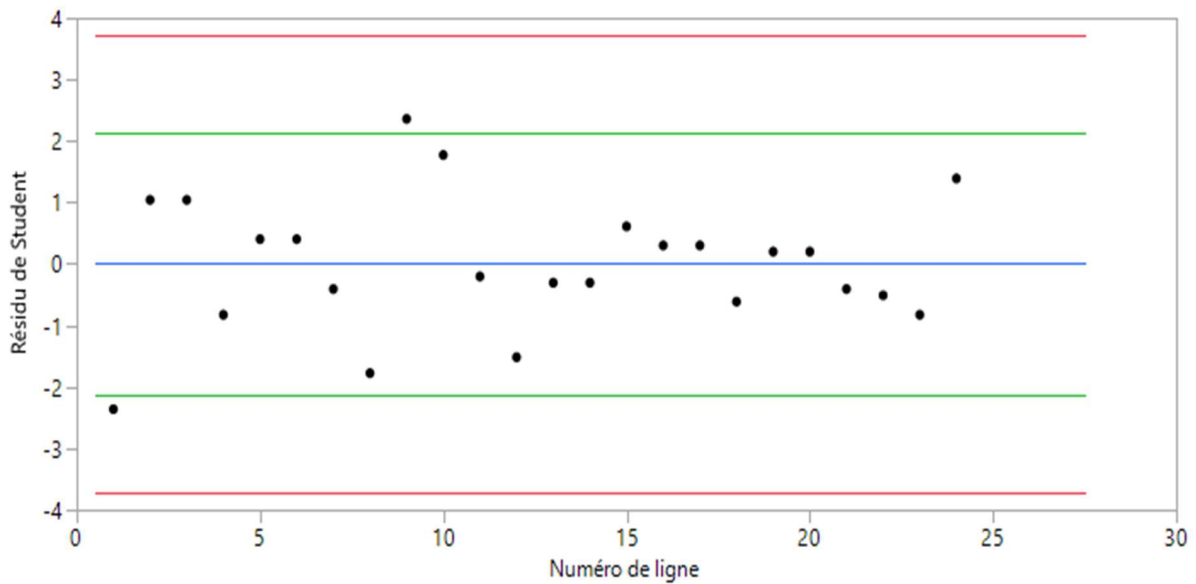


Figure 18 : Représentation graphique des résidus de quantité des polyphénols en fonction des valeurs prévues

6. Courbe isoréponse

Pour trouver les conditions opératoires qui nous permettent d'obtenir un rendement optimal, il faut tracer une courbe isoréponse. Dans la figure 19 ci-dessous, sont représentées les réponses obtenues en fonction de la variation de leurs niveaux.

En se basant sur l'échelle du rendement, on peut remarquer que les taux maximaux sont représentés dans la partie gauche de la figure 19, cette partie correspond à la zone du niveau bas de la ration (-1).

A l'aide du logiciel on peut déterminer les niveaux des deux facteurs restants. Pour notre étude, la valeur de ce rendement s'élève à 23.336 mg EAG/g E, et les coordonnées de ce point sont les niveaux hauts des deux facteurs : le pH et la durée d'extraction.

En résumé, pour atteindre la réponse maximale dans le domaine d'étude, déterminée précédemment, on doit respecter les conditions suivantes : un pH de la solution d'extraction = 9, un ratio soluté : solvant = 1 :50 et une durée d'extraction = 15 min.

Pour ce qu'est des expériences utilisant un poids pondéral de matière végétale égale à 1g (ration 1:25), les résultats obtenus sont les plus faibles, en revanche on constate une augmentation progressive des réponses avec un allongement de la durée d'extraction, ce qui laisse à présager que des rendements dépassant les 23% peuvent être atteints si on réalise des extractions pendant des durées dépassant les 15 min.

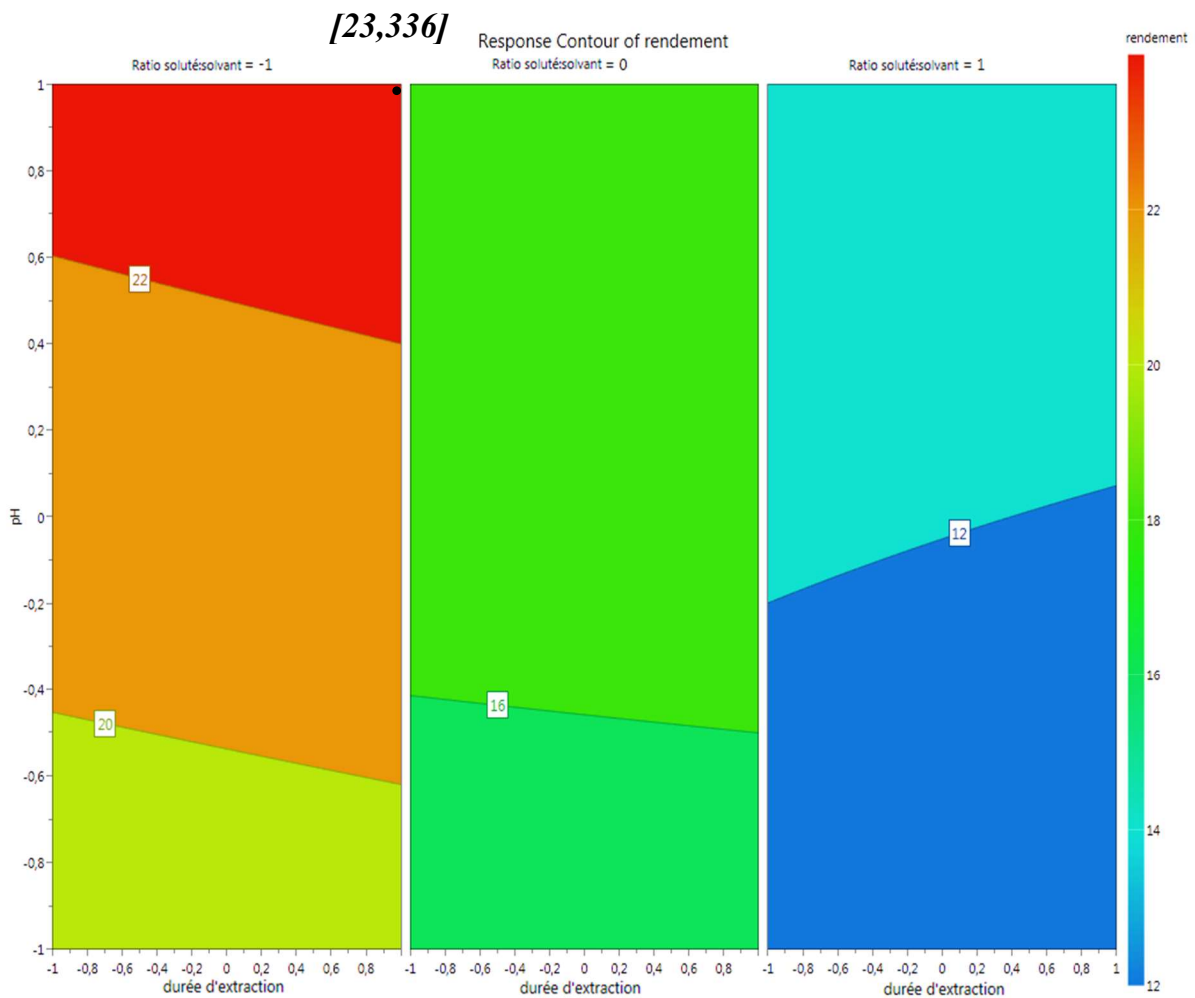


Figure 19 : Courbe isoréponse de la quantité des polyphénols en fonction du ratios soluté:solvant, du pH et de la durée d'extraction

7. Comparaison avec d'autres techniques d'extractions

D'autres techniques d'extraction des polyphénols ont été décrites dans la littérature, parmi celles qui nous intéressent on citera : l'extraction par liquide pressurisé (ASE) [11], l'extraction par la méthode de Soxhlet [87] et l'extraction par macération [88].

Les taux de rendements et les conditions utilisés pour chaque expérience sont représentés dans le tableau XVIII, de cette façon on peut réaliser une comparaison avec nos propres résultats.

Tableau XVIII : tableau comparatif des rendements de différentes techniques d'extraction

Techniques	Conditions opératoires	mg EAG/ g E
Extraction par liquide pressurisé (ASE) [11]	Extraction de 8g de poudre à 40°C pendant 30 min avec de l' éthanol comme solvant d'extraction	24
Extraction par macération [88]	Extraction de 0.8g de poudre à température ambiante pendant 2 heures avec de l' éthanol comme solvant d'extraction	2.675
Extraction avec appareil de Soxhlet [87]	Extraction de 26g de poudre en 5 cycles avec de l' éthanol comme solvant d'extraction	0.063
Extraction par ultrasons (notre étude)	Extraction de 0.5g de poudre dans 25ml à température ambiante pendant 15 min dans une solution à pH=9 dans un bain à ultrasons	23.336

En analysant le tableau ci-dessus, on note que l'extraction par ultrasons permet un meilleur rendement par rapport aux extractions utilisant la macération ou l'appareil de Soxhlet, de plus ce dernier utilise la chaleur ce qui peut induire une dégradation des composés thermolabiles comme les polyphénols. Pour la méthode par liquide pressurisé, le rendement obtenu est légèrement supérieur au nôtre, le seul inconvénient de cette technique, est l'usage de température dépassant les 60°C, ce qui peut provoquer la thermolyse des polyphénols.

Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à optimiser un procédé d'extraction liquide-solide des polyphénols à partir des racines *Carthamus caeruleus* L. Cette plante d'origine méditerranéenne est connue pour ces vertus antioxydants, antibactériens et cicatrisants dans la médecine traditionnelle sous forme de crème.

Des screening photochimiques de la plante issus de différentes études, ont révélé la présence d'une grande variété de polyphénols comme les anthocyanes, les flavones et les flavonols. Ces composés sont connus pour leur capacité à absorber dans UV ce qui nous permet de les doser par spectrophotométrie.

Plusieurs techniques s'offrent à nous pour extraire ces composés polyphénoliques à partir d'une matière végétale. Dans notre étude la méthode choisie est celle utilisant les ultrasons. L'intérêt que nous portant à cette méthode est dû à son efficacité, son faible cout mais également sa capacité à réaliser des extractions à des températures modérés, ce qui convient parfaitement aux compose thermolabile comme les polyphénols.

Pour réaliser à bien notre étude, une stratégie de planification est de mise, elle nous permet de modéliser nos expériences et par conséquent de mieux les organiser. Pour cela il existe plusieurs stratégies, dans notre cas, nous avons adopté le plan factoriel complet car il nous permet d'obtenir les meilleurs résultats tout en étant efficace et économique.

Dans notre plan d'expérience nous avons analysé l'influence des trois facteurs sur le rendement d'extraction des polyphénols issus des racines *Carthamus caeruleus* L. Après expérimentation, un rendement maximal égal à 23.336 mg EAG/g E a été obtenu en respectant les conditions opératoires optimales suivant :

$$\text{pH} = 9 - \text{durée d'extraction} = 15 \text{ min} - \text{ratio soluté} : \text{solvant} = 1 : 50 .$$

On notera aussi que l'analyse des résidus fait apparaître des dispositions remarquables, ce qui signifie que l'hypothèse d'un modèle du premier degré avec interactions (modèle PDAI), est probablement à remettre en cause car il nous reste certaines informations à extraire. Pour cela, on peut faire appel aux plans pour surfaces de réponse.

Enfin, il existe encore d'autres facteurs susceptibles d'influencer le rendement d'extraction non exploités par notre étude, parmi ces facteurs on peut citer : la température d'extraction et la fréquence des ondes ultrasons. De même, une préparation d'une forme galénique semi-solide à base d'extrait de cette plante peut représenter une bonne alternative aux médicaments chimiques existant et cela par la présence d'une large gamme d'agents antimicrobiens naturels pouvant faire face au phénomène de résistance des germes.

Références bibliographiques

1. Tison J-M, Foucault B de. Flora Gallica: Flore de France. Mèze: Biotope Editions; 2014. 1195 p.
2. Floc'h E, Boulos L, Véla E. Catalogue Synonymique Commenté De La Flore De Tunisie. 2010. 504 p.
3. NT.WS B. FLEURS D'ALGERIE. ENTREPRISE NATIONALE DU LIVRE ALGER; 1984.
4. CalPhotos: *Carthamus creticus*; Smooth Distaff Thistle [Internet]. [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+1115+1282
5. Growth enrichment of *Carthamus tinctorius* (L) and reduction in dosage of chemical fertilizers with application of plant growth promoting rhizobacteria – IJAAR [Internet]. International Network for Natural Sciences. 2017 [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: <https://innspubnet.wordpress.com/2017/08/23/growth-enrichment-of-carthamus-tinctorius-l-and-reduction-in-dosage-of-chemical-fertilizers-with-application-of-plant-growth-promoting-rhizobacteria-ijaar/>
6. Frédéric. *Carthamus caeruleus* L. (cardoncelle bleue) | Préservons la Nature [Internet]. [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: <https://preservons-la-nature.fr/blog/?p=1869>
7. Glaucous star thistle: pest [Internet]. [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.agric.wa.gov.au/pest-plants/glaucous-star-thistle-pest>
8. Dajue L, Mündel H-H. Safflower, *Carthamus Tinctorius* L. Bioversity International; 1996. 83 p.
9. Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique; 1962. 626 p.
10. Bouhenni I, Benkabilia I. Evaluation d'activité anti-inflammatoire du *Carthamus caeruleus* L « Etude in vivo –chez les souris NMRI ». 11 juill 2019 [cité 16 juill 2021]; Disponible sur: <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13010>
11. Toubane A, Rezzoug SA, Besombes C, Daoud K. Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus Caeruleus* L. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Ind Crops Prod.* 1 mars 2017;97:620-31.
12. Dahmani MM, Laoufi R, Selama O, Arab K. Gas chromatography coupled to mass spectrometry characterization, anti-inflammatory effect, wound-healing potential, and hair growth-promoting activity of Algerian *Carthamus caeruleus* L (Asteraceae). *Indian J Pharmacol.* juin 2018;50(3):123-9.
13. Sadou FZ, Hemoudi N, Rabhi N, Kecili F. Formulation d'une crème anti-brûlure à base de plante *Carthamus caeruleus* L. 14 sept 2020;189.
14. Benhamou A, Fazouane F. Ethnobotanical study, phytochemical characterization and healing effect of *Carthamus coeruleus* L. rhizomes. *Int J Med Aromat Plants.* 1 mars 2013;3.
15. Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhiri F, Khenouf S, Charef N, Harzallah D, et al. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comun Sci.* 1 déc 2010;1(2):128-128.
16. Karima S, Sahli F, Mihoub Z. Antimicrobial activity of an Algerian medicinal plant: *Carthamus caeruleus* L. *Pharmacogn Commun.* 4 oct 2013;3:71-6.

Références bibliographiques

17. DAHMANI MM. Evaluation de l'activité biologique des polyphénols de *Carthamus caeruleus* L (Asteraceae) [Internet] [These de doctorat]. [BOUMERDES]: UNIVERSITE DE M'HAMED BOUGUERA; 2018. Disponible sur: <http://dlibrary.univ-boumerdes.dz:8080/bitstream/123456789/5642/1/DAHMANI%20.pdf>
18. SAFFIDINE K. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. [Internet] [These de doctorat]. [Setif]: Ferhat Abbas; 2015. Disponible sur: <https://tdoctorat.univ-setif.dz/2015/SNV/SAFFIDINE%20KARIMA.pdf>
19. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. CRC Press; 2010. 998 p.
20. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Mol Basel Switz.* 21 oct 2010;15(10):7313-52.
21. Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res.* 18 août 2000;47(3):419-25.
22. Bruneton J. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4e édition. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 2009.
23. Cheyner V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr.* janv 2005;81(1 Suppl):223S-229S.
24. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 15 mars 1998;330(Pt 3):1173-8.
25. Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radic Res.* févr 1999;30(2):153-62.
26. Gee JM, Johnson IT. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem.* sept 2001;8(11):1245-55.
27. Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci.* mars 2009;14(3):125-32.
28. Liu H, Zhang L, Lu S. Evaluation of Antioxidant and Immunity Activities of Quercetin in Isoproterenol-Treated Rats. *Molecules.* 10 avr 2012;17(4):4281-91.
29. Stafford HA. Flavonoid Metabolism. CRC Press; 1990. 318 p.
30. Wollenweber E, Wehde R, Dörr M, Lang G, Stevens JF. C-methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry.* déc 2000;55(8):965-70.
31. Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res.* 1 sept 2000;113(3):287-99.
32. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández Ma de L, Páez-Hernández MaE, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 15 avr 2009;113(4):859-71.

Références bibliographiques

33. Macheix J-J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques; 2005. 212 p.
34. ZIMMER N, CORDESSE R. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. INRAE Prod Anim. 17 juin 1996;9(3):167-79.
35. Kundu JK, Surh Y-J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. Cancer Lett. 8 oct 2008;269(2):243-61.
36. Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, et al. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. Curr Biol. 27 janv 2009;19(2):169-75.
37. Galanakis CM. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. 1er édition. Woodhead Publishing; 2018. 433 p.
38. Souto EB, Sampaio AC, Campos JR, Martins-Gomes C, Aires A, Silva AM. Chapter 2 - Polyphenols for skin cancer: Chemical properties, structure-related mechanisms of action and new delivery systems. In: Atta-ur-Rahman, éditeur. Studies in Natural Products Chemistry [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 10 juill 2021]. p. 21-42. (Bioactive Natural Products; vol. 63). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128179017000022>
39. Deshpande SS, Sathe SK, Salunkhe DK. Chemistry and safety of plant polyphenols. Adv Exp Med Biol. 1984;177:457-95.
40. Xiao JB, Högger P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. Curr Med Chem. 2015;22(1):23-38.
41. Rosillo MA, Alarcón-de-la-Lastra C, Sánchez-Hidalgo M. An update on dietary phenolic compounds in the prevention and management of rheumatoid arthritis. Food Funct. 13 juill 2016;7(7):2943-69.
42. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. Am J Clin Nutr. janv 2017;105(1):10-22.
43. Ghosh D, Scheepens A. Vascular action of polyphenols. Mol Nutr Food Res. mars 2009;53(3):322-31.
44. Bajčan D, Harangozo L, Hrabovská D, Bončíková D. Optimizing conditions for spectrophotometric determination of total polyphenols in wines using Folin-Ciocalteu reagent. J Microbiol Biotechnol Food Sci. 1 févr 2013;2:1271-80.
45. Self R, Belton PS. Extraction of Organic Analytes from Foods: A Manual of Methods. Cambridge, U.K: Royal Society of Chemistry; 2005. 410 p.
46. Luque de Castro MD, García-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Anal Chim Acta. 10 août 1998;369(1):1-10.
47. Dastmalchi K, Dorman HJD, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Lebensm-Wiss le Technol Food Sci Technol Sci Technol Aliment. 1 avr 2008;41(3):391-400.

Références bibliographiques

48. Panier P, Riba JP, Couderc JP. Extraction Solide—Liquide avec Réaction Chimique en Couche Fluidisée. *Chem Eng J.* 1 janv 1982;24(2):133-42.
49. Kasiramar G. SIGNIFICANT ROLE OF SOXHLET EXTRACTION PROCESS IN PHYTOCHEMICAL RESEARCH. 14 avr 2019;7:43-7.
50. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 1 août 2013;117(4):426-36.
51. Gil-Chávez GJ, Villa JA, Ayala-Zavala JF, Heredia JB, Sepulveda D, Yahia EM, et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013;12(1):5-23.
52. Ani TA, Calinescu I, Lavric V. Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Sci Bull Ser B Chem Mater Sci.* 1 janv 2012;74:129-42.
53. Matovic MD. Biomass Now: Sustainable Growth and Use. BoD – Books on Demand; 2013. 556 p.
54. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn Rev.* 30 nov 2006;1.
55. Zhang H-F, Yang X-H, Wang Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends Food Sci Technol.* 1 déc 2011;22(12):672-88.
56. BOUTAYEB A. Etude bibliographique sur les huiles essentielles et végétales [Licence]. [Maroc]: Ibn Tofail; 2013.
57. Mottaleb MA, Sarker SD. Accelerated solvent extraction for natural products isolation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;864:75-87.
58. Dionex™ ASE™ 350 - Extracteur par solvant by Dionex | DirectIndustry [Internet]. [cité 17 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.directindustry.fr/prod/dionex/product-28284-1124221.html>
59. Povey MJW. Ultrasonics of food. *Contemp Phys.* 1 nov 1998;39(6):467-78.
60. Knorr D, Zenker M, Heinz V, Lee D-U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci Amp Technol.* 15(5):261-6.
61. Mason TJ. Power ultrasound in food processing-the way forward. *Ultrasound Food Process.* 1998;105-26.
62. Povey MJW, McClements DJ. Ultrasonics in food engineering. Part I: Introduction and experimental methods. *J Food Eng.* 1 janv 1988;8(4):217-45.
63. Mason TJ, Riera E, Vercet A, Lopez-Buesa P. 13 - Application of Ultrasound. In: Sun D-W, éditeur. *Emerging Technologies for Food Processing* [Internet]. London: Academic Press; 2005 [cité 7 juill 2021]. p. 323-51. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126767575500153>

Références bibliographiques

64. Shukla TP. Microwave ultrasonics in food processing. *Cereal Foods World*. 1992;37(4):332.
65. BARBOSA-CANOVAS GV, RODRIGUEZ JJ. Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Aust*. 2002;54(11):513-20.
66. Esclapez MD, García-Pérez JV, Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev*. 3 mai 2011;3(2):108.
67. Patist A, Bates D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 1 avr 2008;9(2):147-54.
68. Villamiel M, de Jong P. Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *J Agric Food Chem*. 1 févr 2000;48(2):472-8.
69. Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic Biol Med*. 1 sept 1992;13(3):247-70.
70. Soria AC, Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Technol*. 1 juill 2010;21(7):323-31.
71. Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *J Agric Food Chem*. 10 juin 2009;57(11):4988-94.
72. Prommajak T, Surawang S, Rattanapanone N. Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (*Houttuynia cordata* Thunb.). *Songklanakarin J Sci Technol*. 1 févr 2014;36.
73. Chen Y-H, Yang C-Y. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity for the Valorization of *Elaeocarpus serratus* L. Leaves. *Processes*. oct 2020;8(10):1218.
74. Abe E, Delye SG, Alvarez JC. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. *Ann Toxicol Anal*. 2010;22(2):51-9.
75. Kister H. *Distillation Design*. 1st edition. New York: McGraw-Hill Education; 1992. 710 p.
76. Lamb JD, Peterson RT. Coalescence Extraction: A Novel, Rapid Means of Performing Solvent Extractions. *Sep Sci Technol*. 1 oct 1995;30(17):3237-44.
77. Dupuy A. Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huile essentielle d'agrumes [Internet] [phdthesis]. AgroParisTech; 2010 [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00626547>
78. Dreesbeke J-J, Fine J, Saporta G, utilisations (France) A pour la statistique et ses, France S de statistique de. *Plans d'expériences: applications à l'entreprise*. Editions TECHNIP; 1997. 534 p.
79. Linder R. *Les plans d'expériences: Un outil indispensable à l'expérimentateur*. 1er édition. Paris: Presses de l'école nationale des Ponts et Chaussées; 2005. 328 p.

Références bibliographiques

80. Goupy J, Creighton L. Introduction aux plans d'expériences - 3ème édition - Livre+CD-Rom. 3e édition. Paris: Dunod; 2006. 336 p.
81. Poinot D. Statistiques pour statophobes [Internet]. 1^{re} éd. 2004. 142 p. Disponible sur: <http://perso.univ-rennes1.fr/denis.poinot>
82. Hamida I. Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basés sur le système Fenton-like (H₂O₂/Cu) [These de doctorat]. 2020.
83. Mendham J. Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck Supérieur; 2005. 926 p.
84. Tinsson W. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Springer Science & Business Media; 2010. 536 p.
85. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 15 juill 2002;774(2):215-22.
86. Food and Drug Administration, éditeur. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics [Internet]. FDA; 2020 [cité 5 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>
87. Ayad M. Optimisation de l'extraction des substances bioactives d'une plante médicinale « Carthamus caeruleus L. » [Internet] [Mémoire]. université Akli Mouhand Oulhadje-Bouira; 2018 [cité 5 oct 2021]. Disponible sur: <http://dspace.univ-bouira.dz:8080/jspui/handle/123456789/6683>
88. Allouache S, Ghernoub Bachir. Etude des composés phénoliques et terpénique d' une plante médicale traditionnelle [Mémoire]. [Université de Bejaïa]; 2017.

Résumé

Au cours des dernières décennies, les bienfaits potentiels pour la santé des polyphénols végétaux comme ceux contenus dans le plant *Carthamus caeruleus* L en tant qu'antioxydants ont suscité beaucoup d'intérêt.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à optimiser le procédé d'extraction par ultrasons des polyphénols contenus dans les racines de *Carthamus caeruleus* L en utilisant un plan factoriel complet. Cette étude a été réalisée en faisant varier les deux niveaux des trois facteurs choisis : le pH de la solution d'extraction, le ratio soluté : solvant et la durée d'extraction dans le sonicateur. Après expérimentation, deux de ces facteurs ont été jugés influents sur le rendement d'extraction, à savoir le pH de la solution d'extraction et la durée d'extraction. Et par la suite, nous avons trouvé que les conditions d'extraction optimales suivant : pH = 9, durée d'extraction = 15min et ration soluté : solvant =1 :50, nous permettait d'obtenir un rendement maximal égale à 23.336 mg EAG/g E.

Mots clés : Plans d'expérience, plan factoriel complet, extraction par ultrasons, polyphénols, *Carthamus Caeruleus* L.

Summary

Over the past few decades, the potential health benefits of plant polyphenols such as those contained in the *Carthamus caeruleus* L plant as antioxidants have attracted much interest.

In our study, we were interested in optimizing the ultrasonic extraction process of polyphenols contained in *Carthamus caeruleus* L roots using a full factorial design. This study was carried out by varying the two levels of three selected factors: the pH of the extraction solution, the solute : solvent ratio and the extraction time in the ultrasonic bath. After experimentation, two of these factors were found to be influential on the extraction performance, namely the pH of the extraction solution and the extraction time. And subsequently, we found that the following optimal extraction conditions: pH = 9, extraction time = 15min and solute : solvent ratio =1:50, allowed us to obtain a maximum yield equal to 23.336 mg EAG/g E.

Keywords: Experimental design, full factorial design, ultrasonic cleaner extraction, polyphenols, *Carthamus Caeruleus* L.