



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique.



جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش
Université Mohamed El-Bachir El-Ibrahimi. BBA.
كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الارض و الكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie

Intitulé :

Optimisation des conditions d'extraction des
polyphénols totaux d'*Asparagus acutifolius* en
Algérie

Présenté par :

- Belfar Chaima
- Bisset Khaoula

Devant le jury :

Présidente : Mme Z. Benouadah MCB (Université de BBA)
Directeur : M. R. Djenidi Professeur (Université de BBA)
Examinatrice : Mme H. Guergour MCB (Université de BBA)

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout Puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promoteur le Pr **Rédha DJENIDI** qui nous a encadré et dirigé avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordée*

Nos vifs remerciements vont à tous ceux qui ont accepté d'associer leurs compétences et leur savoir afin de juger ce travail :

*A Mme **Zohra BENOUADAH** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Nous lui adressons nos respectueux remerciements.*

*A Mme **Hassina GUERGOUR** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer au jury de soutenance. Nous lui exprimons notre reconnaissance et nos sincères remerciements.*

*Un grand merci à Mme **Fahima FELLAH**, qui nous a beaucoup aidé et soutenu pendant notre travail par ses encouragements, ses précieux conseils, sa disponibilité, sa simplicité et surtout pour sa patience tout au long des travaux pratiques ; nous ne pouvons que sincèrement lui exprimer notre profond respect*

Nos remerciements s'adressent à tous les enseignants des départements des Sciences Agronomiques et de biologie et surtout à l'Université de Béjaia sans laquelle ce mémoire n'aurait jamais pu être réalisé, et qui nous a fourni la plus grande partie des réactifs et du matériel de laboratoire

Nous tenons à remercier les techniciens de laboratoire pour leur attitude professionnelle, modestie et leur bonne humeur, ils nous ont beaucoup facilité le travail, en particulier

*M. Nasreddine **MAKHOUKH** et Mme Sabrina **DJEMOUI***

Dédicaces

Allah, merci de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir ; la force d'y croire ; la patience d'aller jusqu'au bout et d'accomplir mes études.

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donnée la vie ; le symbole de tendresse ; qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite ; à ma mère **Khadîdja**le sens réel de la joie.*

*A mon père **Ali** école de mon enfance qui a été mon ombre durant toutes les années des études ; et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager ; à me donner l'aide et me protéger.*

*Et ce qu'il vaut la peine de mentionner, mon mari, ma vie **Abdelghani** qui me donne la force, la confiance de faire cet effort et de m'encourager à accomplir ce travail.*

*Au plus cher de mon cœur, mes sœurs **Wahiba ; Rima ; Ahlem ; Amina et Khaoula et mon cher frère Mohammed Islam.***

*Un merci à **moi-même** pour mes efforts*

Un merci à tous ceux qui m'ont soutenu

*« Qu'**Allah** nous guide tout au long de notre vie »*

Chaima

Dédicaces

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

A ceux qui ont donné un sens à mon existence, qui mon soutenu jours et nuits durant tout mon parcours

A ceux qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui

*A vous mes très chers et adorables parents **Zohir** et **Salima Moussaoui***

*A ma deuxième mère tata **Lila**, que Dieu vous protège et vous prête une longue vie.*

*A ma sœur : **Meriem** qui m'a toujours encouragé et souhaité la réussite*

*A mes frères: **Abderrahim** et **Abdelazziz***

A toute ma famille

*Sans oublier mon cher ami **Housseem** qui m'a donné de l'aide.*

*A toi **Chaima** d'avoir partagé ce modeste travail, nous avons partagé d'agréables moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*

*A ma nièce et neveux, **Hanane, Larem, Nadia, ...***

*A tous mes amis(es) : **Hanane, Atef, Merbouha, Chorouk, Housseem, Lilia,...***

J'adresse aussi mes dédicaces à mes amies avec lesquelles j'ai passé des moments agréables, en particulier,

Mes dédicaces s'adressent aussi à tous mes enseignants

A tous ceux qui me connaissent

A toute la promotion de biochimie 2020/ 2021

« Que Dieu nous guide tout au long de notre vie »

Khaoula

Sommaire

Remerciements	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : Matériel et méthodes	3
I.1. Matériel végétal	3
I.1.1. Description du matériel végétal	3
I.1.2 Préparation de la poudre	3
I.1.2.1 Récolte	3
I.1.2.2 Séchage	4
I.1.2.3 Broyage et Tamisage	4
I.2 Produit et réactifs	5
I.3. Mode opératoire	5
I.3.1 Optimisation des meilleures conditions d'extraction des polyphénols totaux.	5
I.3.2 Protocole d'extraction	6
I.3.2.1 Analyse quantitative :	6
I.3.2.1.1 Dosage des polyphénols totaux :	6
I.3.2.1.3 Pouvoir réducteur :	7
I.3.2.1.4 Principe	7
I.3.2.1.5 Méthode de dosage	7
I.3.2.2 Analyse statistique	10
Chapitre II : Résultats et discussion	11
II .1 Résultats	11
II.1.1 Choix du solvant d'extraction	11
II.1.2 Concentration du solvant d'extraction	13
II.1.3 Quantité de poudre	15
II.1.4 Effet du temps d'extraction	17
II .2 Discussion	19
Conclusion	22
Références bibliographiques	24
Résumés	

Liste des figures

<i>N° de la Figure</i>	<i>Titre de la figure</i>	<i>Page</i>
Figure 01	<i>Les différentes parties de la plante Asparagus acutifolius</i>	03
Figure 02	<i>Asperge sauvage (Fellah 2021)</i>	04
Figure 03	<i>Séchage à l'ombre.</i>	04
Figure 04	<i>Poudre d'asperge après broyage et tamisage.</i>	05
Figure 05	<i>Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols</i>	07
Figure 06	<i>Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le pouvoir réducteur.</i>	08
Figure 07	<i>Dosage des polyphénols en fonction du solvant dans le protocole d'extraction.</i>	11
Figure08	<i>Pouvoir réducteur par la fixation de solvant dans le protocole d'extraction</i>	12
Figure 09	<i>Dosage des polyphénols totaux en fonction de la concentration de l'éthanol.</i>	13
Figure 10	<i>Pouvoir réducteur en fonction de la concentration d'éthanol.</i>	14
Figure 11	<i>Effet de la quantité de poudre sur la teneur en polyphénols totaux.</i>	15
Figure 12	<i>Pouvoir réducteur en fonction de la quantité de poudre.</i>	16
Figure 13	<i>Variations de la durée d'agitation sur le rendement d'extraction des polyphénols totaux.</i>	17
Figure 14	<i>Effet du temps d'extraction sur le pouvoir réducteur.</i>	18

Liste des abréviations

μm : Micromètre

ML : Millilitre

Nm : Nanomètre.

Mg : Milligramme

EAG: Equivalent d'acide gallique

°C : Degré Celsius

Min: Minute

MS: Matière sèche

Iron : III

TCA : Acide trichloracétique

Rpm : Rotation par minute

UV : Ultra-violet

PPT: Polyphénols totaux

SD: Standard deviation

Ns : Non significatif

VS : Versus

Introduction

Depuis l'antiquité, l'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est connue pour traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires (**Muthuet *et al.*, 2006**). Ces derniers possèdent des structures chimiques diversifiées et un large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante, qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Huang *et al.*, 2005**). En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches à cause de leurs diverses activités biologiques. Ces dernières années, l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddour *et al.*, 2013**).

Les composés phénoliques des plantes médicinales, comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tannins ont une activité antioxydante qui leur permet d'exercer un rôle protecteur ou thérapeutique contre ces maladies (**Manachet *et al.*, 2004**).

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification, et l'utilisation des composés phénoliques. Beaucoup de facteurs tels que le rapport solide/liquide, la température, le temps et le solvant d'extraction...etc., peuvent influencer de manière significative l'efficacité de l'extraction. Généralement, l'optimisation des processus d'extraction est réalisée par des méthodes empiriques ou statistiques (**Ghafoor *et al.*, 2009**).

C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de notre travail, dans le but de valoriser la richesse naturelle algérienne et d'améliorer le patrimoine de la médecine traditionnelle. Ainsi nous avons choisi d'étudier une plante commune locale *Asparagus acutifolius* de la famille Asparagaceae qui est largement présente dans la région de Bejaia, plus précisément entre El Kseur et Sidi Aich en étudiant les meilleures conditions d'extraction des polyphénols par une méthode conventionnelle d'extraction : la macération.

Le présent travail est organisé en deux chapitres :

- Le premier chapitre de notre étude illustre le matériel biologique et les méthodes et techniques utilisés.
- Dans le deuxième chapitre, les résultats sont exposés et discutés.

L'étude s'achève par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et éventuellement des perspectives d'avenir.

Chapitre 1 : MATERIEL ET METHODES

I- Matériel

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Description du matériel végétal

Le matériel biologique utilisé au cours de cette expérimentation est l'Asperge sauvage *Asparagus acutifolius* (**Fig. 01**). C'est une espèce répandue sur le pourtour méditerranéen. Elle est formée d'une partie pérenne appelée couronne qui a une structure de typerhizome, des tiges droites appelées turions, des feuilles fines ramifiées et des fruits sousforme de baies rouges contenant des graines noires (**Doré, 1990**).



Figure 01 : Les différentes parties de la plante *Asparagus acutifolius*

I.1.2 Préparation de la poudre

I.1.2.1 Récolte

La récolte des échantillons d'*Asparagus acutifolius* a été effectuée dans la région entre la commune d'ElKseur et Sidi Aich dans la wilaya de Bejaia entre la fin du mois de mars et le début d'avril 2021 (**Fig. 02**).



Figure 02 : Asperge sauvage (Fellah 2021).

I.1.2.2 Séchage

Après avoir bien nettoyé l'asperge, elle est coupée en morceaux et séchée à l'ombre pendant une dizaine de jours, puis elle est placée à l'étuve à 40°C pendant 48h, afin de la préserver de la dégradation des substances thermolabiles telles que certains polyphénols(**Fig. 03**).



Figure 03 : Séchage à l'ombre.

I.1.2.3 Broyage et tamisage

Une fois séchée, la plante a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique, jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine(**Fig. 04**). Il s'en suit d'un tamisage pour avoir une poudre homogénéisée, de granulométrie inférieure à 200 μm , qui par la suite, sera conservée dans des flacons opaques en verre, fermés et mis à l'abri de la lumière pour empêcher l'oxydation jusqu'au moment d'utilisation.



Figure 04 : Poudre d'asperge après broyage et tamisage.

I.2 Produits et réactifs

Solvants : Eau distillée (H₂O) ; Ethanol (C₂H₅OH) ; Méthanol (CH₄O) ; Acétone (C₃H₆O)

Réactifs : Folin-Ciocalteu ; Carbonate de sodium (Na₂CO₃) ; Acide gallique (C₇H₆O₅).

Tampons : Sodium di-hydrogenorthophosphate di-hydrate (Na₂PO₄) ; +Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na₂HPO₄) ; Ferricyanure (Fe (CN) ₆)₃ ; Acide trichloracétique (TCA) ; chlorure ferrique (FeCl₃).

I.3 Mode opératoire

I.3.1 Optimisation des meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques

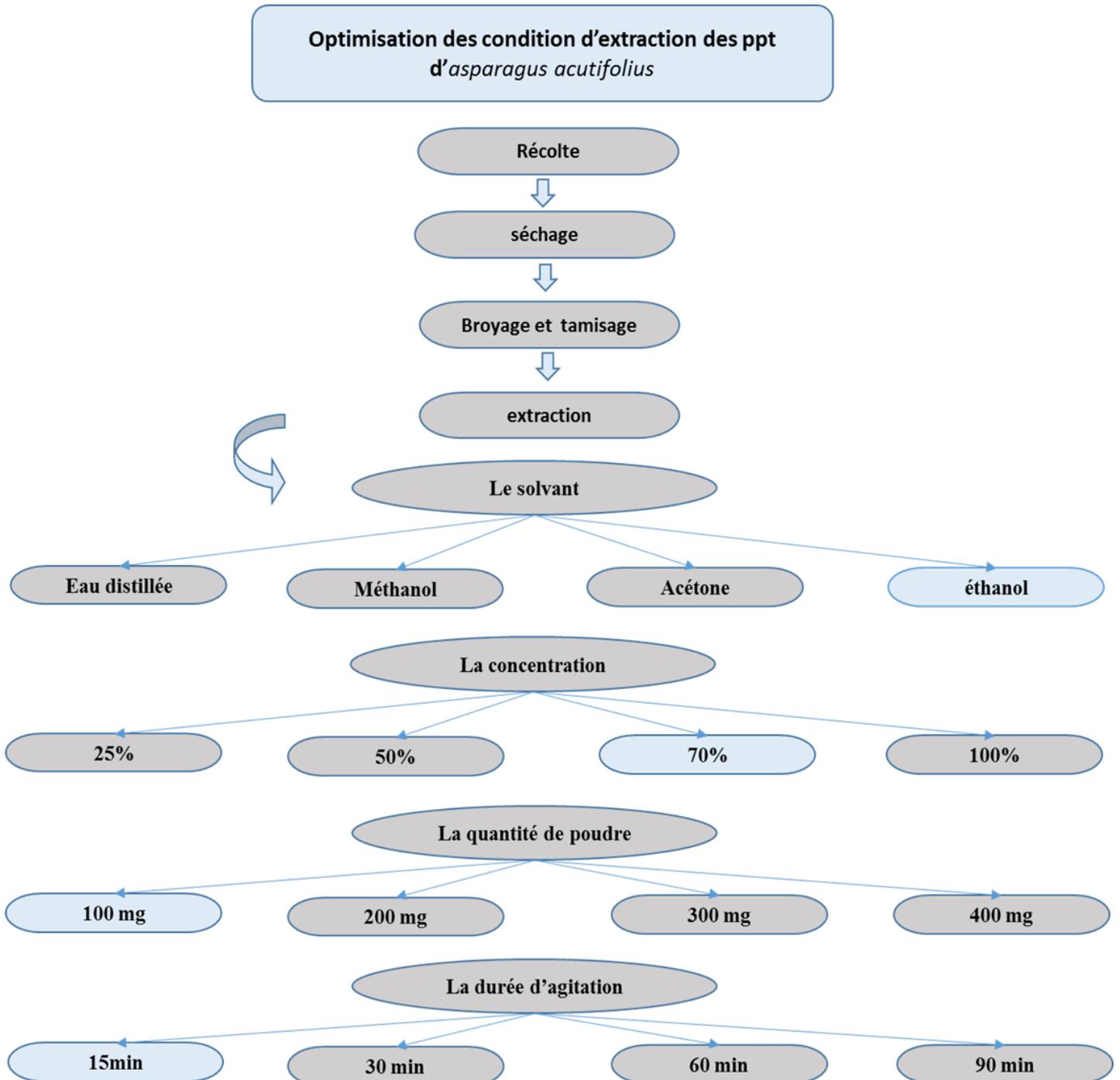
Dans une démarche d'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'*Asparagus acutifolius*, une série de paramètres a été étudiée, notamment :

- La nature du solvant.
- La concentration du solvant.
- La quantité de poudre.
- La durée d'agitation pour l'extraction.

Pour chaque essai, nous avons fait varier un paramètre et nous avons fixé tous les autres paramètres qui restent pour que l'on puisse à la fin avoir des paramètres optimaux et qui nous donnent le meilleur rendement d'extraction.

I.3.2 Protocole d'extraction

Les polyphénols sont extraits par macération de 150 mg de la poudre dans 15 ml de solvant sous agitation pendant 30 mn à une température ambiante de 25 C°, puis les extraits sont filtrés et conservés. Deux essais ont été réalisés pour chaque extrait.



I.3.2.1 Analyse quantitative

I. 3.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*,1999). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Singleton et Rose,1965)en y apportant quelque modifications.Dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 0,1 ml de chaque extrait est mélangé à 0,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué (1/10). Après 3 à 5 mn on ajoute un volume de 0,4 ml de carbonate de sodium (7,5%). Les tubes sont ensuite agités puis incubés à l'ombre pendant 120mn, puis l'absorbance est lue à 760 nm.

Une courbe d'étalonnage(Fig. 5)est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (de 1/5 à 5/5) comme contrôle positif.Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par 150 mg de la poudre d'asperge sauvage. (mg EAG/150mg poudre).

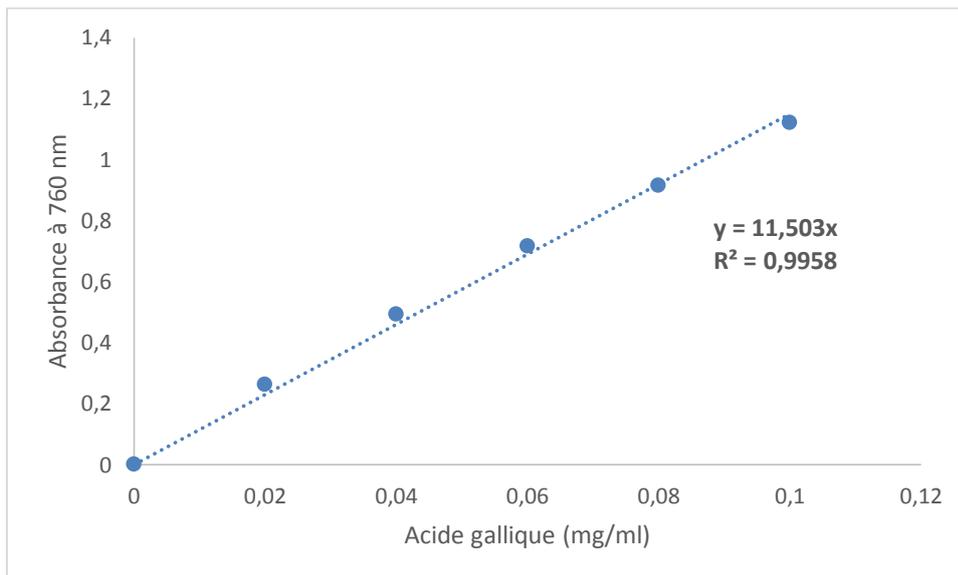


Figure 05 :Droited'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

I. 3.2.2 Pouvoir réducteur

I. 3.2.2.1 le principe

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .L'augmentation de

l'absorbance du mélange contenant l'extrait indique une augmentation du pouvoir réducteur. (Chewet *al.*, 2009).

I. 3.2.2.2 Méthode de dosage

1 ml de l'extrait est mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0,2M, pH = 6,6) et 1ml de ferricyanure de potassium (10mg/ml). Le mélange est incubé au bain-marie à une température de 50°C pendant 20 min. Puis 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% est ajouté pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 2790 rpm pendant 10 min. Un aliquote de 1 ml du surnageant est combiné à 1ml d'eau distillée et 0,2 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (Spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant, l'acide gallique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965).

Le pouvoir réducteur obtenu à partir des extraits d'*Asparagus acutifolius*, a été déterminé à partir d'une courbe standard utilisant l'acide gallique comme étalon de référence(Fig. 06).

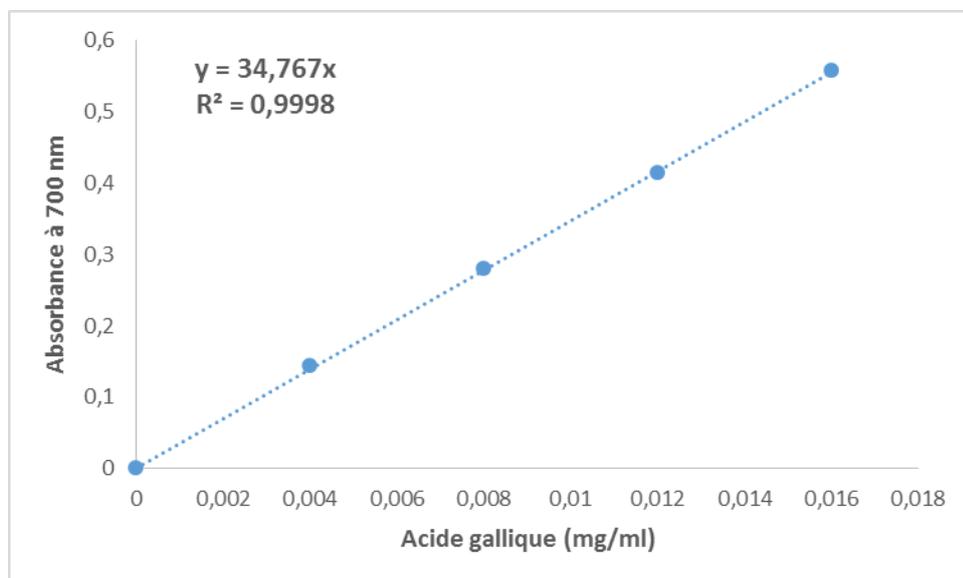


Figure 06 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le pouvoir réducteur.

I.3.2. 2Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en : moyenne \pm écart-type (SD) et analysés à l'aide du logiciel Graph pad Prism 7. Les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de variance à un seul critère de classification (ANOVA One-way). Le test de Tukey a été réalisé et la différence significative a été détectée à $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Résultats

II.1.1 Choix de solvant d'extraction

II.1.1.1 Comparaison entre les quatre solvants utilisés

Le premier paramètre entamé dans cette étude est l'extraction des composés phénoliques de la poudre d'*Asparagus acutifolius* par l'utilisation de : l'éthanol à 50% (polarité : 5,2), l'acétone à 50% (polarité : 5,4), le méthanol à 50% (polarité : 6,6) et l'eau distillée (polarité : 9).

II .1.1.1.1 Dosage des polyphénols totaux (PPT).

Les résultats concernant les 4 solvants sont présentés dans la **Figure 07**.

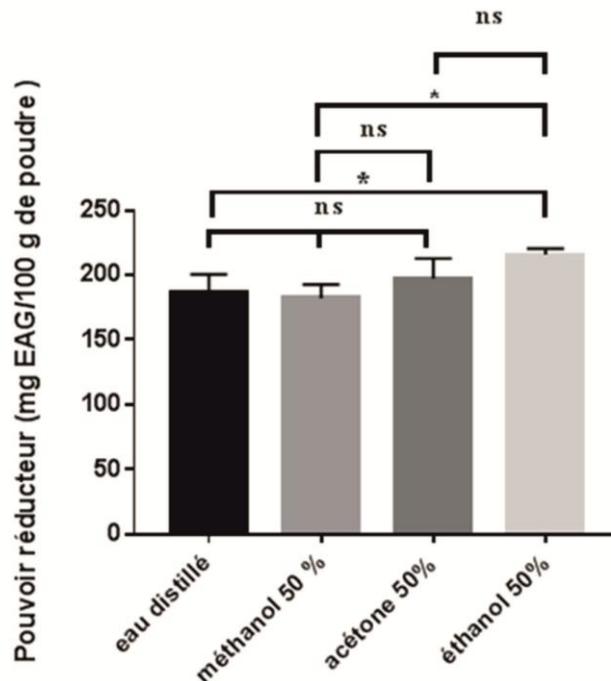


Figure 07 : Dosage des polyphénols en fonction du solvant dans le protocole d'extraction
ns : différence Non significative

Il apparaît clairement que le rendement d'extraction obtenu avec l'éthanol 50% est le plus élevé avec 1608.34 ± 58.454 mg EAG/100g de poudre vs l'eau distillée 1367.74 ± 858.119 mg EAG/100g de poudre pour le solvant le plus proche, avec une différence non significative ($p < 0,05$). De plus l'analyse statistique montre que toutes les différences sont

non significatives entre les 4 solvants utilisés, le moins efficace étant l'acétone (1293.59 ± 98.374 mg EAG/100g de poudre).

II .1.1.1.2 Pouvoir réducteur

Les résultats concernant la nature du solvant sont présentés dans la **Figure 08**.

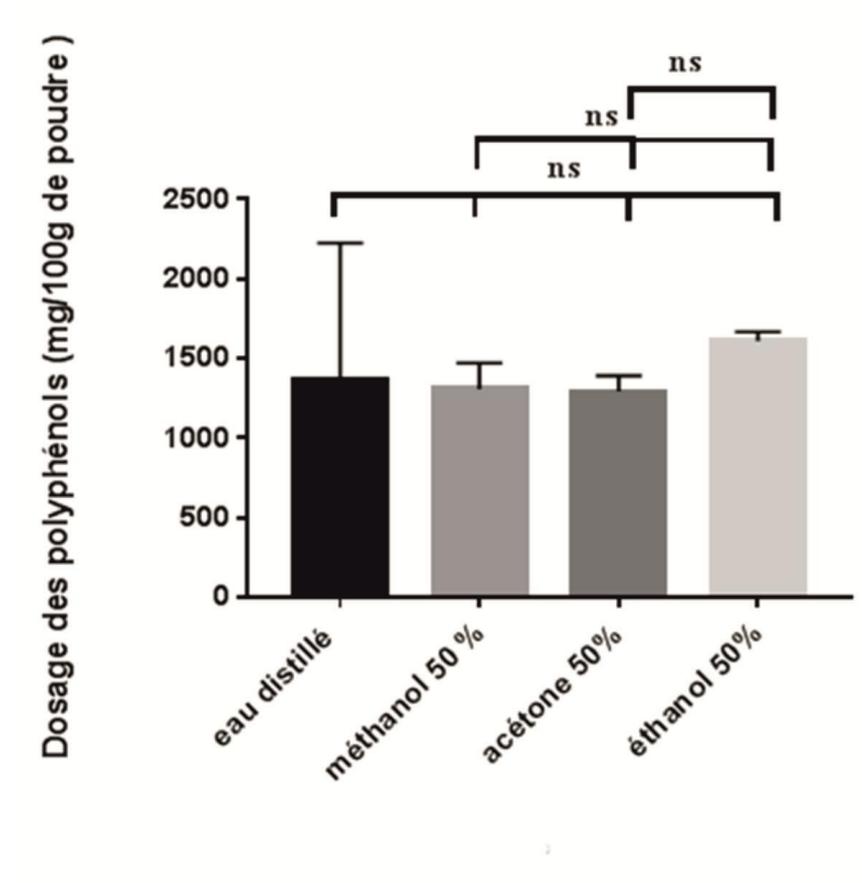


Figure 08 : Pouvoir réducteur par la fixation de solvant dans le protocole d'extraction

* : différence Significative

ns : différence Non significative

L'éthanol à 50% a donné le meilleur résultat en matière de pouvoir réducteur avec une moyenne de 215.65 ± 4.793 mg EAG /100g de poudre. L'acétone à 50% et l'eau distillée sont proches avec des moyennes de 197.27 ± 15.632 mg EAG /100g de poudre et 186.18 ± 14.303 mg EAG /100g de poudre, respectivement. Le méthanol avec une moyenne de 182.08 ± 10.757 mg EAG /100g de poudre est le moins efficace. L'analyse statistique montre que les différences sont significatives entre l'eau distillée et l'éthanol) et entre le méthanol et l'éthanol.

A partir des deux tests (dosage des polyphénols totaux et pouvoir réducteur), il apparaît que le meilleur solvant d'extraction pour *Asparagus acutifolius* est l'éthanol.

II.1.1.2 Concentration du solvant d'extraction (éthanol)

II.1.1.2 .1 Polyphénols totaux

Pour le deuxième paramètre, afin d'extraire le maximum de composés phénoliques, nous avons utilisé le meilleur solvant qui est l'éthanol, à des concentrations différentes : 25%, 50%, 70% et 100%. Les résultats de la quantification des polyphénols totaux sont illustrés sous forme d'histogrammes (**Fig. 09**).

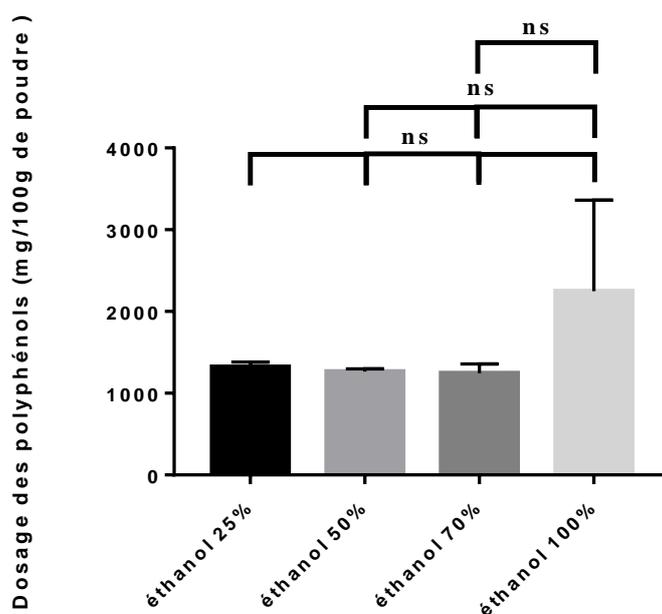


Figure 09: Dosage des polyphénols totaux en fonction de la concentration de l'éthanol.

ns : différence Nonsignificative

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la teneur la plus élevée en composés phénoliques est celle de l'éthanol à 100% avec une moyenne de 2249.44 ± 1113.554 mg EAG /100g de poudre. Cette concentration est celle qui permet d'obtenir le meilleur taux d'extraction des polyphénols totaux, alors que la teneur la plus faible est celle de l'éthanol à 70% avec une moyenne de 1244.44 ± 112.228 mg EAG /100g de poudre.

Les résultats obtenus pour les autres concentrations sont en moyennes de 1322.25 \pm 59.494 mg EAG /100g de poudre pour la concentration de 25%, et de 1264.46 \pm 33.365 mg EAG /100g de poudre pour la concentration de 50%.

II.1.1.2 .2 Pouvoir réducteur

Les résultats obtenus ont montré que le pouvoir réducteur varie en fonction des ratios du solvant choisi (l'éthanol) pour l'extraction(**Fig. 10**)

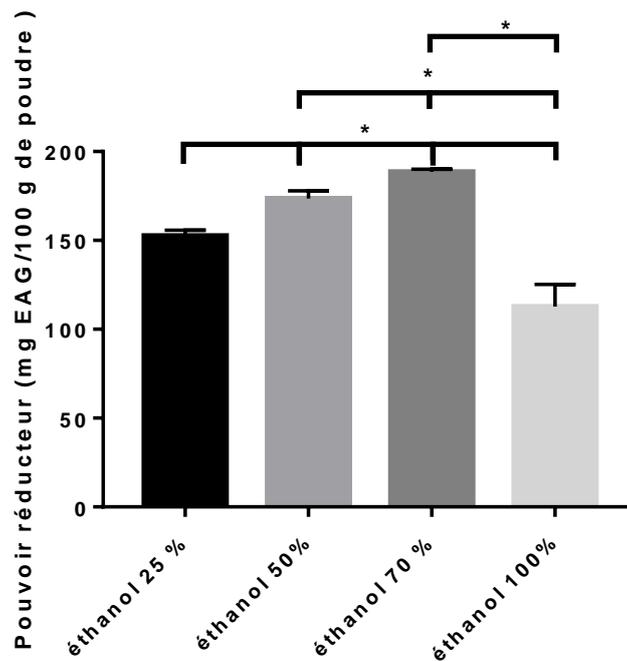


Figure 10: Pouvoir réducteur en fonction de la concentration d'éthanol

* différence Significative

La concentration de 70% d'éthanol est celle qui présente le meilleur résultat en matière de pouvoir réducteur avec une moyenne de 188.63 \pm 1.478 mg EAG /100g de poudre, tandis que la concentration de 100% est celle qui présente le plus faible résultat en matière de pouvoir réducteur avec une moyenne de 112.68 \pm 12.496 mg EAG /100g de poudre.

Pour les autres concentrations, les moyennes observées sont de 173.60 \pm 4.360 mg EAG /100g MS pour la concentration de 50 % ; 152.58 \pm 3.098 mg EAG /100g de poudre pour 25%.

L'analyse statistique indique une différence significative entre toutes les concentrations (25%, 50%, 70% et 100%). Les deux tests qui ont été réalisés montrent que la meilleure concentration du solvant d'extraction (éthanol) est de 70%.

II.1.1.3 Quantité de poudre d' *Asparagus acutifolius*

II.1.1.3.1 Polyphénols totaux

L'impact du rapport solide / liquide sur l'extraction des polyphénols d'*Asparagus acutifolius* est mesuré avec les rapports 0.1g/ 20 ml, 0.2g/20 ml 0.3g / 20 ml 0.4g / 20 ml. En augmentant le rapport solide/liquide, celui –ci a eu un effet négatif sur l'extraction (**Fig. 11**).

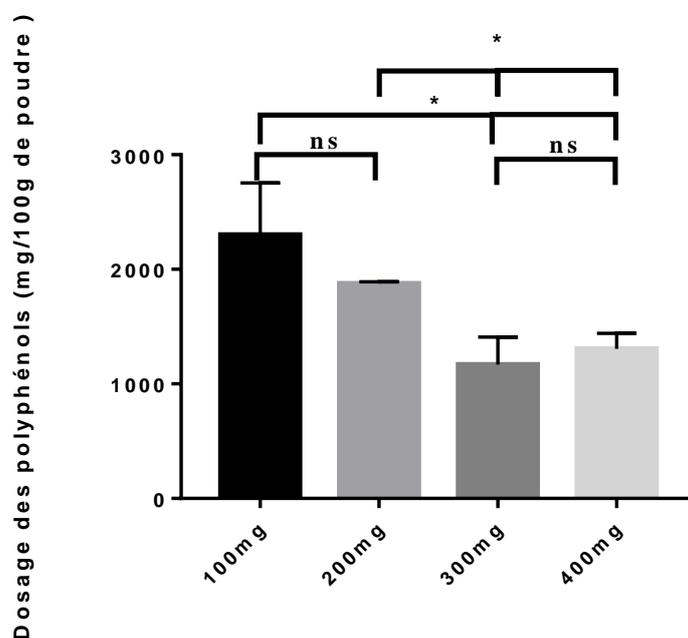


Figure 11: Effet de la quantité de poudre sur la teneur en polyphénols totaux.

* : différence Significative

ns : différence Non significative

D'après les résultats de l'analyse statistique, nous remarquons que le rapport qui permet d'extraire le plus de polyphénols totaux est le rapport solide/liquide de 0.1g /20 ml avec une moyenne de 2302.40 ± 451.285 mg EAG /100g de poudre, alors que la teneur en polyphénols totaux la plus faible a été enregistrée pour le rapport 0.3g / 20 ml de moyenne 1169.05 ± 239.875 mg EAG /100g de poudre.

La moyenne de 1876.83 ± 14.189 mg EAG /100g de poudre est pour 0.2g/20 ml et 1305.85 ± 135.934 mg EAG /100g de poudre pour 0.4g/20ml.

L'analyse statistique indique aussi une différence significative entre les rapports 0.1g/20 ml, 0.2g/20 ml ; 0.3g / 20 ml et 0.4g / 20 ml

II.1.1.3.2 Pouvoir réducteur

Les résultats obtenus ont montré que le pouvoir réducteur varie en fonction de la quantité de poudre (**Fig. 12**).

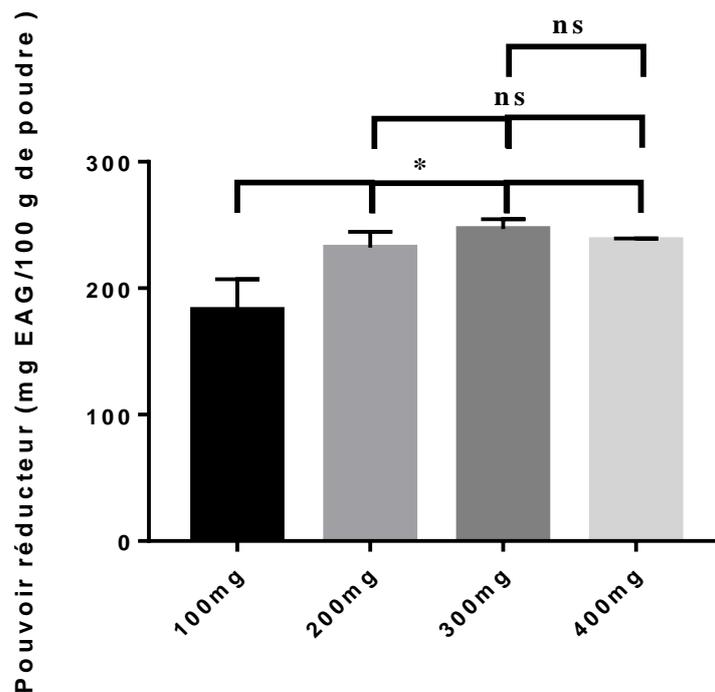


Figure 12 : Pouvoir réducteur en fonction de la quantité de poudre.

* : Significatif

ns : Non significatif

Notons que le pouvoir réducteur obtenu avec le rapport solide/liquide de 0,1/20 avec une moyenne de $182,85 \pm 24,202$ mg EAG /100g de poudre. Elle est suivie par 0,2/20 et 0,3/20 ml avec $232,14 \pm 12,581$ mg EAG /100g de poudre, et $246,79 \pm 7,717$ mg EAG /100g de poudre. Le pouvoir réducteur est en moyenne de $238,10 \pm 1,226$ mg EAG /100g de poudre pour le rapport solide/liquide de 0.4/20.

II.1.1.4 Effet du temps d'extraction

II.1.1.4 .1 Polyphénols totaux

Afin d'extraire le maximum de polyphénols, différents temps de macération ont été testés : 15 min, 30 min, 60 min et 90 min. Les résultats sont présentés dans la **Figure 13**.

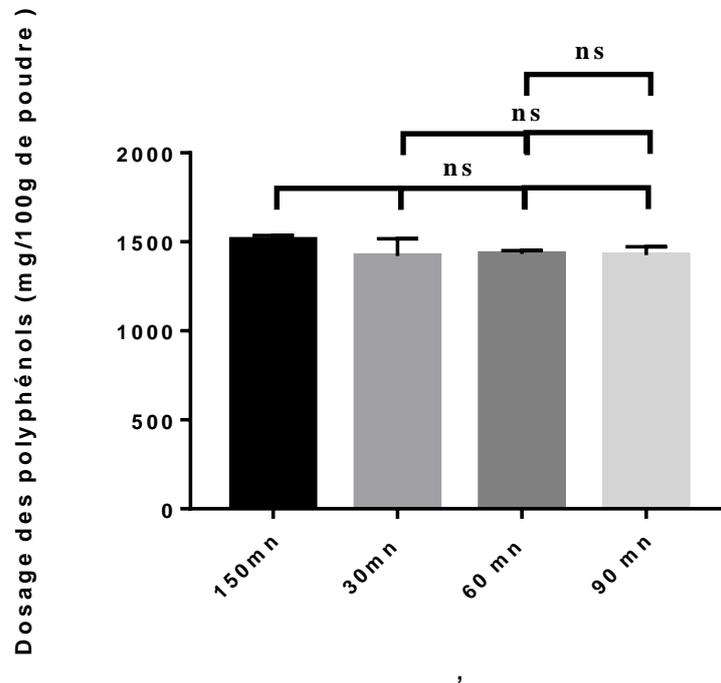


Figure 13: Variations de la durée d'agitation sur le rendement d'extraction des polyphénols totaux

ns : Non significatif

Les rendements d'extractions des composés phénoliques obtenus pour différents temps de macération montrent une moyenne de $1511,89 \pm 24,242$ mg EAG /100g de poudre pour le temps 15 mn. On mentionnera aussi une moyenne de $1421,37 \pm 95,627$ mg EAG /100g de poudre pour un temps de 30 mn. Puis nous obtenons une moyenne de $1432,98 \pm 17,369$ mg EAG /100g de poudre pour 60 mn et enfin $1425,72 \pm 47,084$ mg EAG /100g de poudre après 90 mn d'agitation.

II.1.1.4 .2Pouvoir réducteur

Les résultats de cette étape de l'extraction sont présentés dans la **Figure 14**.

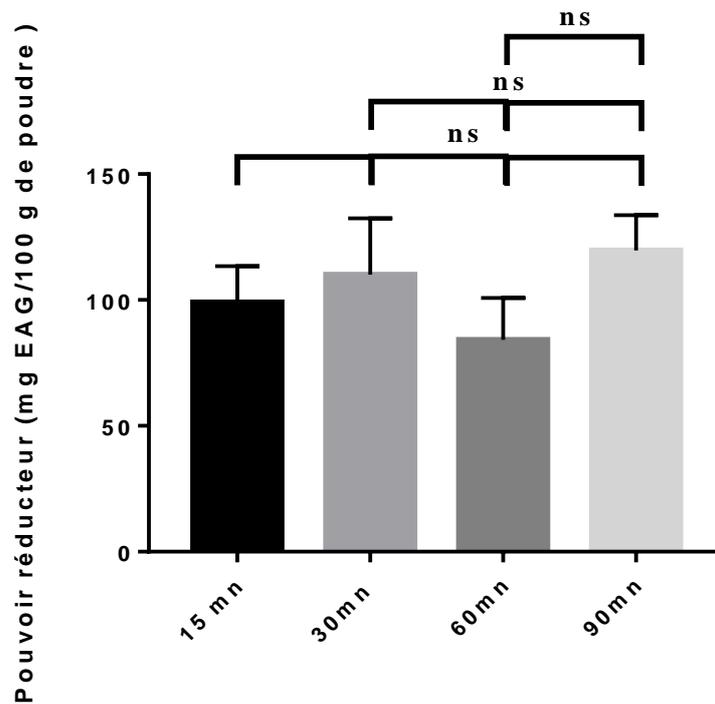


Figure 14 : Effets du temps d'extraction sur le pouvoir réducteur

ns : Non significatif.

Le pouvoir réducteur est de 99.04 ± 14.435 mg EAG /100g de poudre pour le temps de 15min, et de 110.02 ± 22.449 mg EAG /100g de poudre pour 30 min, de 84.19 ± 16.539 mg EAG /100g de poudre pour le temps de 60 min, et de 119.65 ± 14.028 mg EAG /100g de poudre pour 90 min. L'analyse statistique révèle une différence non significative entre toutes les durées d'agitation utilisées

Nos résultats concernant l'extraction des polyphénols totaux et le pouvoir réducteur, ont permis de déterminer que les paramètres qui ont donné les meilleurs résultats sont : l'éthanol à 70%, avec une quantité de poudre de 0.1g pendant une durée de macération aux choix.

II.2 Discussion

Dans la recherche d'une optimisation efficace de l'extraction des polyphénols à partir d'*Asparagus acutifolius* le choix du solvant d'extraction joue un rôle très important dans l'extraction des polyphénols totaux.

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

Les résultats montrent que le solvant qui donne la plus forte teneur en polyphénols totaux est l'éthanol à 50% avec un rendement moyen d'extraction des polyphénols de 1608.34 ± 58.454 mg EAG/100g de poudre et le meilleur résultat concernant le pouvoir réducteur avec une moyenne de 215.65 ± 4.793 mg EAG /100g de poudre. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'extrait éthanolique renferme des molécules ayant un potentiel d'extraction plus fort que les autres solvants d'extraction utilisés.

Plusieurs auteurs indiquent que l'éthanol est meilleur que le méthanol dans l'extraction des polyphénols. **Jokić et al. (2010)** ont montrés que l'éthanol et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol.

Les études effectuées par **Jayaprakasha et al. (2008)** ont montré que le pouvoir réducteur dépend de la teneur en composés phénoliques des échantillons et de la position et du nombre de groupements hydroxylés. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de composés donneurs d'électrons qui entraînent la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} . La réduction du chlorure ferrique est souvent utilisée comme indicateur d'activité des donneurs d'électrons qui est un mécanisme important pour l'action antioxydante des polyphénols (**Yang et al., 2009**).

Concernant l'effet de la concentration du solvant, l'extraction des composés phénoliques a été réalisée en utilisant comme solvant l'éthanol à différentes concentrations, à savoir : 25%, 50 %, 70 % et 100 %. Nous remarquons que la meilleure capacité d'extraction a été obtenue avec l'extrait éthanolique à 70% (polarité : 5,2). La concentration de 70% d'éthanol est celle qui présente le meilleur résultat en matière de pouvoir réducteur avec une moyenne de 188.63 ± 1.478 mg EAG /100g de poudre, bien que la teneur moyenne en composés phénoliques soit de 1244.44 ± 112.228 mg EAG /100g de poudre, mais la différence n'est pas significative.

Le mélange solvant-eau distillée semble très efficace pour l'extraction des polyphénols, car l'eau en combinaison avec le solvant contribue à la création d'un solvant modérément polaire qui assure à la fois l'extraction des composés phénoliques et la préservation de leur activité antioxydante. Le choix du solvant sera alors conditionné par le caractère polaire des composés phénoliques présents dans la matrice étudiée (**Chirinoset al., 2007**).

Le volume du solvant, ou rapport masse de poudre/volume du solvant, est un facteur influençant l'extraction de polyphénols. Afin d'étudier l'effet du rapport solide-liquide, l'extraction des composés phénoliques d'*Asparagus acutifolius* a été effectuée en utilisant de la poudre d'Asperge et comme solvant d'extraction l'éthanol à 70% et en faisant varier la relation échantillon/solvant dans les rapports : 0,1/20 ; 0,2/20 ; 0,3/20 à 0,4 /20 (g/ml). D'après les résultats d'absorbance obtenus, les rapports 0,3/20 et 0,4 /20 (g/ml) ont été hors gamme.

La teneur en composés phénoliques la plus élevée a été trouvée en appliquant le rapport 0,1 g/20 ml (2302.40 ± 451.285 mg EAG /100g de poudre, avec $(P < 0,05)$). Notons aussi que le pouvoir réducteur est obtenu avec une moyenne de $182,85 \pm 24,202$ mg EAG /100g de poudre pour le même rapport, étant inférieur par rapport à 0,2/20 (g/ml). Dans le but de choisir les paramètres optimaux, nous avons pris en compte de minimiser au maximum la quantité de poudre avec l'obtention d'une meilleure teneur.

L'objectif de l'étape d'extraction des composés phénoliques à partir des végétaux est de libérer ces composés des vacuoles où ils se trouvent. L'extraction solide-liquide met en jeu des mécanismes moins bien connus. En effet, le solvant doit franchir la barrière solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et le soluté doit ressortir du solide. L'entrée du solvant se fait par mécanisme osmotique et la sortie du soluté par diffusion. L'extraction s'effectue par transport des particules réduites en utilisant un homogénéisateur où la substance à traiter est interposée au solvant qui servira à l'extraction (**Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003**).

L'influence de la durée d'agitation sur l'extraction des composés phénoliques a été réalisée en utilisant quatre durées croissantes : 15mn ; 30mn ; 60 mn 90 mn, en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol à 70% avec un rapport de 0,1/20 g/ml.

Les résultats de notre travail ont montré que la durée d'extraction a un effet non significatif ($P < 0,05$) sur le rendement en polyphénols totaux et sur l'activité antioxydante des extraits et que la macération n'influencer pas sur l'extraction.

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique qui peut varier de substances simples aux substances très hautement polymérisées. Il y a une possibilité d'interaction des composés phénoliques avec les autres composés de la plante tels que les hydrates de carbones et les protéines. Ces interactions peuvent conduire à la formation de complexes qui peuvent être insolubles (Naczc et Shahidi, 2006). La solubilité des composés phénoliques est aussi affectée par la polarité du solvant utilisé (Marston et Hostettmann in Anderson *et al.*, 2006) ; Naczc et Shahidi, 2006). Ainsi, la récupération des polyphénols à partir du matériel végétal est aussi influencée par la durée de l'extraction, le ratio du solvant à l'échantillon, la taille des particules de l'échantillon et les conditions de préparation de l'échantillon. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié pour l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Hayouniet *al.*, 2007; Naczc et Shahidi, 2006 ; Ribereau-Gayon, 1968). Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs auteurs (Chirinoset *al.*, 2007 ; Drużyńska *et al.*, 2007 ; Telli, *et al.*, 2010). Alors que les résultats de Chaalal *et al.* (2012) ont indiqué qu'un temps excessif n'est pas utile pour extraire plus de composés phénoliques à partir des graines de figue de Barbarie. Aussi selon Benchikh et Louailèche. (2014), le temps excessif d'extraction n'était pas utile pour extraire les composés phénoliques à partir des pulpes de caroube.

Conclusion

Pour une extraction efficace et optimale des composés phénoliques et l'évaluation de leur activité antioxydante (pouvoir réducteur et dosage des polyphénols totaux) d'*Asparagus acutifolius*, l'extraction solide-liquide a été utilisée. Quatre facteurs ont été optimisés, à savoir le type de solvant (acétone, méthanol, éthanol et eau), les différentes concentrations (25%,

50%, 70%, 100%), le rapport solide/liquide (0.1 / 20 ; 0.2/20 ;0.3/20 ;0.4 /20), ainsi que le temps d'extraction (15min, 30min, 60min, 90min,), avec un degré de signification des données pris à $P < 0,05$.

D'après notre essai d'optimisation, certaines conclusions s'imposent. D'abord, le protocole d'extraction utilisé pour l'optimisation a permis d'obtenir les meilleures teneurs en polyphénols totaux avec l'éthanol comme meilleur solvant (215.65 ± 4.793 mg EAG /100g de poudre). Avec sa concentration de 70% pour un rapport solide/liquide de 0,1g/20ml durant 15 mn.

Les résultats de la présente étude ont révélé que les extraits d'*Asparagus acutifolius* ont une activité antioxydante qui varie toujours en fonction de la nature du solvant, la concentration du solvant, le rapport solide / liquide et le temps d'extraction.

Les activités antioxydantes exercées par les extraits d'*Asparagus acutifolius* ont été obtenues dans les conditions suivantes : éthanol à 70 %, rapport solide liquide (0.1/20 ml), pour une durée d'extraction de 15 mn.

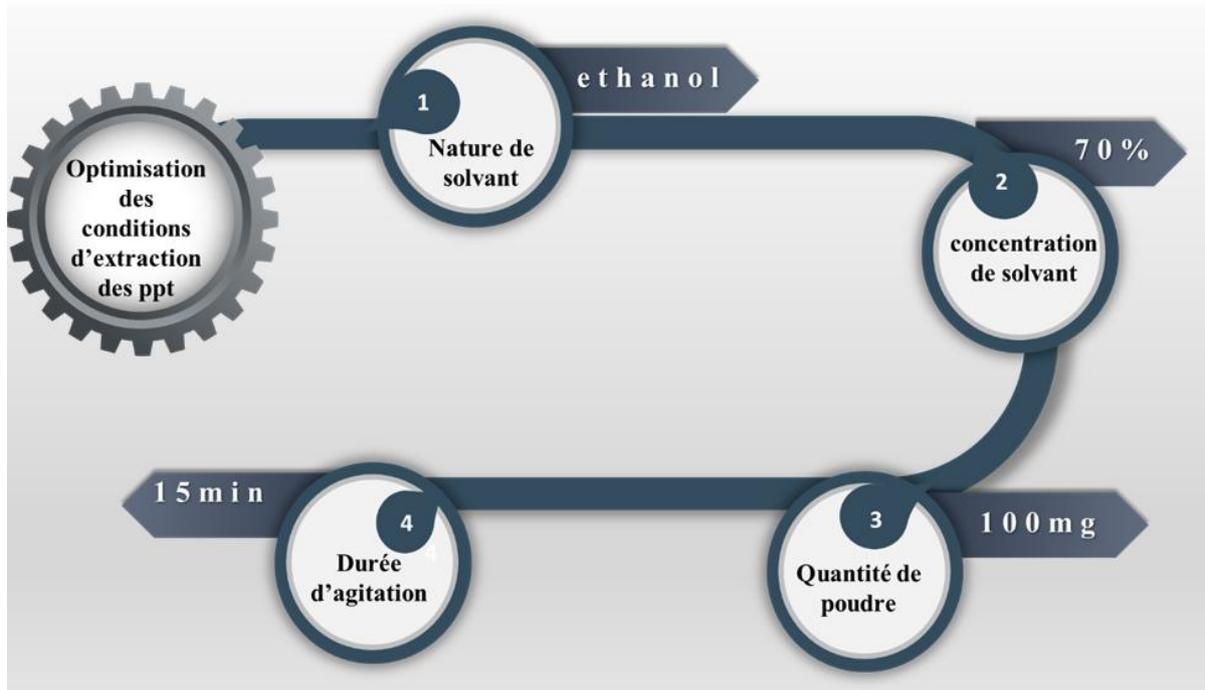
Ces différents choix de conditions ont été sélectionnés pour les raisons suivantes :

- Ils permettent d'obtenir les meilleurs rendements en composés phénoliques ;
- Donnent une activité réductrice plus élevée.

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

- D'élargir le cadre de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par l'utilisation d'autres méthodes d'extraction, avec l'étude de l'effet des autres paramètres comme: la variation du pH, la température et le temps d'extraction.
- De déterminer de nouvelles molécules bioactives naturelles ayant la capacité de répondre aux différents problèmes de santé et d'être l'alternative des médicaments synthétiques.
- D'élargir le panel des activités anti oxydantes *in vivo* et *in vitro* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : anti-cancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobiennes.
- De caractériser et isoler des principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques

- D'étudier l'effet synergique avec d'autres plantes.



Références bibliographiques

Benchikh Y., Louailèche H., 2014. Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Botanica Gallica*. 161(2): 175-181.

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

Chew Y.L., Goh J. K., Lim Y.Y., 2009. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. 116(1) : 13-18.

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

Doré C., 1990. *Asparagus anther* culture and field trials of dihaploids and F1 hybrids. *Haploids in Crop Improvement 12*. Springer-Verlag. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*.

Escribano-Bailon M.T., Santos-Buelga C., 2003. Extraction from foods. *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry, London. 1-16.

Ghafoor K., Choi Y.H., Jeon J.Y., Jo I.H., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J Agric Food Chem*. 10;57(11):4988-4994.

Hayouni E.A., Abderrabba M., Bouix M., Moktar Hamdi M., 2007. The effect of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105(3):1126-1134.

Hostettmann, K., Marston, Andrew, Hostettmann, Marys, 2006. Preparative chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 2nd Ed. 247pp

- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005.** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6):1841-56
- Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B., Patil, B.S., 2008.** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT-Food Science and Technology* 41, 376-384.
- Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A., Plan inić M., Tomas S., 2010.** Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*.28 : 206-212.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J.Clin.Nutr.* 79: 727-747.
- Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A., 2013.** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur de *CapparisSpinosa* L. *Lebanese Science Journal*. 14: 49-60.
- Muthu C., Ayyanar M., Rajan N., Ignacimuthu S., 2006.** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2(43):43.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2006.** Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Ribéreau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux, *Dunod. Éd. Paris*. 244 pp.
- Singleton V.L., Rossi J.R., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid *Am. J. Enol. Vitic.* 16 : 144.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299 : 152.
- Telli A., Mahboub N., Boudjeh S., Siboukeur O. E. K., Moulti-Mati, F., 2010.** OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES POLYPHENOLS DE DATTES LYOPHILISEES (*Phoenixdactylifera* L) VARIETE GHARS. *Annales des Sciences et Technologie*. 2(2) : 107-114

Yang X.M .,Yu W., Ou Z.P., Liu W.M., Ji X.I., 2009. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. fruit. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64: 167-173.

ملخص

يهدف هذا العمل أولاً وقبل كل شيء إلى استخلاص المركبات الفينولية من نبات بأكمله تم جمعه من المنطقة الواقعة بين القصور وسيدي يعيش (بجاية) : (الهليون أكوثيفوليوس) الهليون البري (وتقليل الطاقة).

بطريقة تقليدية تتلخص في الاستخلاص بالنقع

تم إخضاع هذا النبات لاستخلاص سائل - صلب مع تحسين ظروف الاستخلاص وهي: طبيعة المذيب وتركيز مذيب الاستخلاص ونسبة السائل الصلب ووقت الاستخلاص. وأظهرت مقتطفات من نبات الهليون أكوثيفوليوس 70 % إيثانول. أعطت النسبة 0.1 جم / 20 مل ووقت التحريك 15 دقيقة أفضل محتويات بوليفينول بالقيم التالية على التوالي (1608.34 ± 58.454) مجم EAG / 100 جم من المسحوق (1244.44 ± 112.228) مجم مسحوق EAG / 100 جرام (2302.40 ± 451.285). (مجم مسحوق EAG / 100 جرام (1511.89 ± 24.242) مجم مسحوق EAG / 100 جرام)

الكلمات المفتاحية : *Asparagus acutifolius* ؛ التحسين ، المركبات الفينولية ، تقليل الطاقة .النقع

Abstract

This work consists first in extracting phenolic compounds from the whole plant from the region between El Kseur and Sidi Aich (BEJAIA): *Asparagus acutifolius* (wild asparagus) and reducing power, as a conventional method which is summed up in extraction by maceration.

The plant was submitted to a solid-liquid extraction with an optimization of the extraction conditions, namely: the nature of the solvent and the concentration of the extraction solvent, solid-liquid ratio and the extraction time. Extracts of *Asparagus acutifolius* assured 70% ethanol; ratio 0.1g / 20ml and the stirring time of 15 min gave the best polyphenol contents with the following values respectively of (1608.34 ± 58.454 mg EAG / 100g of powder); (1244.44 ± 112.228 mg EAG / 100g powder). (2302.40 ± 451.285 mg EAG / 100g powder) and (1511.89 ± 24.242 mg EAG / 100g powder)

Keywords: *Asparagus acutifolius*; Optimization, Phenolic compounds, Reducing power, Maceration

Résumé

Ce travail a consisté en premier lieu à extraire les composés phénoliques de la plante entière issue de la région d'El Kseur et de Sidi Aich (BEJAIA): *Asparagus acutifolius* (Asperge sauvage) et à déterminer son pouvoir réducteur par une méthode conventionnelle qui se résume par une extraction par macération.

La plante a été soumise à une extraction solide-liquide avec une optimisation des conditions d'extraction à savoir : la nature de solvant et la concentration du solvant d'extraction, le rapport solide-liquide et le temps d'extraction. Les extraits d'*Asparagus acutifolius* ont révélé que l'éthanol 70%, rapport de 0.1g/20ml et durée d'agitation de 15 mn ont donné les meilleures teneurs en polyphénols avec respectivement les valeurs suivantes : 1608.34 ± 58.454 mg EAG/100g de poudre ; 1244.44 ± 112.228 mg EAG /100g de poudre ; 2302.40 ± 451.285 mg EAG /100g de poudre et $1511,89 \pm 24,242$ mg EAG /100g de poudre.

Mots clés: *Asparagus acutifolius* ; Optimisation, Composés phénoliques, Pouvoir réducteur. Macération.