REPUPLIQUE ALGRIENNE DEMOCRATIQUE ET POUAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA



MÉMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : chimie macromoléculaire

Par:

Houatis cherif

Klalib Ramdane

FACULTÉ DES SCIENCES

Thème:

DETERMINTION DES PARAMETRE INFLIANCANT SUR LE RENDEMENT HYDROALCOLIQUE DE METABOLITE SECONDAIR DE PLANTE PUNICA GRINATUME L

Soutenue Devant le jury composé de :

FARCH. S	MCB	UYFM	Président
BEKDOUCHE. H	MCB	ENS KOUBA	Examinateur
BOUAZZA. F	MCA	UYFM	Encadreur
GHARDAOUI. D	MAB	UYFM	Co. Encadreur

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu, le tout puissant pour tous lesbienfaits, la santé, la force, le courage et la volonté qu'il nous a accordé durant notre formation ainsi que l'audace pour dépassertoutes les difficultés pour achever ce modeste travail.

Au terme de ce travail nous tenons à exprimer nos remerciements et nos sincères gratitudes à notre promotrice Mme BOUAZZA Fatima qui a dirigé ce travail et nous a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils et à remercier notre Co-promotrice GARDAOUI Dahbia, pour ses efforts et son soutien.

Nos remerciements vont également : à Mme FARCH Sabrina

Pour l'honneur qu'elle nous fait de présider notre jury

Et à Mme BEKDOUCHE. Hafsa d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous adressons nos remerciements aux ingénieurs du laboratoire de Faculté des sciences qui nous ont aidés à la réalisation de la partie pratique de notre mémoire.

A nous parents et tous la famille « KLALIB. HOUATISS »et tous les amies ;tous les professeurs ;les travailleurs de Université de Médéa

Enfin ces remerciements à tous ceux qui nous aidé de loin ou de près tout au long de ce travail

Ramdane/Cherif

ملخص

الرمان (Punica granatum) هو شجيرة يتراوح ارتفاعها من 2 إلى 5 أمتار ، متفرعة جدًا وشائكة قليلاً ، تنتمي إلى عائلة Lythraceae. يطلق عليه محليًا اسم روماني. منذ العصور القديمة ، تم استخدام شجرة الرمان بما في ذلك أجزائها المختلفة في الطب التقليدي لعلاج الاضطرابات ، ودراستها مهتمة في تحديد العوامل المختلفة التي تؤثر على المحصول الكحولي المائي من المستقلبات الثانوية لبونيكا جراناتوم L المستخلصات الخام (هيدرو- methanolic) التي تم الحصول عليها بعد نقع مساحيق قشر الفاكهة من Punica granatum. لهذا الغرض المحدد للغاية التحليل الكمي الكيميائي النباتي (UV).

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها محصول استخلاص (ماء / ميثانول). محتوى كبير من المستخلصات الثلاثة في المستقلبات الثانوية. تحديد مجموع البوليفينول. أظهرت مركبات الفلافونويد الكلية والألوان (الدباغة) قيمًا تراوحت بين 42٪ و 41٪ و 100٪ على التوالي في مستخلص الماء / الميثانول.

من أجل تحسين هذا الأخير، تم اعتماد منهجية تصميم التجارب ، ويجب أن يسهل الأخير تفسير النتائج وتقليل عدد الاختبارات مع الحفاظ على الجودة ، وتحديد العوامل الأكثر تأثيرًا وبالتالي لاتخاذ الخيارات الصحيحة لإجراء صياغة جيدة. سمحت المعالجة الإحصائية للنتائج التي تم الحصول عليها باستخدام برنامج Excel ، والذي يوفر مجموعة واسعة من وظائف التحليل الإحصائي وأدوات الرسوم البيانية ، بعرض نتائج دقيقة.

الكلمات المفتاحية: لبونيكا جراناتوم L ؛ مستقطب ثانوي ؛ البوليفينول الكلي ، مجموع الفلافونويد ، الألوان (الدباغة) ، التصميم التجريبي.

Resume

Le grenadier (*Punica granatum*) est un arbuste dont la hauteur varie de 2 à 5 mètres, très rameux et légèrement épineux, appartenant à la famille des

Lythracées. Il est appelé localement Roman. Depuis l'Antiquité, le grenadier y compris ses différentes parties sont utilisés en médecine traditionnelle pour traitement des troubles nte étude c'est intéressé à déterminer les différentes paramètres influe sur le rendement hydro alcoolique de métabolites secondaire de *Punica granatum L* L'extraits bruts (hydro-méthanolique) obtenus après une macération des poudres d'écorces de fruits de *Punica granatum.* Dans ce but bien précis une analyse phytochimique quantitative (UV).

Les résultats obtenus ont montré un rendement d'extraction important de L'extrait (eau /méthanol). Une teneur considérable des trois extraits en métabolistes secondaires . Le dosage des polyphenols totaux ; des flavonoïdes totaux,et tanins a révélé des valeurs de l'ordre de 42%.41% et100% respectivement dans netre l'extrait eau/ méthanol .

Pour l'optimisation de la formulation de ce dernier d'émulsion on a adopté la méthodologie des plans d'expériences, cette dernière doit faciliter l'interprétation des résultats et minimiser le nombre d'essai tout en gardant la qualité, et identifier les facteurs les plus influents et ainsi de prendre les bon choix pour la conduite d'une bonneformulation. Le traitement statistique des résultats obtenu à l'aide du logiciel Excel qui offre un large éventail de fonctions d'analyse statistique et d'outils graphiques, a permis la présentation résultats précis.

Mots clés: *Punicagranatum L* ;metabolite secondaire ; polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tanins ,Plan expérience.

Abstract

The pomegranate tree (*Punica granatum L*) is a shrub whose height varies from 2 to 5 meters,very branching and slightly thorny, belonging to the Lythraceae family. It is locally called Roman. Since ancient times, the

pomegranate tree, including its various parts, has been used in traditional medicine for the treatment of severe digestive and intestinal disorders as well as parasitic diseases.

Our present study is interested in determination of the different parameters influence of yield of hydroalcoholic secondary metabolites the *Punica granatum L.*

The crude water methanolextract obtained after maceration of the frit peel powders *Punica granatum L;* for this very specific purposea quantitative photo-chemical analysis (UV).The results obtained showed a high extraction yield of the extract (water_ methanol).A considerable content of the three extracts in secondary metabolite.The determination of total polyphenole .and total flavonoids .and tannins values of the order of 42%. 41% and 100% respectively in our water-methanol.

For the optimization of the study in this hydrotistillation, the methodology of the design of experiments has been adopted, the latter must facilitate the interpretation of the results and minimize the number of tests while maintaining the quality and identify the factors the most influential and thus take the right choices for the conduct of a good formulation. The statistical processing of the results obtained using Excel software, which offers a wide range of statistical analysis functions and graphical tools allowedthe presentation of precise result.

Keywords: *Punica granatum L,* Secondary metabolites, tannins ; total polyphenole total flavonoids ; design of experiments.

Sommaire

Introduction général 01

Etude bibliographique 04

Chapitre I généralités sur lythracées (punicaeae) 05

I. Introduction 05

I.1.2. Définition des plantes médicinales 05

I.2.1. Parties de plantes médicinales utilisées 05

I.2.2. Les Parties sous sol 06

1.2.3. Les parties aériennes 06

I.2.4.plante médicinale en l'Algérie 06

I.2.5. Définition la famille des Lythraceae 06

I.3.Généralités sur les plantes étudiée 07

I.3.1.Punica granatum L 07

I.3.2.Origine du nom 07

I.3.3. Description botanique 07

I.3.4.classification botanique 07

I.3.5. Distribution géographique 08

I.3.5.1 Le grenadier en Algérie 08

I.3.6.Les compositions biologiques de punicagranatum L et leurs compositions chimiques ..08

I.3.6.1. Les compositions biologiques 08

I.3.6.2. Compositions chimiques 09

I.3.6.3. L'écorce de la racine 10

I.3.6.4.L'écorce de la grenade ou malicorium et la membrane blanche 10

I.3.6.5.Les feuille 11

I.3.6.6. Les fleurs 12

I.3.6.7.Le fruit 12

I.4.La partie comestible 13

I.5.Propriétés thérapeutiques de Punica granatum L 13

I.5.1 .Activité antioxydant 13

I.5.2. Activité anti-inflammatoires 14

I.5.3. Activité anticancéreuse 14

I.5.4. Activité antidiabétique 14

I.5.5.Activité antimicrobiennes 14

I.5.6.Activité antiulcéreuse 15
I.5.7. Action cicatrisante de la punica granatum L 15
I.5.8. Autres propriétés de grenade 15
I.6.Méthodes d'extraction des métabolites secondaires 15
I.6.1 Méthodes d'extraction conventionnelles 15
II.3.2 Techniques d'extraction non conventionnelles 17
Chapitre II Les substances naturelles a activités biologique 20
II.1.Introduction 20
II.1.1.Métabolites primaires 20
II.1.2 métabolite secondaire 20
II.1.3.Classification des métabolites secondaires 21
2.1. Les composés phénoliques 21
2.2. Les terpenoïdes 21
2.3. Les alcaloïdes 22
II .2. Les polyphénols 22
II .2.1. Classification des polyphénols 23
II .2.2.Effets biologiques des polyphénols 24
II .3 .Les flavonoïdes 25
II.3.1. Structure et classification 26
II.3.2. Effets biologiques des flavonoïdes 27
II-4-Les tanins 28
II-4-1-Classification 29
II.4.2. Utilisation des tanins 29
II.1.4. Le rôle des composés phénoliques 30
II.1.4.1.Rôle physiologique 30
II.1.4.2. Rôle technologique 30
II.1.4.3. Activité antioxydante 30
Chapitre III partie Expérimental 31
III. Matériel et méthodes 33
III.1. Matériel 33
III.1. Matériel végétal 33
III.1.1. Conseils et préparation des plantes médicinales 33
III. 1. 2. Séchage et conservation des plantes 33
III. 1. 2. 1.Les différentes modes de préparation des plantes 34
III.2. Matériel du laboratoire 35

III.2.I. Préparation des échantillons 36
III.2.2. Traitements des échantillons 36
III.3 Extraction des métabolites 38
III.3.1.Extraction par macération dans le méthanol (extraction solide/liquide) 38
III.3.2 Evaporation (rotavape) 40
III.4.Le rendement des extraits secs 41
III.5.Les paramètres influent sur le rendement 42
III.6.Dosage des polyphenols totaux (pt) et des flavonoïdes totaux(ft) 42
III.6.1. Préparation de l'extrait pour les dosages 42
III.6.2.Dosage des poly-phénols totaux (pt) 43
III.6.3.Dosage des flavonoïdes totaux (ft) 44
III.6.3.Dosage des tanines 46
III.6.3.Analyses par spectroscopie UV-VIS 47
Chapitre IV 48
IV.4.1 Introduction 49
IV.2 Théorie d'optimisation expérimentales 49
IV.2.1 Méthodes classiques 49
IV.2.2 Méthodes des plans d'expériences 50
IV.2.2.1 Principe et intérêt des plans d'expériences 50
IV.2.2.2 Analyse statistique 51
IV.2.2.3 Outils et quelques notions préliminaire..... 51
IV.2.3 Interaction 53
IV.4 Domaine d'étude 54
IV.4.1 Surface de réponse 54
IV.4.2 Analyse statistique 56
IV.4.3 Construction de la matrice d'expérimentation 57
IV.4.4 Etude de la multi colinéarité 59
IV.4.5.1 Tolérance 59
IV.4.5.2 Régression de la variable 60
IV.4.5.3 Régression de la variable rendement 60
IV.4.5.4 Coefficients de corrélation R^2 62
IV.4.5.5 Analyse de la variance 62
IV.4.5.6Analyse de la variance de rendement 63
IV.4.5.7 Test de la normalité 64
IV.4.5.8 L'interprétation du résultat 71

IV.4.6 Conclusion de la partie pratique 71

Liste des figures

Chapitre I

Figure (I.1) : Les fleurs et fruits du grenadier (Punica granatum L.)..... 09

Figure(I.2): Le punica granatum L et ses différentes parties 10

Figure(I.3) : L'écorce de punica granatum L et la membrane blanche 11

Figure (I.4): Feuilles de Punica granatum L 11

Figure (I.5) : Fleurs de punica granatum L 12

Figure(I.6): Le fruit de Punicagranatum L 12

Figure (I.7) : Exemple de domaine d'application des ultrasons en fonction de la fréquence et de la longueur d'onde 19

Chapitre II

Figure(II.1) : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe 24

Figure (II. 2) : Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire 24

Figure (II.3): Effets biologiques des polyphénols 25

Figure (II.4) :Stabilite de flavonoxy 26

Figure (II.5) : Structure de base des flavonoïdes 26

Figure(II.6) : Structures chimiques de quelques flavonoïdes 27

Figure(II.7) Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes 27

Figure(II.8): Structure des tanins 28

Figure(II.9): Classification des tanins 29

Chapitre III

Fig(III.I.) l'écorce de fruit 37

Fig. (III.2.) l'écorce Sèche 37

Figure. (III.3.) Broyage 38

Figure (III.4) : extraction 39

Figure (III.5) : centrifugeuse 39

Figure (III.6) : l'extrait après la centrifugation 39

Figure (III.7) : Evaporateur rotatif 40

Figure (III.8) : l'extrait récupéré 41

Figure (III.9) : l'organisation pour le dosage 43

Figure (III.10) : Le complexe résultant de polyphénols 44

Figure (III.11) : Le complexe résultant des flavonoïdes 45

Figure (III.12) : Le complexe résultant des tanins 46

Figure (III.13) : Spectrophotomètre 47

Chapitre IV

Figure(IV. 1): Illustration d'un effet d'un facteur 52
Figure (IV.2) Illutation d'une interaction 53
Figure (IV. 3) : Représentation graphique des limites du domaine d'un facteur 53
Figure IV.4 : Représentation du domaine d'étude et des meilleurs emplacements despoints expérimentaux 54
Figure IV. 5: L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de répons 55
Figure IV.6. : Effets des facteurs sur le rendement 65
Figure IV.7. : Effets des facteurs sur le rendement POLYPHENOL 65
Figure IV.8 .: Effets des facteurs sur le rendement FALAVONOIDE 66
Figure IV.9.: Effets des facteurs sur le rendement Tanins 66
Figure IV.10.: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement) 67
Figure IV.11: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement polyphenole) 68
Figure IV.12: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement flavonuide) 69
Figure IV.13: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement tanins) 70

Introduction général

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations actuelles, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle, où les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité .Aujourd'hui, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales en raison de leur réservoir immense en composés potentiels et en molécules bioactives. A coté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires. Ces derniers représentent une source importante de molécules à savoir les polyphénols et les flavonoïdes, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires.

Beaucoup de métabolites secondaires sont également importants pour notre alimentation (goût, couleur), et d'autres ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des médicaments, colorants, arômes, parfumset des insecticides.

L'Algérie est riche en plantes médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes. Ces plantes médicinales sont, donc, la source de produits à forte valeur ajoutée. C'est pourquoi, nous nous somme intéressé à étudier cette plantes, a cause riche en métabolites secondaires.

Ce travail a pour objet l'extraction et l'analyse chimique des principes actifs d'un espèce appartenant à la famille des Lythraceaes *punica granatum L* . Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des troubles

Dans ce contexte notre étude s'inscrit en effet on se propose l'extraction des de la plante *punica granatum L*. Par hydrodistillation et la caractérisation physicochimique de l'extrait avec une modélisation paramétriques par la méthode de plans d'expériences dont le but est l'optimisation des paramètres opératoires du processus expérimental pour atteindre le meilleur rendement massique de l'extraction.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties.

La première partie propose une mise au point bibliographique sur les différentes notions abordées dans ce travail : tel que les plantes médicinales , la nature de la plante employée dans cette étude, les métabolites secondaire ;et les méthodes d'extraction ; Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, les méthodes de caractérisation et l'instrumentation d'analyse ainsi que le protocole opératoire du

procédé d'extraction de métabolites secondaire et enfin les résultats obtenus et la caractérisation physicochimique de nos extraits sont amplement discutés dans un troisième chapitre. Le quatrième chapitre est consacré à une modélisation paramétrique du processus d'hydrodistillation par l'optimisation du rendement massique de métabolite secondaire à travers l'application de la méthode des plans d'expériences Excel stat. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, la liste des références bibliographiques et les annexes.

.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

I. Introduction

Depuis ces dernières années, une grande attention est accordée aux bienfaits de la consommation régulière des fruits et légumes sur la santé humaine. Cette valeur nutritive réside dans la grande variété de molécules biologiquement actives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines…).

Actuellement grâce ou progrès scientifique considérables enregistrés depuis la fin du XIX^{ème} siècle (technique d'analyse et extraction... etc.) .Ils ont remarquons que le traitement naturel c'est à dire les sources des médicaments sont les plantes médicinales.

I.1.2. Définition des plantes médicinales

Plusieurs définitions ont été données aux plantes médicinales et la gamme de ces plantes s'avère très longue et élastique et peut concerner la plupart des plantes spontanées et des nombreuses espèces arboricoles et herbacées cultivées.

D'après ces diverses plantes peuvent être, tour à tour ou ensemble, aromatiques, médicinales, cosmétiques ou de parfumerie. Les unes et les autres sont Utilisées sous diverses formes : en l'état transformées (déshydratées, surgelées), élaborées (Extraits, huiles essentielles, oléorésines, isolats). Elles peuvent également se distinguer Selon les organes récoltés. Pour éviter toute divergence dans la compréhension de certains mots clés, nous adoptons dans ce chapitre les définitions données par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Selon l'OMS, "**une plante médicinale** est une plante qui contient, dans un ou Plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, Ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique hémi-synthèse". Cette définition permet de distinguer entre les plantes médicinales déjà connues dont les propriétés Thérapeutiques ou comme un précurseur de certaines molécules ont été scientifiquement Établis, et d'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle.

I.2.1. Parties de plantes médicinales utilisées

Les différentes parties de la même plante médicinale peuvent présenter des constituants chimiques très différents et qui n'ont pas la même action thérapeutique. Généralement, en médecine traditionnelle, la partie qui contient le plus de principes actifs est la plus employée. Les différentes parties de plantes qui peuvent être employées chez la plupart des populations sont ceux qui ont été décrites par.

I.2.2. Les Parties sous sol

Racine: Les racines peuvent être fibreuses, solide ou charnues.

1.2.3. Les parties aériennes

Toutes les parties de la plante qui se trouvent au dessus du sol. Elles sont récoltées, très souvent, lors de la floraison. Exemple (*Hypericum perforatum* de la famille Hypericaceae).

Écorce: L'écorce est la couche protectrice externe d'un tronc d'arbre, elle est souvent riche en toxines (phénols) et principes amers (tanins) ce qui la rend plus protectrice. Exemple : (*Cinchona* sp., Rubiaceae) et (*Cinnamomum camphora* et *C. camphora* , les deux de la famille Lauraceae).

Feuilles : Les feuilles peuvent être utilisées seules ou mélangées avec leur pétiole. Exemple : Ginkgo biloba de la famille Ginkgoaceae.

Fleurs : Les fleurs sont très utilisées dans la médecine traditionnelle.

Fruits : Exemple (Punica granatum L; Citrus sp).

Graines : Exemple (Ricinus communis; Foeniculum vulgare).

I.2.4.plante médicinale en l'Algérie

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Ce sont des savoir-faire an ces trau transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurale shéritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées. L'Algérie comprenait plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques.L'Hoggar comprenait une flore de 300 espèces dont plus d'un quart ont un usage médicinal traditionnel qui se trouvent en un état précaire avec les autres plantes suite aux effets de sécheresse excessive accentuée par l'activité mal raisonnée de l'homme.

I.2.5. Définition la famille des Lythraceae

La famille des *Lythraceae* est une famille de plantes dicotylédones qui compte 620 espèces . Ce sont des arbres ou des vivaces ou annuelles, dont certaines sont aquatiques. Les *Lythraceae* ligneuses n'existent qu'entre les tropiques ou en zone méditerranéenne comme le grenadier (*Punica granatum L*).

I.3.Généralités sur les plantes étudiée

I.3.1.*Punica granatum L*

Le grenadier appartiennent de la famille des Lythraceae est appelée *punicagranatum L*

I.3.2.Origine du nom

La grenade porte le nom de pomme punique, c'est le Malum punicum de Pline, ou pomme de Carthage. Elle sera alors renommée Punica granatum. Punica en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour puniceus qui signifie rouge écarlate en latin ; et granatum pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit.

I.3.3. Description botanique

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut Atteindre 6 m de haut. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses.La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, lagraine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les Variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre.

Il peut vivre jusqu'a 200 ans mais est le plus productif en fruits dans ces 20 premières années fructification ; son écorce est gris beige et à tendance à se crevasser et à desquamer avec l'âge. Ces feuilles caduques sont opposées, luisantes et mesurent 3 à7 cm de long sur 1 à 2 cm de large. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre, cultivé partout et souvent subi spontané dans le tell.la floraison lieu en fi d'été. Fructification en septembre et octobre .

I.3.4.classification botanique

D'après La classification des charcheurs botanique représente dans le Tableau (I.1).

Tableau(I.1). Classification botanique du *punicagranatum L*.

Embranchement	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	*Punica*
Espèce	*Punicagranatum*

I.3.5. Distribution géographique

Le grenadier est originaire du nord de l'Iran et de l'Afghanistan ou il couvre de Grandes étendues à l'état spontané depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC.

Des principaux pays de culture du grenadier sont l'Iran, l'Afghanistan la Turquie, le Turkestan (U.R.S.S). Sa culture est développée autour du Bassin Méditerranéen ou son exploitation commerciale est développée en Espagne principalement et aussi en Italie, en Grèce et au Maroc de façon importante.

Les Principaux centres de culture en Algérie : Mohammedia, Relizane (l'oranie en générale) et quelques points de la Mitidja. Malheureusement dans la plus part des cas le manque de soin et l'état d'abandon font que le fruit renferme le plus souvent des grains petits, acides, à pépin volumineux à cloison adhérente qui rendent la consommation désagréable.

I.3.5.1 Le grenadier en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant , les plantation ne sont pas très important en Algérie. Il existe de nombreuse variétés de *punica granatum L*, de qualités très différentes .Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie .On ne connait que leur appellation locale (Lahlou ,Elmouze,...).Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat : Espagne rouge ,Gajin ,Selection station ,Corda travita ,Sefri ,Chelfi , Moller huesso ,Zemdautomne ,Doux de Kolea , Mellisse, Sulfani,Messaad , Papers shell ,Spanish duoy[10].

I.3.6.Les compositions biologiques de *punicagranatum L* et leurs compositions chimiques

I.3.6.1. Les compositions biologiques

Déjà au. XIXème siècle, le *punica granatum L* suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre ,tels que la pelletiérine. Grâce aux relativement récents procédés d'analyse chimique, comme les techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier.

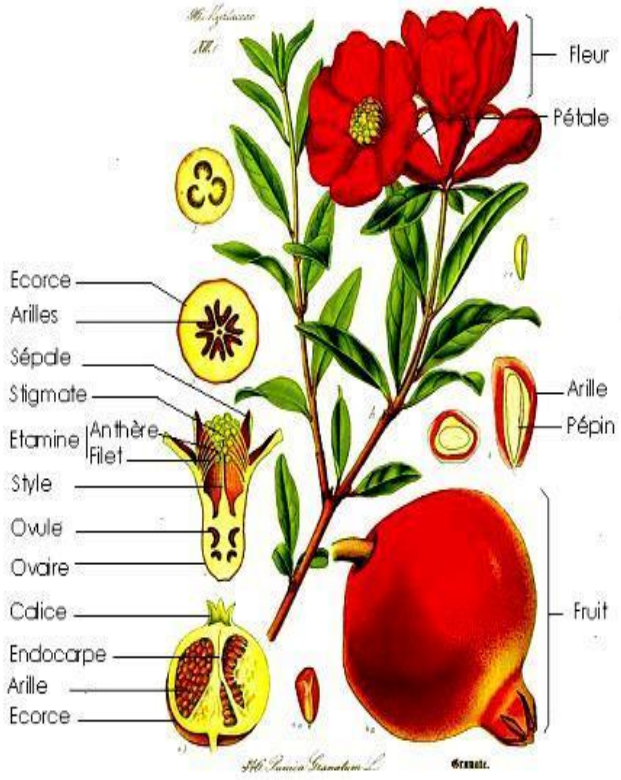
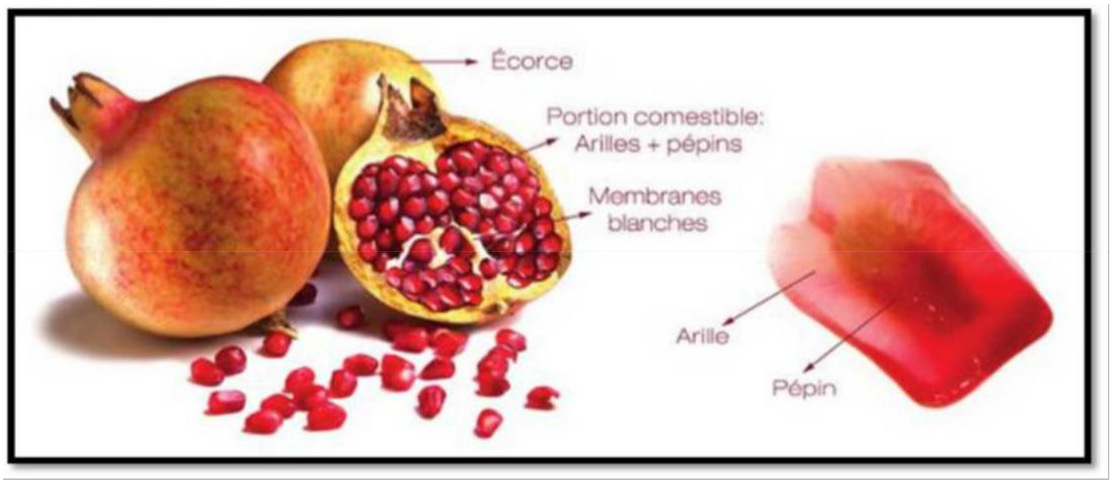


Figure (I.1) : Les fleurs et fruits du grenadier (*Punica granatum L.*).

I.3.6.2. Compositions chimiques

Le *punicagranatum L* suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tels que la pelletiérine. Grâce aux procédés d'analyses chimiques récentes, comme la chromatographie, de résonance magnétique nucléaire ou encore la spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition chimique des différents organes du grenadier.



Figure(I.2): Le *punica granatum L* et ses différentes parties.

I.3.6.3. L'écorce de la racine

L'écorce de la racine du *punicagranatum L* a été analysée d'abord par Mitouart, en 1824, qui a fait a retiré une matière grasse assez abondante, des tanins, de l'acide gallique, une matière résineuse, de la mannite, du sucre et « du ligneux ».

Puis La tour de Trié, en 1831, a trouvé dans cette écorce de la chlorophylle, beaucoup de résine, des tanins, de la matière grasse, et une substance cristalline sucrée qu'il nomme «grenadine ». Il sera montré par la suite que cette substance est simplement de la mannite . C'est en 1878 qu'un pharmacien français, Charles Tanret, a découvert des alcaloïdes dans l'écorce du *punica granatum L* , dont le principal été appelé pelletiérine, et 3 autres qui sont :l'iso pelletiérine, pseudo pelletiérine et méthylpelletiérine . En 1899, Piccinini a ajoute à cette liste un cinquième alcaloïde liquide, isomère de la méthylpelletiérine, qui est : l'isométhylpelletiérin. Ces alcaloïdes représentent environ 0,70% de l'écorce de racine du grenadier.

Plus récemment, analyse complète de cette écorce par des techniques modernes, met en évidence la présence d'ellagitaninstels que la punicaline, la punicalagine, les punicacortéines A, B, C et D, et la punigluconine, ainsi que des alcaloïdes pipéridiniques autres que la pelletiérine et ses dérivés.

I.3.6.4.L'écorce de la grenade ou malicorium et la membrane blanche

Environ 50% du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins, les proantocianidines et les minéraux, essentiellement du

potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium. L'écorcecoriace et plutôt épaisse est jaune dans certaine variétés.

Elle peut reformées jusqu'à 28% des tanins.

L'écorce, riche en substances antimicrobiennes et antioxydantes, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire.



Figure(I.3) : L'écorce de *punica granatum L* et la membrane blanche

I.3.6.5.Les feuille

Les feuilles du *punica granatum L* r contiennent des flavones, telles que la lutéoline et L'apigénine.Cette dernière possède des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la unicalagine.



Figure (I.4): Feuilles de *Punica granatum L*.

I.3.6.6. Les fleurs

Les fleurs du *punica granatum L* contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique.





Figure (I.5) : Fleurs de *punica granatum L*

I.3.6.7.Le fruit

Le fruit possède dans ses différentes parties : écorce, membranes blanches, arilles et pépins.de nombreux composés chimiques.



Figure(I.6): Le fruit de PunicagranatumL

I.4.La partie comestible

La composition des graines de *punica granatum L* est la suivante : eau (85%) ; sucres (10%), principalement fructose et glucose ; acides organique (1,5%) essentiellement acide ascorbique, citrique et malique ; composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes (essentiellement les anthocyanines).

Tableau(I.2) : Composition nutritionnelle de la partie comestible (L'officinal, 2011)

GRENADE (VALEUR NUTRITIVE POUR 100 G)			
Eau : 79 à 80 %	Matières azotées : 1,2 %	Mat. hydrocarbonées : 16 %	
Fibres : 3 à 3,5 g	Valeur énergétique : 52 à 60 kcal		
Protéines : 1 g	Lipides : 0,5 g	Glucides : 13 g	
Sels minéraux & oligo-éléments			
Potassium : 250 mg	Phosphore : 22 mg	Calcium : 11 mg	Magnésium : 5 mg
Sodium : 5 mg	Fer : 1 mg	Zinc : 200 µg	Cuivre : 100 µg
Manganèse : 100 µg			
Vitamines			
Vitamine C : 20 mg	Vitamine B1 : 30 µg	Vitamine B2 : 20 µg	B3/PP/Niacine : 20 µg
Vitamine B5 : 50 µg	Vitamine B6 : 10 µg		
Vitamine A : 30 µg			

En outre, les graines de grenade sont une source importante de lipides, car les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec).

I.5.Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L*

I.5.1 .Activité antioxydant

Des études in vitro ont montré que le jus de *punica granatum L* et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydant du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux.

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines.Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit.

I.5.2. Activité anti-inflammatoires

Des études ***in vivo*** ont montré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénae, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. Lalipooxygénase, qui catalyse la conversion de l'acidearachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait.

I.5.3. Activité anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont montré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développent de la tumeur. Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose.

Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate SpecificAntigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le *punica granatum L* pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et antiinflammatoire.

I.5.4. Activité antidiabétique

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de *punic granatum L* diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL en améliorant les. ratios total/HDL et LDL/HDL. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques. sans affecter les paramètres diabétiques.

I.5.5.Activité antimicrobiennes

L'écorce du fruit de *Punica granatum L* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes.

I.5.6.Activité antiulcéreuse

L'écorce de *punica granatum L* séchée en poudre présente un efficace traitement efficace contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac. L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de *punica granatum L* (70% méthanol v/v), le pourcentage d"inhibition est respectivement de 22,37% et74, 21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol.

I.5.7. Action cicatrisante de la *punica granatum L*

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de *punica granatum L* (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de *punica granatum L* ont été guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins. Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique [30].

I.5.8. Autres propriétés de grenade

Le jus de *punica granatum L* stimule le foie et la rate. Il renforce la qualité de sang, permettant de mieux nourrir les tissus. Il est très régénérant pour le cœur et le tissu reproducteur. Il est aussi très détoxifiant comme le jus de citron, mais sans acidité. Il donne de vitalité et stimule l'immunité physique et mentale.

L'écorce, les racines de l'arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937.

I.6.Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

I.6.1 Méthodes d'extraction conventionnelles

Il existe plusieurs techniques d'extraction utilisées de manière conventionnelle depuis de plusieurs d'années dans l'industrie chimique, pharmaceutique ou même agroalimentaire. Ces techniques d'extraction se résument en extraction par macération ; l'hydrodistillation ; et soxhlet .

La macération est une méthode d'extraction populaire et peu coûteuse. macération consiste à laisser un matériel végétal dans un solvant, dans le but d'extraire les molécules solubles. Cette méthode a plusieurs avantages : utilisation de mélange de solvants, contrôle de la température d'extraction et maintien des molécules thermosensibles. La macération nécessite des étapes de filtration et d'évaporation qui sont plus ou moins longues.

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction de molécules bioactifs et d'huiles essentielles. Il existe trois types d'hydrodistillation : la distillation à l'eau, la distillation à l'eau et à la vapeur et la distillation di à la vapeur. L'eau chaude et la vapeur sont les principaux facteurs influençant l'extraction des composés bioactifs du tissu végétal. Au cours de l'hydrodistillation trois processus physico-chimiques principaux s'interviennent: hydrodiffusion , hydrolyse et décomposition par la chaleur. L'inconvénient principal l'hydrodistillation qu'à une température d'extraction élevée, certains composants volatils Peuvent être perdus, ce que rendre son utilisation limitée pour l'extraction de composés thermosensibles**.**

L'extraction au soxhlet a été développée en 1879 par le chimiste allemand Franz Ritter Von Soxhlet. Il a été utilisé principalement pour l'extraction des lipides mais au cours des années il a été utilisé pour extraire des composés de métabolite secondaire précieux de diverses sources Naturelles. Le principe de l'extraction au Soxhlet (SOE) nécessite que l'échantillon soit Placé dans un porte- cartouche qui est progressivement rempli de solvant. Lorsque le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire le soluté du porte-cartouche et le Décharge dans le ballon de distillation. Cette opération est répétée jus qu'a l'extraction soit terminée.

Les avantages de l'extraction au soxhlet peuvent être arrangés comme suit : contact rapide entre le solvant et l'échantillon, meilleur transfert de matières et pas d'étape de filtration après l'extraction. Cette technique présente plusieurs inconvénients tels que : temps d'extraction important, consommation importante de solvants, consommation d'énergie importante, utilisation de hautes températures pendant longues périodes et dégradation des composés thermolabiles.

II.3.2 Techniques d'extraction non conventionnelles

Comme les méthodes d'extraction conventionnelles ont dés avantages importants, de nouvelles méthodes d'extractions ont été inventées dans le but d'améliorer l'efficacité de L'extraction de molécules bioactives. Ces nouvelles méthodes d'extractions permettent de Réduire la consommation d'énergie et favorisent l'utilisation de solvants non toxiques dans Le but d'améliorer la qualité de l'extrait..

L'extraction assistée par micro-ondes est une méthode d'extraction très simple, un champ électromagnétique assure la destruction des cellules végétales permettant ensuite la qu'à ce que libération de leurs contenus. L'appareil émet des ondes de hautes fréquences varient de 300 MHz à 300 GHz ce qui occasionne un réchauffement de l'eau contenue dans la matière végétale par le champ électromagnétique, provoquant une lyse des cellules végétales. Plusieurs avantages de l'extraction assistée par micro-onde ont été décrits par Cravotta, 2008: chauffage rapide, gradients thermiques réduits, réduction de la taille de l'équipement et augmentation du rendement en extrait. Cette méthode peut extraire les composés bioactifs plus rapidement et assure une meilleure récupération que les procédés d'extraction conventionnels. L'inconvénient principale de cette méthode est la chaleur émise au cours du procédé peut être très élevée, qui peut provoquer la destruction des molécules thermosensibles.

L'extraction assistée par liquide pressurisé est une méthode très efficace. Le concept de cette technique consiste à l'application de haute pression pour que les solvants restent au de là de leur point d'ébullition normal. En tenant compte du rendement, de la reproductibilité, du temps d'extraction et de la consommation de solvant, l'extraction assistée par liquide pressurisé a été considérée comme une alternative aux méthodes conventionnelles en raison d'un procédé plus rapide et d'une utilisation plus faible des solvants. L'utilisation d'une température et d'une pression plus élevée permet d'augmenter la solubilité des composés dans le solvant tout en diminuant la viscosité et la tension de surface du solvant utilisé, ce qui favorise un meilleur contact avec la matrice .

L'extraction par de l'eau subcritique est une technique largement utilisée pour l'extraction de molécules bioactives. Un liquide atteint son état subcritique lorsque la température ou la pression arrive à une température supérieure à son point critique (la température maximale en phase liquide). À l'état subcritique l'eau possède une constante diélectrique(ε) beaucoup plus faible de l'ordre 25 qu'à son état normal (température et

pression normale est de l'ordre 80). Cette valeur est identique à celle de solvants organiques à un état normal (température et pression normale), tels que le méthanol et l'éthanol. À une constante diélectrique basse, caractéristiques apolaires et ce qui permette de séparer les charges caractérisant les molécules polaires . Le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité et une tension de surface plus faibles qu'un solvant liquide ce qui permet une pénétration dans la matrice de l'échantillon et un transfert de masse favorable. Le temps d'extraction de cette technique est considérablement réduit par rapport aux méthodes conventionnelles. Le reflux répété du fluide supercritique sur l'échantillon fournit une extraction complète. le solvant organique présente des caractéristiques apolaires et ce qui permette de séparer les charges caractérisant les molécules polaires . Le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité et une tension de surface plus faibles qu'un solvant liquide qui permet une pénétration dans la matrice de l'échantillon et un transfert de masse favorable. Le temps d'extraction de cette technique est considérablement réduit par rapport aux méthodes conventionnelles. Le reflux répété du fluide supercritique sur l'échantillon fournit une extraction complète.

L'extraction par ultrasons (UAE) et émulsion ultrasoniques Les ultrasons sont des ondes vibratoires acoustiques ayant des fréquences allant de 16 kHz à 10^{10} kHz. Ils sont donc à l'origine de sons inaudibles pour l'humain, car leurs fréquences sont en majorité supérieures au seuil d'audibilité de notre oreille (0.02 kHz à 20 kHz). En fonction de leur fréquence, le domaine d'application des ultrasons diffère (FigureI.7). L'appareil à ultrasons utilisé pour l'extraction génère des ultrasons de puissance (20 kHz). Dans cette catégorie, deux niveaux sont distingués : ceux de basses fréquences, allant de 16 à 100 kHz, et ceux de hautes fréquences, allant de 100 kHz à 1000 kHz. En milieu solide, les ultrasons de puissance vont produire des échauffements et une vibration du milieu, alors qu'en milieu liquide, ils produiront essentiellement un phénomène de cavitation.

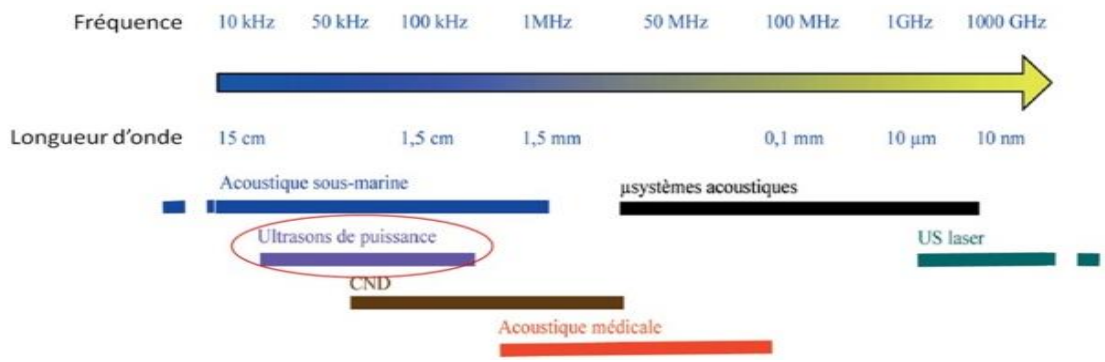


Figure I.7 : Exemple de domaine d'application des ultrasons en fonction de la fréquence et de la longueur d'onde.

L'utilisation d'ultrasons comme méthode d'extraction présente plusieurs avantages : diminuer les temps d'extraction et les quantités de solvants utilisés, tout en augmentant les rendements d'extraction et en gardant une température basse dans le milieu. Les molécules thermolabiles sont ainsi préservées .Elle peut être utilisée avec des échantillons solides ou liquides et pour extraire des composés organiques ou inorganiques.

Chapitre II

II.1.Introduction

Les plantes contiennent des métabolites qui sont responsables de leurs propriétés médicinales ; Les métabolites sont les produits intermédiaires du métabolisme. Le terme métabolite est généralement par définition limité à de petites molécules. Les métabolites ont diverses fonctions, y compris l'énergie, la structure, la signalisation, un stimulant et des effets inhibiteurs sur les enzymes.

On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires.

II.1.1.Métabolites primaires

Les métabolites primaires est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Les métabolites primaires rassemblent les acides aminés, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques. Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais possède typiquement une fonction écologique importante (c'est-à-dire une fonction relationnelle).

II.1.2 métabolite secondaire

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante qui n'est pas encore parfaitement élucidé.Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entre pas dans le métabolisme générale (primaire), ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétale (croissance, développement, reproduction…) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétale lui même, rôle de défense, rôle de résistance.

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites Secondaire dans l'organisme végétal. Suivant les espèces et les diverses catégories de composés , on peut les trouver dans les différents organes ou au contraire, ne les rencontre que dans les tissus très spécialisés, leur taux relevé par l'analyse d'une plante ou d'un fragment, varie grandement durant l'ontogenèse (croissance jusqu'à la floraison) et l'ontogenèse (formation du fruit), par ailleurs, il est certain que la quantité observée de métabolites secondaires, à un moment donné, est

la résultante de nombreux mécanismes métaboliques et physiologiques : biosynthèse, dégradation transport, capacité d'accumulation et de bioconversion (réponse à la pression de l'environnement).

Les métabolites secondaires, à un moment donné, est la résultante de nombreux mécanismes métaboliques et physiologiques : biosynthèse, dégradation transpor, capacité d'accumulation et de bioconversion (réponse à la pression de l'environnement).

II.1.3.Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques.

On distingue trois classes principales, les composés phénoliques : terpènes, alcaloïde, et flavonoïde. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine.

2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composésr eprésentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage .Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins). Legroupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés photochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes.

2.2. Les terpenoïdes

Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « Pistacia Terebinthus ».

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant unestructure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale . Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux. L'exploitation de ces composés s'effectuait sous

forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation.

2.3. Les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe.

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Ainsi, la nicotine, produite dans les racines, migre vers les feuilles où elle est diméthylée. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles.

Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques.

Le plus souvent, la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de site précis (racine en croissance, cellules spécialisées de laticifères, chloroplastes) ; ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage.

II .2. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans toutes les parties plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point en commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH.

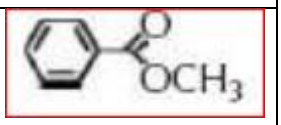
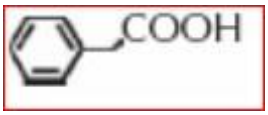
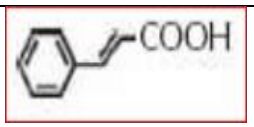
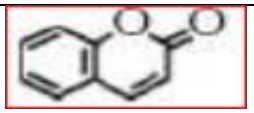
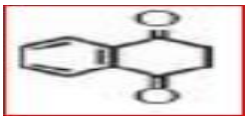
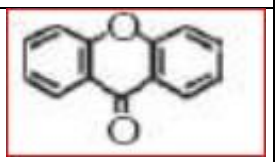
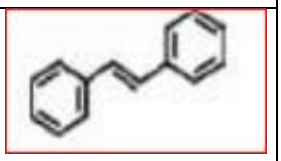
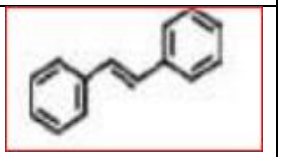
Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines.

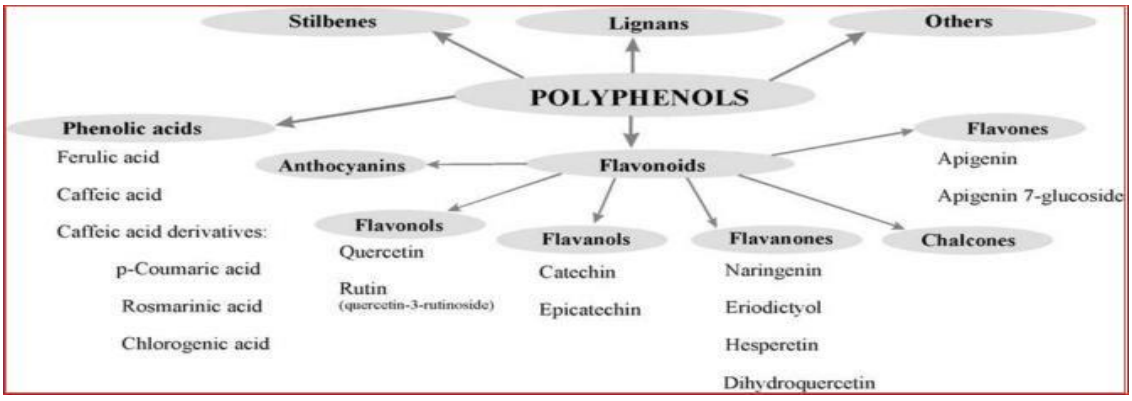
L'extraction des polyphénols de plantes médicinales est l'une des principales étapes de nombreuses études biologiques et thérapeutiques. Le rendement de cette extraction est également affecté significativement par plusieurs paramètres, tels que la température et le temps d'extraction. Vitesse séparation…….ex .

II .2.1. Classification des polyphénols

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

Tableau(II.1): Structure des squelettes des polyphénols

Nbre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de Base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide Phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides Hydroxycinamiques	Acide Coumarique	
9		Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	



Figure(II.1) : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe

II .2.2.Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose. En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus.

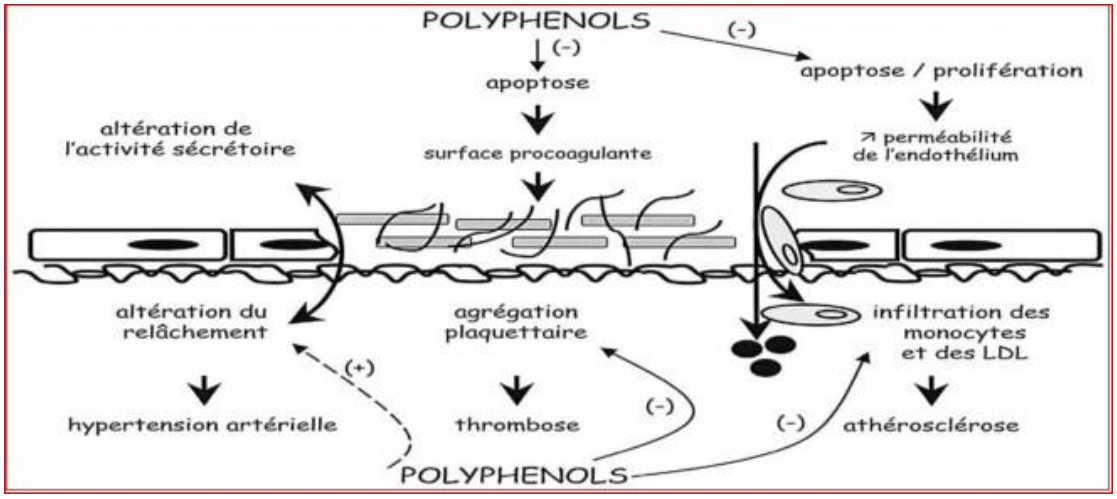


Figure (II. 2) : Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

Les symboles(–) représententl'effetinhibiteurdespolyphénols,etlessymboles(+) montrent l'amélioration de la vasodilatation endothéliale par les polyphénols.

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

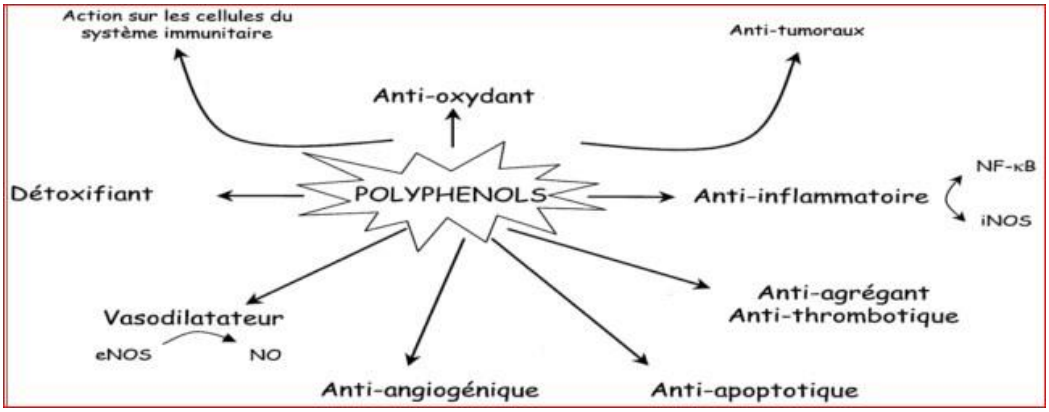


Figure (II.3): Effets biologiques des polyphénols

II .3 .Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées.

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C. d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène.

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyle, l'alkoxyle et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (FL-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stables.

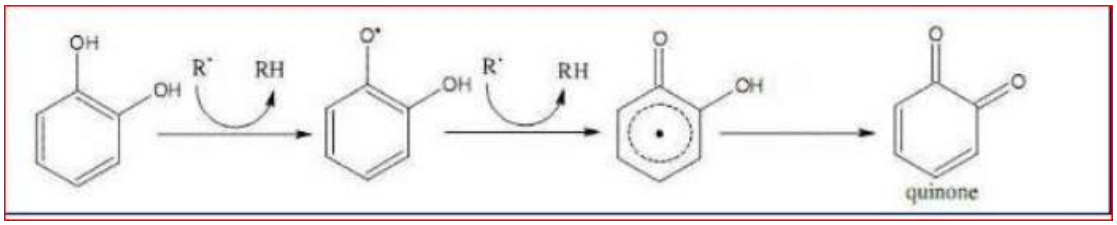


Figure (II.4) :Stabilite de flavonoxy

II.3.1. Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne. Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C.

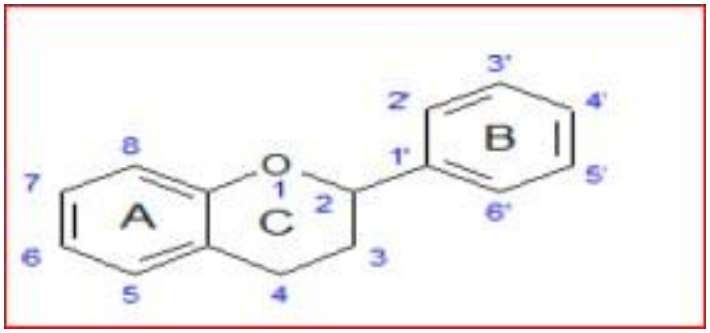
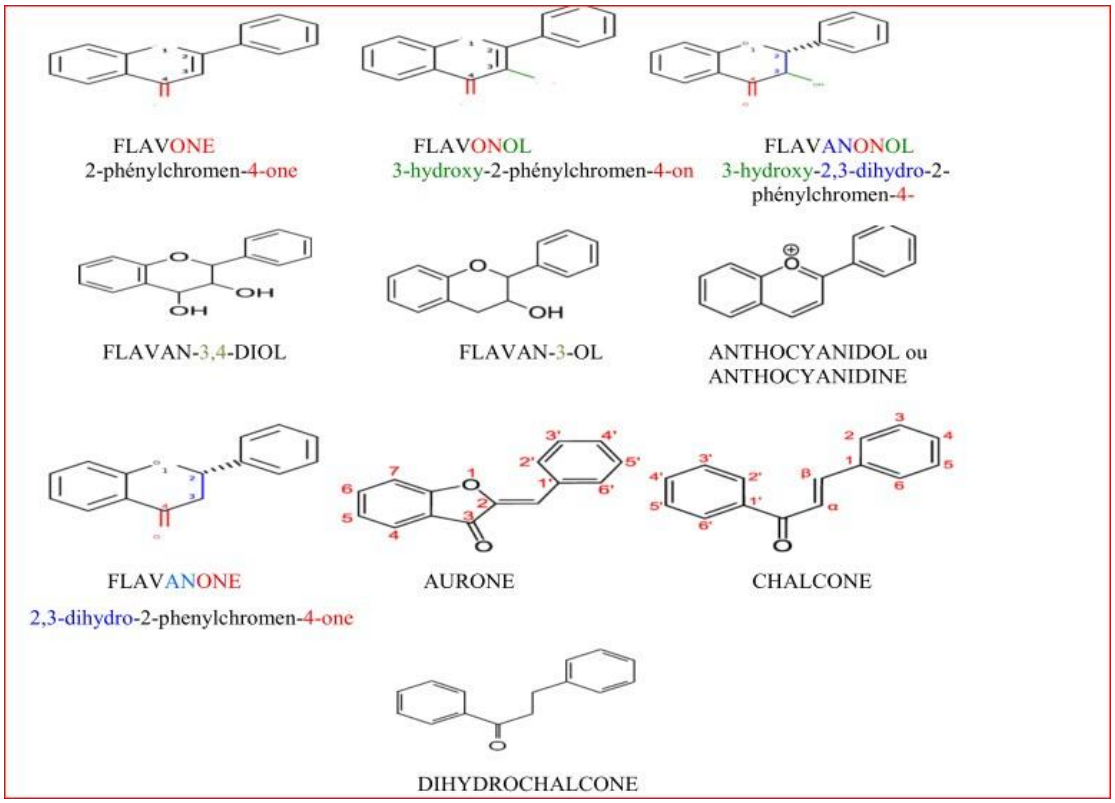


Figure (II.5) : Structure de base des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (figure II.5).Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane. Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyl la flavane est appelé Flavanone. Si la liaison C2C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone. Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol. Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane.

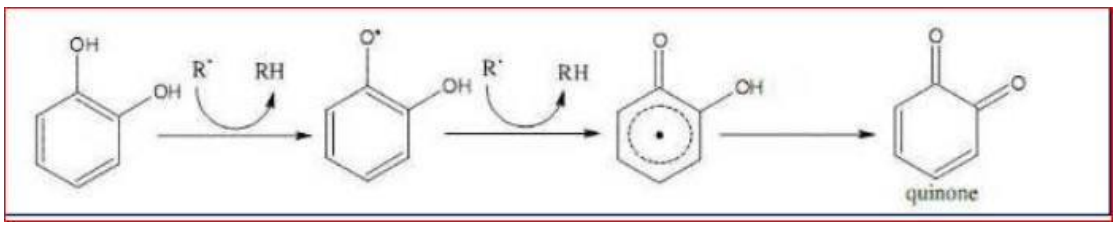


Figure(II.6) : Structures chimiques de quelques flavonoïdes

II.3.2. Effets biologiques des flavonoïdes

Activité antioxydante :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par lachélation (FigureII.7) Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.



Figure(II.7) Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes

Activité antibactérienne :

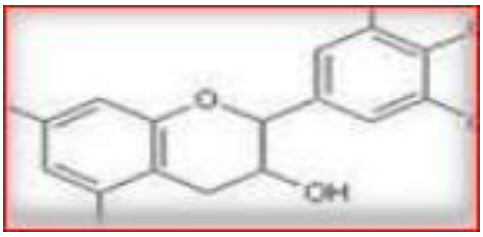
Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens. De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes . De même ces propriétés détectées chez la propolis, sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes, en particulier le galangin et le pinocembrin. L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur Dianthus caryophyllus a montré l'efficacité de flavonoïde glycoside, sur des souches fongiques.

Un nouveau flavanone prénylé isolé à partir de l'arbuste Eysenhardtia texana, et un flavane-7 hydroxy-3,4- methylenedioxy flavane isolé à partir des fruits de Terminalia bellerica, ces deux flavonoïdes montrent une activité contre le microbe pathogène opportuniste : Candida albicans.

Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Les flavones, aurones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes.

II.4.Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da naturels. L'action.



Figure(II.8): Structure des tanins .

Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides**.**

Les tanins sont très répandu dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les rosacée.

Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines.

II.4.1.Classification

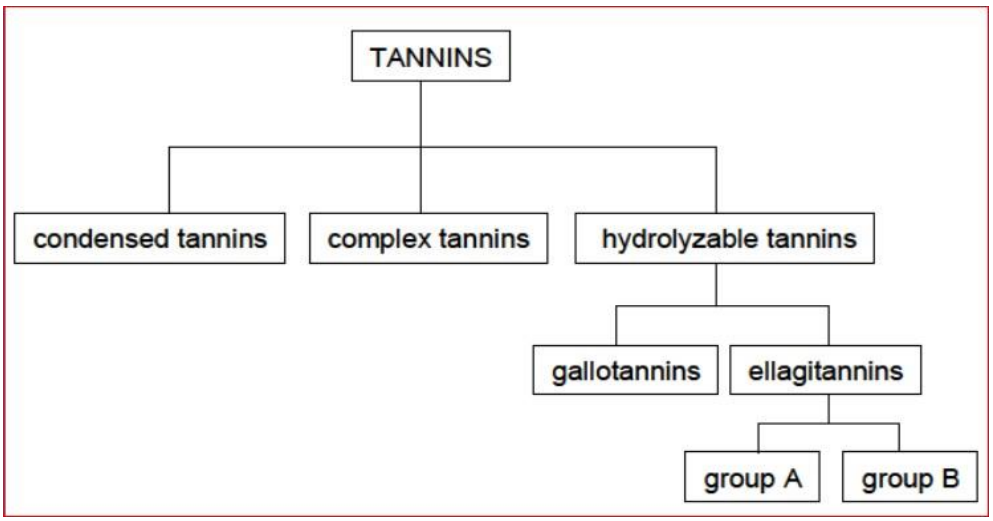
On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Tanins hydrolysables : Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques.

Tanins galliques (Gallo tanins) : Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

Tanins ellagiques (Ellagitanins) : Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique.

Tanins condensésLes tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués 'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatéchine et catéchine.



Figure(II.9): Classification des tanins .

II.4.2. Utilisation des tanins

Grâce à leurs astringente les tanins sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes . Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures.

II.1.4. Le rôle des composés phénoliques

II.1.4.1.Rôle physiologique

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols sont associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, floraison et tubérisation. Par exemple les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV.

Ils sont impliqués dans la réaction de défense du palmier dattier contre le *bayoud*, maladie infectieuse due a un champignon telle que *Fusariumoxysporum***.**

II.1.4.2. Rôle technologique

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyaneset certains flavonoïdes participent a la coloration des fruits murs, ils confèrent aux fruits et légumes leurs teinte rouge ou bleuté, ils sont aussi responsables des qualités sensorielleset alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de leurs teneurs .

II.1.4.3. Activité antioxydante

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s‟effectue à l‟aide de trois types d‟agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d‟origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l’acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l’homme.

Partie Expérimental

Chapitre III

III. Matériel et méthodes

Objectif général :

- Etudier les différents paramètres influençant du rendement de hydro alcoolique et métabolite secondaire de« *punica Granatum L* »
- Extraction des metabolites secondaires (polyphenole ; falvonoides ; tanine) de l'écorces *punica Granatum L*.
- Dosage des Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanines.
- modalisation. (Excel stat (méthode plan d'expérience))

III.1. Matériel

III.1. Matériel végétal :

III.1.1. Conseils et préparation des plantes médicinales

La récolte des plantes

des principes actifs. Traditionnelle. Elle doit être effectuée au moment le plus favorable afin de conserver La récolte des plantes médicinales est une étape très importante, notamment en médecine Certaines plantes peuvent être cueillies toute l'année, mais la plupart doivent être récoltées à un moment précis de leur croissance pour être utilisées immédiatement ou conservées.

Les auteurs de cette référence ont proposés

Quelques conseils pour faire une meilleure récolte :

- Identifier les plantes, ne jamais cueillir une plante dont on n'est pas sûr.
- Ne pas cueillir les plantes sauvages rares ou inhabituelles.
- Ne pas ramasser de plantes au bord des routes, à proximité des usines ou dans les Zones où sont vaporisés des insecticides sur les cultures.
- Utiliser, si possible, un panier ouvert pour y déposer les plantes, ce qui évite de les abîmer.
- Dans la nature, un sac à dos (évitez le Nylon) ou un sac en toile sera plus pratique.
- Récolter les plantes par temps sec, plutôt par une matinée bien ensoleillée.
- Récolter uniquement des plantes saines.

III. 1. 2. Séchage et conservation des plantes

Séchage :Le séchage des plantes médicinales est normalement effectué juste après la récolte, il permet de réduire la teneur en eau afin de limiter les dégâts dus aux

enzymes et autres agents biologiques tels que les moisissures et les microbes.
Le séchage doit être rapide et dans un endroit bien aéré et à l'abri de la lumière**.**

Il existe également d'autres procédés de séchage : les procédés mécaniques (presse, décantation ou centrifugation), les procédés physico-chimiques (adsorption, absorption, réfrigération et séchage par évaporation)**.**

Conservation : IL existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four.
Les plantes séchées sont coupées grossièrement et disposées dans des bocaux de verre ou dans
Des sacs en papier, à l'abri de l'air et de la lumière. Les boites en fer sont naturellement Proscrites. Il existe également d'autres méthodes pour la conservation des propriétés médicinales des plantes telles que l'aspiration de l'humidité des plantes par un déshumidificateur ou la congélation dans des sacs en plastique.

III. 1. 2. 1.Les différentes modes de préparation des plantes

Le mode de préparation d'une plante médicinale est la méthode d'extraction des principes actifs responsables d'action guérisatrice. Il peut avoir un effet sur la quantité ces produits Les modes de préparation les plus courants sont : l'infusion, la décoction et la macération.

Infusion : Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes**.**

Décoction : Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, deux ou trois minutes pour les feuilles, les tiges et les fruits ; cinq minutes ou plus pour les écorces des fruit et les racines.

Macération : Le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre.
Dans le cas da la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou12 heures)**.** Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine heures par risque d'oxydation et de fermentation du liquide**.**
La méthode par décoction a été comparée avec une nouvelle technologie d'extraction qui utilise les micro-ondes et les ultrasons **.** Le résultat de cette étude démontre que la nouvelle technologie d'extraction présente une efficacité plus importante que celle de la décoction .

III.2. Matériel du laboratoire

a)les logiciels : tableau(III.1) représenté les logiciels utiliser

Tableau (III.1) des log logiciels utiliser

- Logiciel Microsoft office Excel 2007, pour les calculs et pour exporter les résultats
- Excel star (étude statistique du résultat)

b) Appareillage : tableau(III.2) représenter les appareillage

Tableau (III.2) des appareillages

Appareillages
-UV spectrophotomètre (UV).
-Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210).
-Agitateurs magnétiques (barreaux magnétiques) .
-Etuve (seche l'echantillon).
-Balance analytique .
-Verreries : béchers, pipettes, ballons, éprouvettes graduées, tubes à essais, Micropipette ; pipettes de 5mlet10ml ; thermomètre

c)Produits chimiques : tableau (III. 3) représenter les produits chimiques utiliser

Tableau (III. 3) représenter les produits chimiques utiliser

Produits chimiques
Acide gallique 99% ($C_7H_6O_5$)
Réactif de Folin Ciocalteu ($3H_2O,P_2O_5,13WO_3,5MoO_3,10H_2O$)
Méthanols 100 pour100(CH_3-OH)
Carbonate de sodium(Na_2CO_3)
Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$.$6H_2O$)
Carbonate de sodium(Na_2CO_3)
Acide chlorehydrique (HCL)

III.2.I. Préparation des échantillons

Le matériel végétal est constitué par des écorces de fruits de *Punica granatum L* Figure (III.) ; récolté dans la wilaya de médéa, située dans le centre d'Algérie. Les écorces des fruits de la plante ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées, ces dernières ont été réduites (pulvériser) en poudre en utilisant un broyeur automatique ou un mortier pour rendre l'échantillon très fine puis soumises à l'extraction.

III.2.2. Traitements des échantillons

Séchage : Séchées l'écorce à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique. Séchées les écorces dans une étuve ventilée à 55°C-65°C / 96h. Jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids fixe.



Fig(III.I.) l'écorce de fruit



Fig. (III.2.) l'écorce Sèche

Broyage : Après séchage écorces de fruit de cette plante ont été concassées séparément par un mortier traditionnel et pulvérisées ensuite au broyeur. Ce dernier doit être réalisé juste avant chaque analyse et de préférence mortier pour éviter la dégradation des composés Chimiques par la chaleur du robot. La poudre végétale ainsi récupérée, est placée dans des sacs en papier, Cette poudre va être soumise à différente extractions.

D'après le séchage. Et le broyat obtenu a été conservé dans des sachets en papier à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation.



Figure. (III.3.) Broyage.

III.3 Extraction des métabolites

III.3.1.Extraction par macération dans le méthanol (extraction solide/liquide)

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans le méthanol 100°/◦ pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes.Tanines). Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par**,** avec quelques modifications. Le protocole de la macération d'écorce

- Peser 2 gramme de la matière végétale (écorce).
- Mettre la matière végétale (2 g) sur le mélange (méthanol ;L'eau distiller) dans un eurlénemayeu de 25ml .
- Chauffer et agitation du mélange par un agitateur avec plaque chauffante.
- centrifuger le mélange jusqu' a obtenu deux phases bien distinguait .avec vitesse et temps.
- d'apres la separation par centrufuge, ensuite filtrer sur un papier filtre Wathman (n°:1) .
- Récupérer le filtrat dans un tube a essai .
- Répéter la procédure pluseur fois avec changement les paramètres (concentration de méthanol ; temps d'extraction)…..

le tableau(III.4) c'est dessous représente la variation différentes paramètres.

Apres on utilisant le évaporation pour separation(méthanole ;extrait)et pese la quantité obtenu.



Figure (III.4) : extraction



Figure (III.5) : centrifugeuse



Figure (III.6) : l'extrait après la centrifugation

III.3.2 Evaporation (rotavape)

Les solutions obtenues ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif, ou rotavap Le (**Figure** .**III.4**) qui permet a éliminé le solvant sous vide. Le protocole d'évaporation est le suivant :

- Placer la solution dans le ballon d'évaporation ;

-Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant (Solution 1 ; T^{o}= 80 ^{o}C :et vitesse de rotation 27);

- Retirer le ballon du rotavape et attendre qu'il soit froid ;
- Peser le ballon avant et afin pour detrminer la masse de l'extrait pour but de calculer le rendement d'extraction ;
- Recueillir l'extrait dans de (MeOH) (l'intérêt de l'utilisation de Méthanol c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à La paroi du ballon d'évaporation) ;

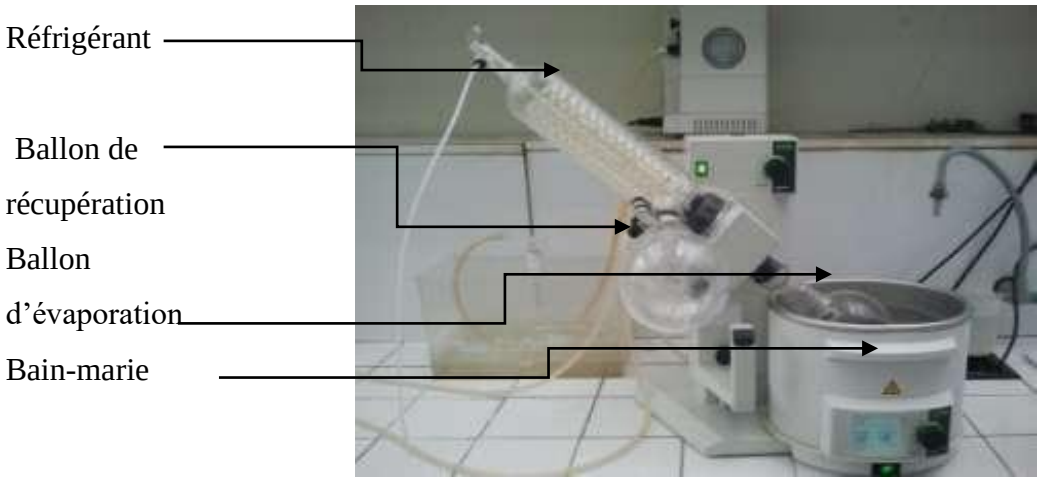


Figure (III.7) : Evaporateur rotatif.



Figure (III.8) : l'extrait récupéré

III.4.Le rendement des extraits secs

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante:

$$\mathbf{Rdt\ (\%) = [(P1 - P2) / P3] \times 100}$$

P1 : poids du ballon après évaporation.

P2 : poids du ballon avant évaporation.

P3: poids de la matière végétale initial.

III.5. Les paramètres influent sur le rendement

Le tableau (III.4.) représenter les paramètres influençant sur le rendement

N°	Facteur	Les essais
1	Le solvant utilisé (polarité)	60
		75
		90
2	Temps d'extraction (H)	6
		24
		42
3	Volume de solvant (ml)	5
		10
		15
4	Température (**°C)**	20
		30
		40
5	temps de centrifuge (min)	5
		10
		15
6	Vitesse de centrifugation (trs /MIN)	3000
		4500
		6000

III.6. Dosage des polyphenols totaux (pt) et des flavonoïdes totaux(ft)

III.6.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

L'extraits bruts : hydrométhanoïques de la plante *Punicagranatum* L sont solubilisés dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml

Pour le dosage des flavonoïdes totaux(pt) et des polyphenols totaux(ft).



Figure (III.9) : l'organisation pour le dosage

III.6.2. Dosage des poly-phénols totaux (pt)

a- Principe

La méthode est celle utilisant le réactif de FolinCiocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 760 nm, est proportionnelle à la quantitédepolyphenols présents dans lesextraitsvégétaux**[76].**

b-Mode opératoire

Le dosage des polyphenols est réalisé selon la méthode décrite par 125 µl extrait convenablement diluée mise dans un tube en présence de 500µl de l'eau distiller et de 125 µl réactif FolinCiocalteu.

- Agitation au vigoureuse
- Laisser reposer 6 mn.
- Addition de 1250 µL d'une solution de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7%.
- compléter le volume jusqu'à 3ml avec l'eau distillé dans tube a essai.
- Laisser reposer pendant 90 mn à la température ambiante et ensuite l'obscurité.
- L'absorbance est mesure à 760 nm.

. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes

concentrations de 0 à 400 µg.ml^{-1}

. Le teneur en polyphenols est exprimé en mg équivalant l'acide gallique par gramme de la matière végétal séché (mgEAG.g^{-1} MS) .



Figure (III.10) : Le complexe résultant de polyphénols

Selon la formule suivante :

Quantité de polyphenols = a .f/b

a : Concentration en polyphenols en déterminée à partir de la courbe d'étalon

f : Facteur de dilution 24 fois

b : Concentration initiale de l'extrait (125 µl)

III.6.3 Dosage des flavonoïdes totaux (ft)

a- Principe

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique en utilise le réactif nitrite de sodium de au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

b-Mode opératoire

- 2500 µl De l'extrait diluée sont mélangés .
- Addition de 75 µl d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 7 % .

- Laisser reposer pendant 6 mn d'incubation.
- Addition de 150 µl de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 6 H_2O) à 10%.
- Laisser reposer pendant 5mn autres a température ambiante .
- Addition de (500 µl) d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1%.
- Le volume total est complété à 2500 µl d'eau distillée.
- Agiter et laisser reposer pendant 15 minutes.
- L'absorbance est mesure à 510nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0 à 400µg.ml).

Le teneur en flavonoïdes est exprimé en mg équivalant catéchine par gramme de la matière végétal séché.($mgEC.g^{-1}$ MS).



Figure (III.11) : Le complexe résultant des flavonoïdes

formule suivante :

Quantité de flavonoïdes = a. f / b

a : Concentration des flavonoïdes en $\mu g.ml^{-1}$ déterminée à partir de la courbe étalon.

f : Facteur de dilution (x10).

b : Concentration initiale de l'extrait ($\mu g.ml^{-1}$).

III.6.3 Dosage des tanines

a- Principe

En présence d'acide sulfirique.les tanine condensés se dépolymérisant et par réaction avec la vanilline ;se transforme en anthocyanidole de couleur rouge ;mesurable par spectrophotométrie à500 nm.

b-Mode opératoire

- 50 µl µ De l'extrait diluée
- Ajoute 3ml de vanilline à 4 %
- 1.5ml d'acide sulfurique H_2SO_4
- halogénation le mélange et mise en incubation et température ambiante pendent 15 mn
- L'absorbance mesure à 500 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0 à 400µg.ml $^{-1}$).

Le teneur en tanine condensés est exprimé en mg équivalant catéchine par gramme de la matière végétal séché. .(mgEC.g^{-1} MS).



Figure (III.12) : Le complexe résultant des tanins

III.6.3. Analyses par spectroscopie UV-VIS

Les spectromètres UV-VIS permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance, longueur d'onde repérés en abscisses. Pour cette analyse nous avons utilisés un appareil qui represnter dans (figure III.4). Le solvant utilisé pour la dilution est le méthanol.



Figure (III.13) : Spectrophotomètre.

Chapitre IV

modélisation

IV.1 Introduction

Ce travail consiste à étudier le procédé d'hydrodistillation des extraites à partir de la plante médicinale *punica granatum L* . dans ce contexte des expériences ont été réalisées afin d'investiguer l'effet de certains paramètres opératoires sur ce procédé à savoir : Le solvant utilisé (polarité) ;Temps d'extraction (H) ;Volume de solvant (ml) ;Température (°**C)** ;temps de centrifuge (min) ;Vitesse de centrifugation (trs /MIN) ;l'opération sur le rendement d'extraction de metabolite secondaire, par l'application d'un plan expérimental à plusieurs facteurs.

L'application des plans d'expériences était un moyen pour minimiser conditions optimales dans le domaine d'étude imposé.Dans ce chapitre on va présenter la méthodologie des plans d'expériences adoptée afin de chercher les conditions optimales pour une extraction avec un meilleur rendement.

IV.2 Théorie d'optimisation expérimentales

La stratégie dans le choix des méthodes d'optimisation d'expérimentation doit faciliter l'organisation progressive de l'acquisition des connaissances. Elle doit également minimiser le plus possible le nombre d'expériences mais elle ne doit pas sacrifier la qualité des résultats, au contraire, on recherche la meilleure précision possible. L'étude d'un phénomène peut se résumer à l'intérêt d'une grandeur, par exemple le rendement d'un processus donné, grandeur qui, généralement dépendra d'un grand nombre de variables. Sous une forme mathématique, on peut écrire que la grandeur d'intérêt **Y**, que nous appellerons également réponse par la suite, est une fonction de plusieurs variables **Xi** (Variables que nous appellerons aussi facteurs par la suite)

$$Y = f(X_1, X_2, \ldots X_i)$$

L'étude du phénomène se ramène alors à la mesure de la réponse en fonction des différentes valeurs que l'on peut donner aux facteurs. Deux méthodes peuvent être utilisées pour résoudre le problème.

IV.2.1 Méthodes classiques

Dans les méthodes classiques on fixe le niveau de toutes les variables sauf une et l'on mesure la réponse **Y**en fonction de plusieurs valeurs de la variable non fixée $\mathbf{X_1}$. Si l'on veut étudier toutes les variables, il faut recommencer le même calcul pour chacune d'elles.

Si l'on désire étudier simplement quatre facteurs et que l'on décide de prendre cinq points expérimentaux par variable, il faut réaliser 5^4= 625 expériences.
Ce qui nécessite, selon le nombre de variable et le nombre de points expérimentaux à réaliser, un travail qui peut dépasser les limites du faisable.

IV.2.2 Méthodes des plans d'expériences

La différence capitale avec la méthode classique tient au fait que l'on fait varier les Niveaux de tous les facteurs à la fois, à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée. Le fait de faire varier tous les facteurs à la fois n'est pas un inconvénient en soi mais au contraire offre de nombreux avantages. Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant le nombre des essais à une valeur raisonnable, c'est pourquoi l'une de leurs applications principales est la recherche des facteurs influents.

IV.2.2.1 Principe et intérêt des plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt Y et des variables X_i. Il faut penser aux plans d'expériences si ls'on s'intéresse à une fonction du type:

$Y = F(X_i)$

L'application des plans d'expériences offre de nombreux avantages parmi lesquels :

- Diminution du nombre des essais ;
- Nombre de facteurs étudies très grand ;
- Détection des interactions entre facteurs ;
- Meilleure précision sur les résultats ;
- Modélisation des résultats ;
- Optimisation des résultats.

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un Expérimentateur, dont les plus utilisés : le Composite et Box-Behnken……ex.

IV.2.2.2 Analyse statistique :

L'estimation d'un modèle mathématique est souvent gérée à l'aide d'un outil informatique (**Excel stat**), le choix du plan d'expériences à mettre en œuvre dépend du problème posé est les plans d'optimisation ou plan à surface de réponse qui permettent à partir du modèle mathématique polynomial, de déterminer les valeurs des facteurs influents correspondant à une réponse particulière du système.

Dans cette partie, nous allons faire 61 essais pour la formulation et on va mesurer le rendement de hydrodistillation de metabolite secondaire.

IV.2.2.3 Outils et quelques notions préliminaire

Variables naturelles (réelles) ou facteurs :

Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable. Ces facteurs étudiés sont notés Zj (j = 1 à k, k le nombre de facteurs). Lorsque la variable naturelle Zj prend deux niveaux dans une expérimentation, on convient de désigner par Zj (min) son niveau inférieur et par Zj (max)son niveau supérieur ;

- Les facteurs contrôlés sont effectivement étudiés au cours d'une expérience.
- Les facteurs non contrôlés sont les facteurs difficilement maitrisables et sont la source de variations résiduelles car fréquemment considérés comme aléatoires.
- Les facteurs bruit ont des effets supposés ou réels, et qui ne s'exercent que sur ladispersion ou la qualité des résultats**.**

K : Nombre de facteur étudiés.

$\mathbf{A_i}$: Effet du facteur i.

Variables codées :

Le traitement des données, issues des plans d'expériences, exige l'utilisation de variables centrées, réduites et sans dimension, désignées par « variables codées », à la place des« variables réelles ». Pour cela, on associe à chaque variable réelle Zj une variable codée xj, qui prend le niveau (– 1) pour le niveau Zj (min) et le niveau (+ 1) pour le niveau Zj (max)**.**

Réponse :

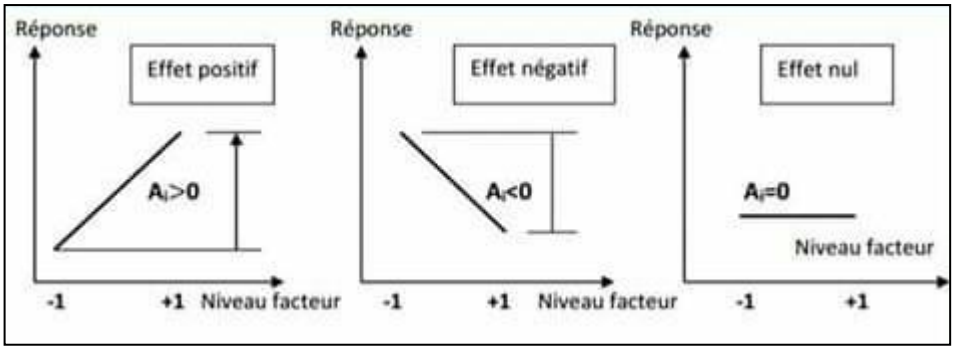
Une réponse expérimentale ou variable dépendante, est une grandeur mesurée ou observée lors de chaque essai d'une expérience, c'est le résultat de chaque combinaison des niveaux des facteurs. Elle peut être quantifiée (mesurée), ou observée **[80].**

Effet d'un facteur :

L'effet d'un facteur [$\mathbf{x_i}$] correspond à la variation de la réponse [**Y]** lorsque **x** passe d'une valeur au niveau **(–1)** à une autre valeur au niveau **(+1)**. Il est caractérisé par une **[58]**constante notée **($\mathbf{A_i}$)** qui sera :

- **Positive :** si cette variation du facteur est favorable à l'accroissement de la réponse.
- **Négative :** si elle est favorable à la diminution de la valeur de la réponse.
- **Nulle :** si elle est sans influence sur le système.

Cette constante intervient dans le modèle mathématique décrivant cette réponse.



Figure(IV. 1): Illustration d'un effet d'un facteur.

$$k\ Y = A0 + \sum_{i=1} Ai\ Xi$$

Avec :

Y : Réponse prédite par le modèle.

A_0 : Constante du modèle elle répond à la moyenne des résultats de mesure.

X_i : Facteur i.

A_i : Effet du facteur i.

K : Nombre de facteur étudiés.

IV.2.3 Interaction

L'effet pour lequel l'influence apparente d'un facteur sur une variable de réponse dépend d'un ou de plusieurs facteurs. L'interaction indique une incohérence del'effet principal d'un facteur sur la réponse selon le niveau d'un autre facteur**.** Noté Aij l'interaction intervient dans le modèle de la manière suivante :

$$Y = A0 + \sum Ai\ Xi + \sum_{i=1} Aij\ Xi\ Xj$$

Aij : Effet de l'interaction $X_i X_j$

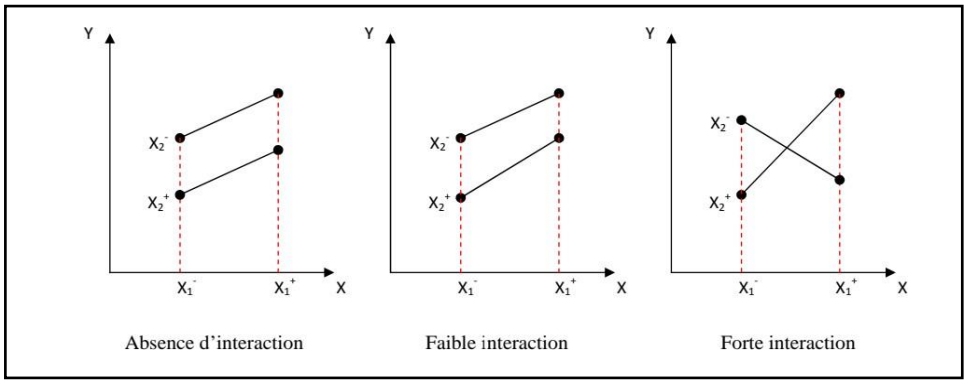


Figure (IV.2) Illutation d'une interaction.

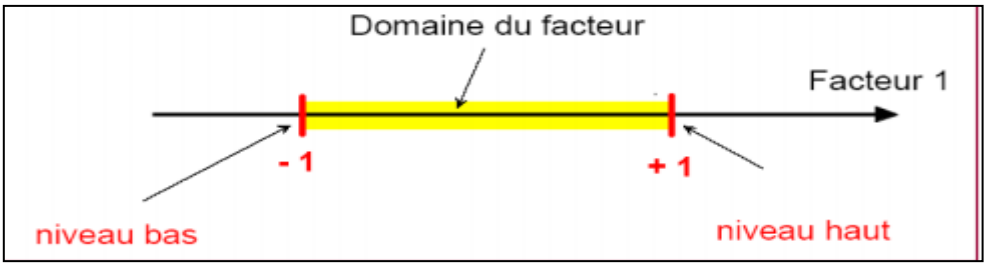


Figure (IV. 3) : Représentation graphique des limites du domaine d'un facteur.

IV.4 Domaine d'étude :

Un domaine d'étude est défini comme l'ensemble de tous les points de la surface de réponse délimitée par les niveaux bas et haut de chaque facteur, c'est-à-dire la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais d'un plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude, dans lequel chaque point représente un "traitement".

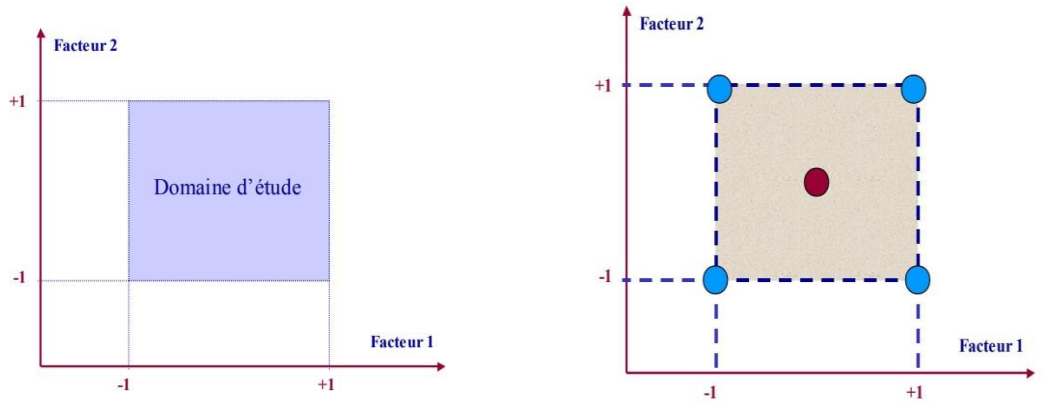


Figure IV.4 : Représentation du domaine d'étude et des meilleurs emplacements despoints expérimentaux.

IV.4.1 Surface de réponse

À localisechaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tousles points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se sur une surface appelée surface de réponse.

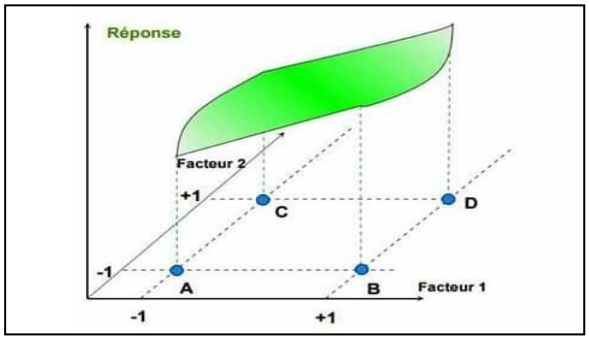


Figure IV. 5: L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de répons.

Matrice d'expérience :

La matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de n lignes correspondant aux n expériences à réaliser et de k colonnes, correspondant aux k variables étudiées. Nous allons illustrer ci-dessous la notion de matrice expériences avec un exemple simple**.**

Prenons 2 facteurs U_1 et U_2. U_1 est un facteur quantitatif qui peut prend par exemple deux niveau : $A_1 = 100$ et $A_2 = 50$; U_2 est un facteur qualitatif à deux modalités : B1 = bleu et B_2 = rouge. Supposons que la matrice d'expériences choisie soit celle reportée dans le tableau ci-dessous :

Tableaux IV.1 : **Matrice d'expérience et Plan d'expérimentation.**

	Matrices d'expériences		
Nombre d'essai	U_1	U_2	Y
1	A_1	B_2	Y_1
2	A_2	B_2	Y_2
3	A_1	B_1	Y_3
4	A_2	B_1	Y_4



	Plan d'expérimentation		
Nombre d'essai	X_1	X_2	Y
1	100	Rouge	Y1
2	50	Rouge	Y2
3	100	Bleu	Y3
4	50	Bleu	Y4

IV.**4.2 Analyse statistique :**

L'estimation d'un modèle mathématique est souvent gérée à l'aide d'un outil informatique (**Excel stat**), le choix du plan d'expériences à mettre en œuvre dépend du problème posé est les plans d'optimisation ou plan à surface de réponse qui permettent à partir du modèle mathématique polynomial, de déterminer les valeurs des facteurs influents correspondant à une réponse particulière du système.

Dans cette partie, nous allons faire 61 essais pour hdrodistillation et on va calculer le rendement de chaque tube à essai, pour choisisse les bonnes conditions pour utilise plus tard .

IV.4.3 Construction de la matrice d'expérimentation

Dans la présente étude on a étudié les sixe facteurs Le solvant utilisé (polarité)

Temps d'extraction (H).Volume de solvant (ml).Température (**°C)**.temps de centrifuge (min)

Vitesse de centrifugation (trs /MIN).facteurs suivant :

.Le domaine d'étude définit par les niveaux :

haut, moyen et bas de chaque facteur est résumé dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Domaine d'étude

Variable	Minimum	moyenne	Maximum
Le solvant utilisé (polarité)	60	75	90
Temps d'extraction (H	5	10	15
Volume de solvant (ml).	5	10	15
Température (**°C)**.	20	30	40
temps de centrifuge (min)	5	10	15
Vitesse de centrifugation (trs /MIN).	3000	4500	6000

Après avoir la manipulation de détermination les proportions de différentes constituantesde chaque tubes à essais, on obtient sur les résultats suivantes :

tableau IV.3 : Résultat du plan d'expériences

Variable	Modalités	Effectifs	%
POLARITE DE SOLVANT	60	10	16,393
	75	41	67,213
	90	10	16,393
VOLUME DE SOLVANT	5	10	16,393
	10	41	67,213
	15	10	16,393
TEMPS EXTRACTION	6	10	16,393
	24	41	67,213
	42	10	16,393
TEMPERATURE	20	10	16,393
	30	41	67,213
	40	10	16,393
T¨MPS AGITATION	5	10	16,393
	10	41	67,213
	15	10	16,393
NOMBRE DE TOURS	3000	10	16,393
	4500	41	67,213
	6000	10	16,393

La problématique visée par le présent travail est de trouver un outil permettant d'obtenir un jeu de paramètres intéressant pour étudier le procédé d'hydrodistillation, tout en menant un nombre réduit d'expériences vu la contrainte du temps mis à la réalisation de cette étude. Par conséquent et afin de répondre à cette exigence on a fait recours à l'application de la technique des plans d'expériences.En effet, le principe de cette technique consiste à faire varier simultanément lesniveaux d'un ou plusieurs facteurs (*qui sont les variables*) à chaque essai.Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réalisertout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse, c-`a-d une grandeur utilisée comme critère (*rendement dans notre cas*) et en permettant de modéliser facilement les résultats.

IV.4.4 Etude de la multi colinéarité

Ont dit que des variables sont multicolinéaires s'il existe une relation linéaire entre elles. C'est une extension du cas simple de la colinéarité entre deux variables. Par exemple, pour trois variables X1, X2, X3, on dira qu'elles sont multicolinéaires si on peut écrire :

$$X1 = aX2 + bX3$$

Avec a et b sont deux nombres réels.

Pour détecter les multicolinéarités et identifier les variables impliquées dans des multicolénéarités, on effectue des régressions linéaires de chacune des variables en fonction des autres. On calcule ensuite : R^2 (coefficient de corrélation), la tolérance et le facteur d'inflation de la variance(Le VIF).

IV.4.5.1 Tolérance :

C'est un indice qui donne des informations sur les liaisons (la colinéarité) entre toutes les variables explicatives. La tolérance est $1-R^2$, est un nombre compris entre 0 et 1.
Si elle est ´égale à 0 cela signifie, que le coefficient de d´détermination R^2 vaut 1. Donc que la variable devant laquelle se trouve le paramètre dont on examinela tolérance, est liée de façon d´déterministe aux autres variables explicatives.

- Si la tolérance vaut 1, cela signifie, que la variable devant laquelle se trouve le paramètre dont on examine la tolérance n'est pas linéairement liée aux autres variables, on peut
- **Le VIF (**variance inflation factor) signifie facteur d'inflation de la variance. Au cours de l'analyse de régression, VIF évalue si les facteurs sont corrélés les uns aux autres (multi-colinéarité), ce qui pourrait influencer les autres facteurs et réduire la fiabilité dumodèle.

Si un VIF est supérieur à 10, vous avez une multi-colinéarité élevée comme les résultats présente dans le tableau au-dessus : la variation semblera plus grand et le facteur apparaitra plus influencent qu'il ne l'est.

Si VIF est plus proche de 1, alors le modèle est beaucoup plus robuste, car les facteurs ne sont pas influencés par la corrélation avec d'autres facteurs.

Tableau IV.4 : Résultat de la multi colinéarité.

STATIQUE	F1	F2	F3
Tolérance	**0.00**	**0.254**	**00**
VIF	**-**	**3.934**	**-**

Le tableau montre que la multi colinéarité entre les facteurs élevée à par l'huile d'olive (Vif) = 3.934 cela veut dire que ce facteur ne sont pas influencé par la corrélation avec autre facteur.

IV.**4.5.2 Régression de la variable :**

Pour une régression linéaire simple, on calcule le coefficient R nommé coefficient de corrélation. Dans le cas d'une régression multilinéaire, on peut aussi calculer R (coefficient de corrélation multiple) mais pour juger de la qualité de la régression, on détermine R^2 qui est le coefficient de détermination ou même plutôt R^2ajusté. regarder sans crainte le résultat du test sur le paramètre.

IV.4.5.3 **Régression de la variable rendement :**

Tableau IV.5. : regression de variable rendement

Nb. de variables	Variables	MCE	R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	AIC de Akaike	SBC de Schwarz	PC d'Amemiya
2	POLARITE DE SOLVANT*TEMPERATURE / VOLUME DE SOLVANT*TEMPS EXTRACTION	111149743,829	0,541	**0,374**		1144,182	1180,067	0,639

Régression de la variable poly phenol :

Tableau IV.6. : regression de variable **poly phenol**

Nb. de variables	Variables	MCE	R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	AIC de Akaike	SBC de Schwarz	PC d'Amemiya
2	VOLUME DE SOLVANT*T¨MPS AGITATION / TEMPERATURE*T¨MPS AGITATION	259424,878	0,425	**0,250**		773,223	804,886	0,767

Régression de la variable flavovoide :

Tableau IV.7. : regression de variable rendement

Nb. de variables	Variables	MCE	R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	AIC de Akaike	SBC de Schwarz	PC d'Amemiya
2	POLARITE DE SOLVANT*VOLUME DE SOLVANT / VOLUME DE SOLVANT*T¨MPS AGITATION	585924,491	0,505	**0,354**		822,922	854,585	0,660

Régression de la variable tanins :

Tableau IV.8. : régression de variable TANINS

Nb. de variables	Variables	MCE	R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	AIC de Akaike	SBC de Schwarz	PC d'Amemiya
2	POLARITE DE SOLVANT*TEMPERATURE / VOLUME DE SOLVANT*NOMBRE DE TOURS	0,022	1,000	**1,000**		-219,618	-183,733	0,000

IV.4.5.4 Coefficients de corrélation R^2 :

Selon **Goupy, (2006)** le R^2 est un paramètre qui nous indique la validité du modèle étudié, le coefficient de détermination de ce modèle est égale à (R^2 = 0.541 ; R^2ajustée = 0.371) ppour le rendement et (R^2 = 0.425 ; R^2ajustée = 0.250) pour polyphenole et(R^2 = 0.505 ; R^2ajustée = 0.354) pour flavonoide et (R^2 = 1 ; R^2ajustée = 1)pour la tanins la valeur du coefficient de détermination ajustée est de (R^2ajustée = 0.354). Les résultats obtenus confirment que le Coefficients d'ajustement du modèle est meilleur. Surto les tanins.

IV.4.5.5 Analyse de la variance :

La statistique la plus importante dans le tableau de l'analyse de la variance est la valeur de R (rendement). Cette valeur peut prendre des valeurs comprises seulement entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0.05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0.01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

Rappel sur le ddl : Le nombre de degré de liberté du modèle est la somme des actions qu'il comporte. Le degré de liberté d'une action représente le nombre de coefficients indépendants que la régression permettra d'estimer**.**

On a donc :

$$\mathbf{ddl_{SCRES} = ddl_{SCE1} + ddl_{SCE2}}$$

Avec :

ddl_{SCRES} : Le degré de liberté de la somme des carrés des résidus.

ddl_{SCE1} : Le degré de liberté de l'erreur due au manque d'ajustement du modèle, appelé aussi le biais ou encore le Lack of Fit.

ddl_{SCE2} : Le degré de liberté de l'erreur pure ou naturelle encore appelé PureError.

IV.4.5.6**Analyse de la variance de rendement**

Tableau IV.9 : Analyse de la variance. De variable rendement

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	16	5759265247,582	359954077,974	3,238	0,001
Erreur	44	4890588728,491	111149743,829		
Total corrigé	60	10649853976,073			

Analyse de la variance (Variable poly phenol).

Tableau IV.10: Analyse de la variance poly phenol

Analyse de la variance (Variable poly phenol) :					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	14	8811252,465	629375,176	2,426	0.012
Erreur	46	11933544,379	259424,878		
Total corrigé	60	20744796,843			

Analyse de la variance (Variable flavovoide) :

Tableau IV.11.: Analyse de la variance deVariable flavovoide

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	14	27501278,522	1964377,037	3,353	0,001
Erreur	46	26952526,600	585924,491		
Total corrigé	60	54453805,121			

Analyse de la variance (Variable tanins) :

Tableau IV.12 : Analyse de la variance de varaible tanins.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	16	2212001,905	138250,119	6374453,569	< 0,0001
Erreur	44	0,954	0,022		
Total corrigé	60	2212002,859			

Les résultats de la présente étude montrent après analyse statistiques, que le modèle est significatif avec (P < 0.05) P(0.001 ;0.012 ;0.01 ;0.001) , et toutes les valeurs <0.05 pour cela la validité du modèle est confirmée.

Effet des facteurs :

L'effet des facteurs est représenté par les coefficients de régression dans le tableau suivant :

Effet linéaire :

Les résultats obtenus, montrent que les sixe facteurs possèdent une influence significative sur la defferntes rendementd'exteraction polyphinole ;les flavo ;et tanins. Ces résultats montrent également que le facteur présente le P-value le plus faible (<0.000), ce qui met en évidence le grand impact et l'influence que possède ce facteur sur notre rendement d'extraction,peut et très fortementsignificatif.

IV.**4.5.7 Test de la normalité**

Les tests de normalité permettent de vérifier si des données réelles suivent une loi normale ou non. Pour compléter l'analyse statistique du modèle on peut étudier l'analyse des valeurs résiduelles. Un autre intérêt des techniques d'analyse de la variance est d'obtenir une estimation de la dispersion inconnue des résidus. L'analyse des résidus complète l'analyse statistique.

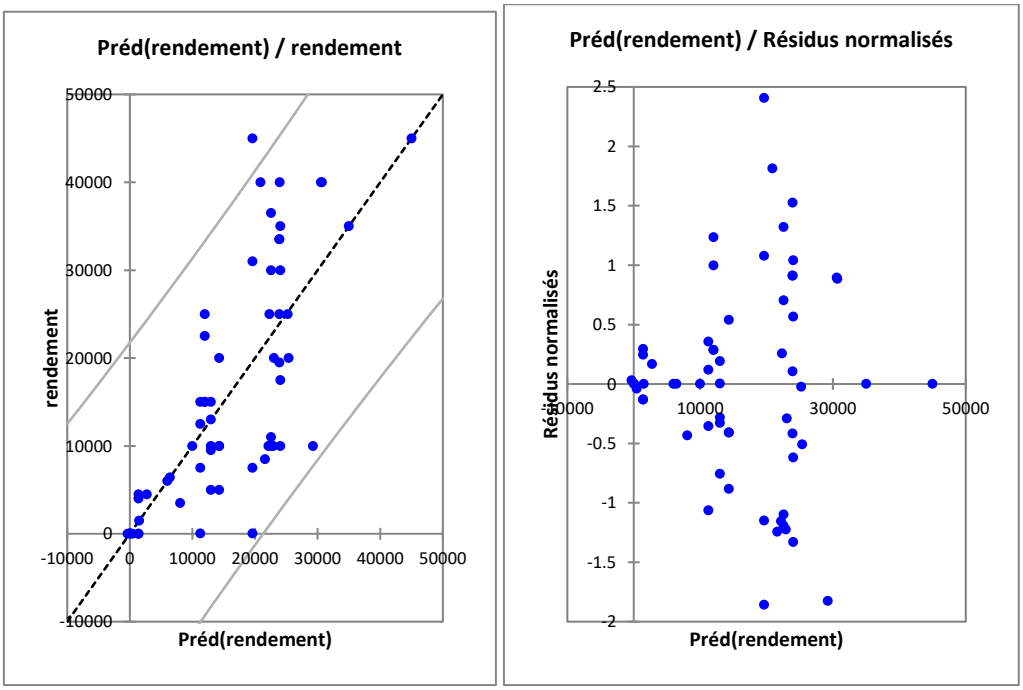


Figure IV.6. : Effets des facteurs sur le rendement.

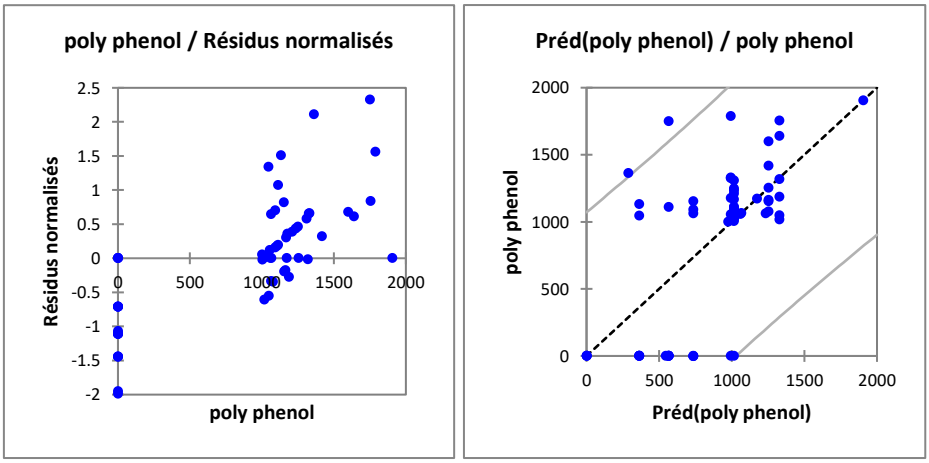


Figure IV.7. : Effets des facteurs sur le rendement POLYPHENOL

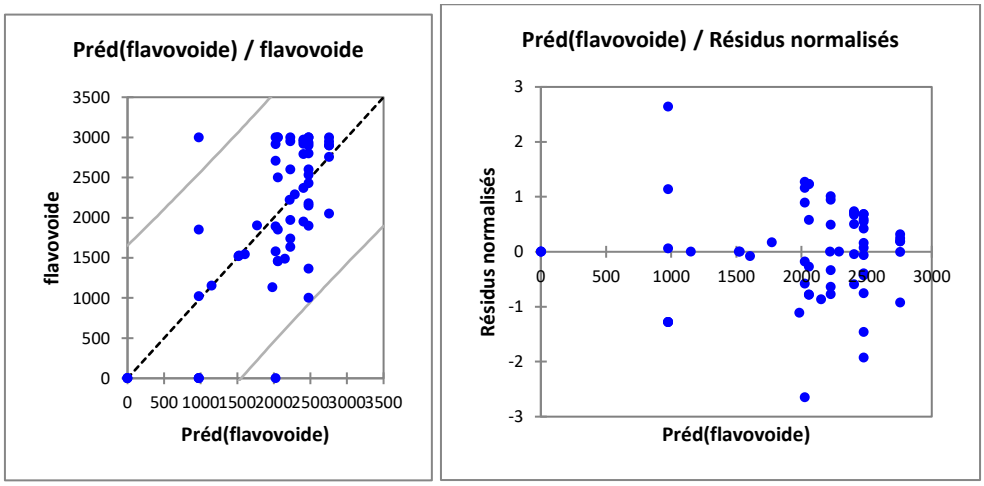


Figure IV.8 .: Effets des facteurs sur le rendement FALAVONOIDE

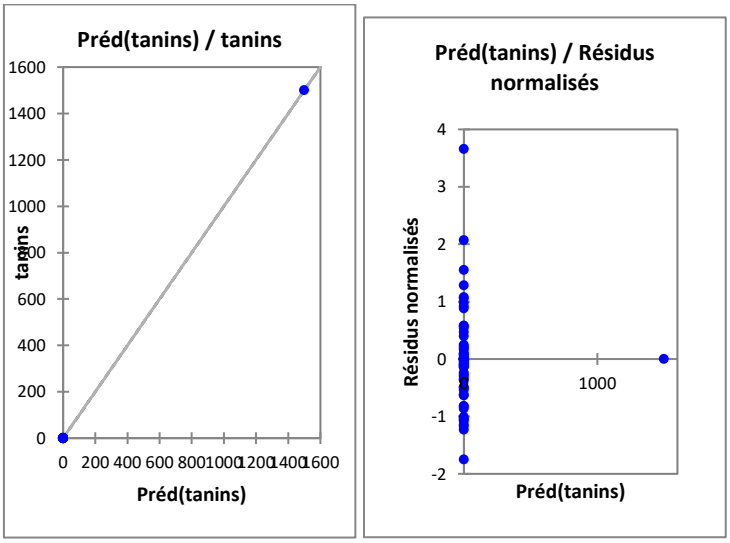
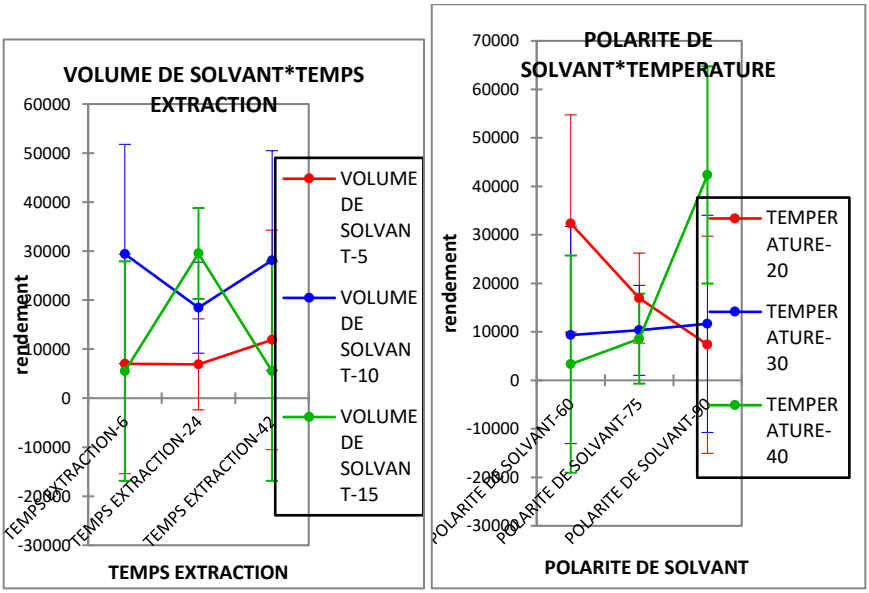


Figure IV.9.: Effets des facteurs sur le rendement Tanins

D'après la figure IV5.IV6.IV7 ; IV.8, qui représente la variation de la valeur résiduelle en fonction des rendement ;rendement d'extraction polyphenle, rendement d'extraction falavonoid et rendement d'extraction tanins on n'observe que les facteurs, qui à une valeur maximale entraîne une répons faible avec polyfhenol ;flavonoide ;rendement experimental ;mais avec rendement tanins plus elever qui explique l'effacacite des facteurs.



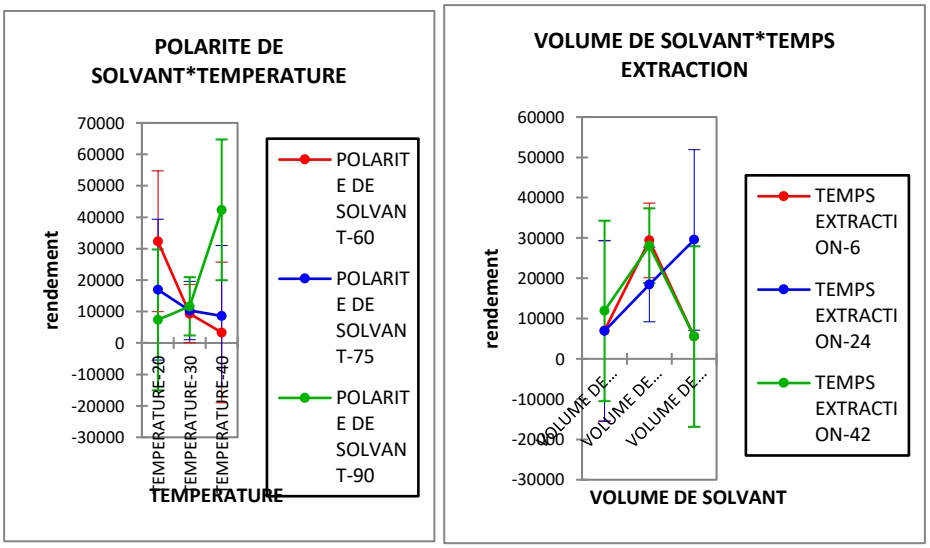


Figure IV.10.: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement).

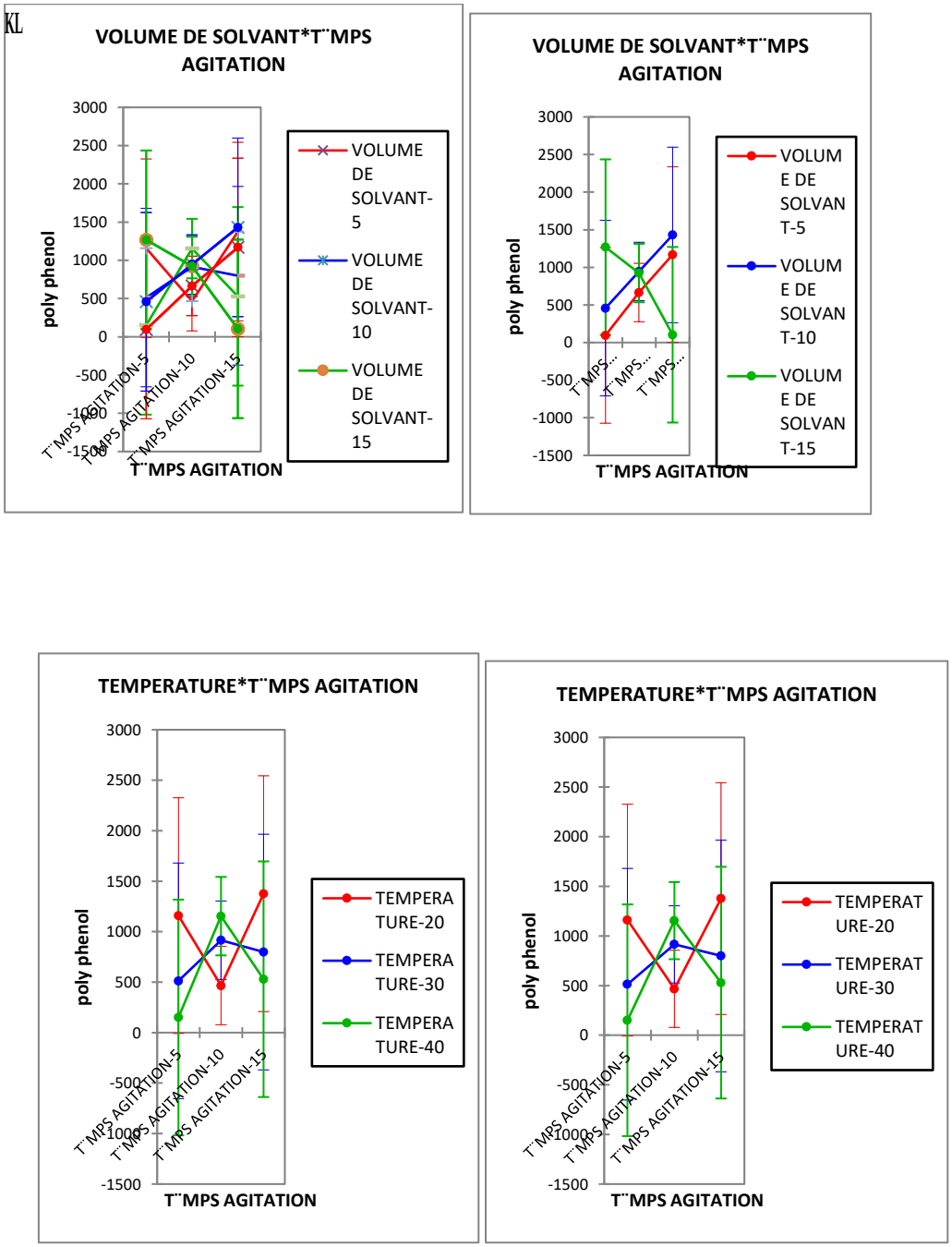


Figure IV.11: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement polyphenole).

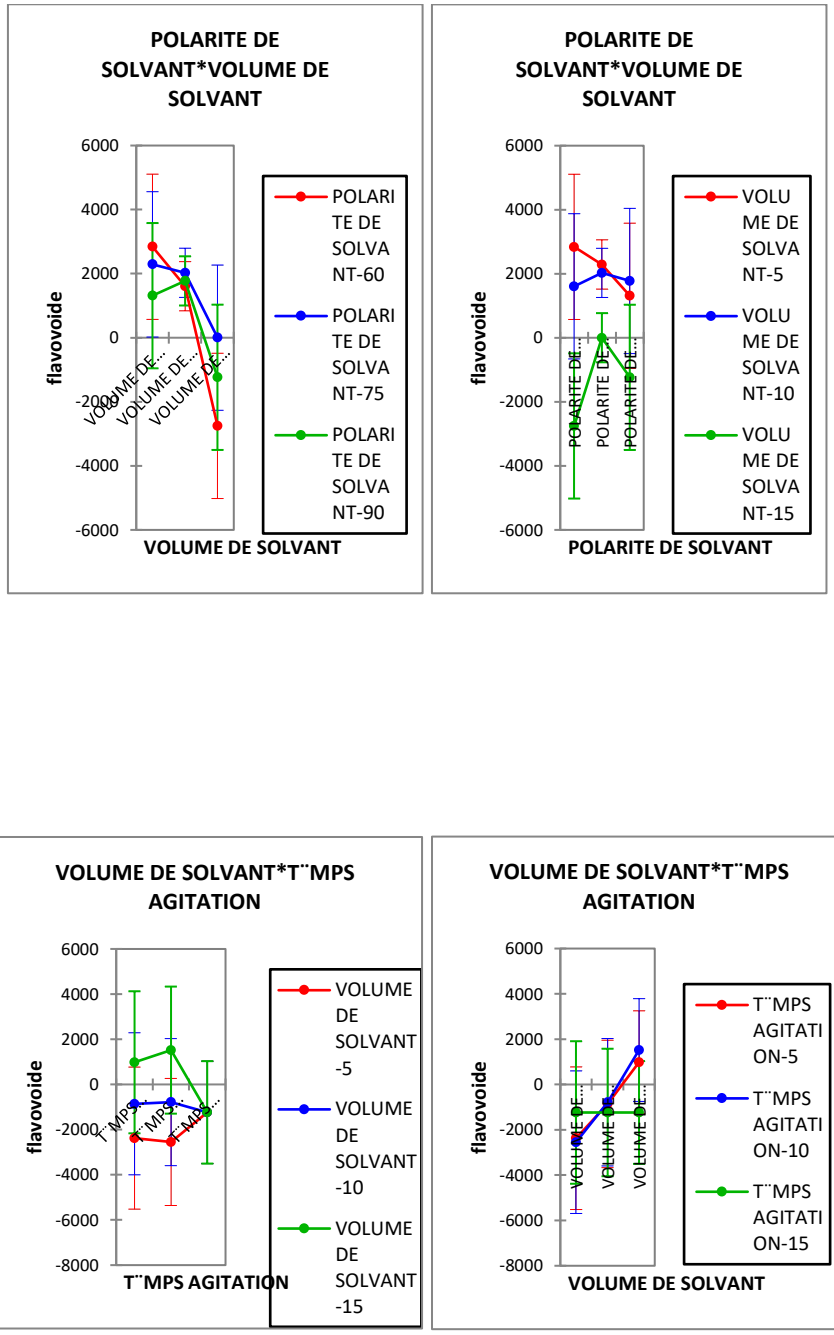
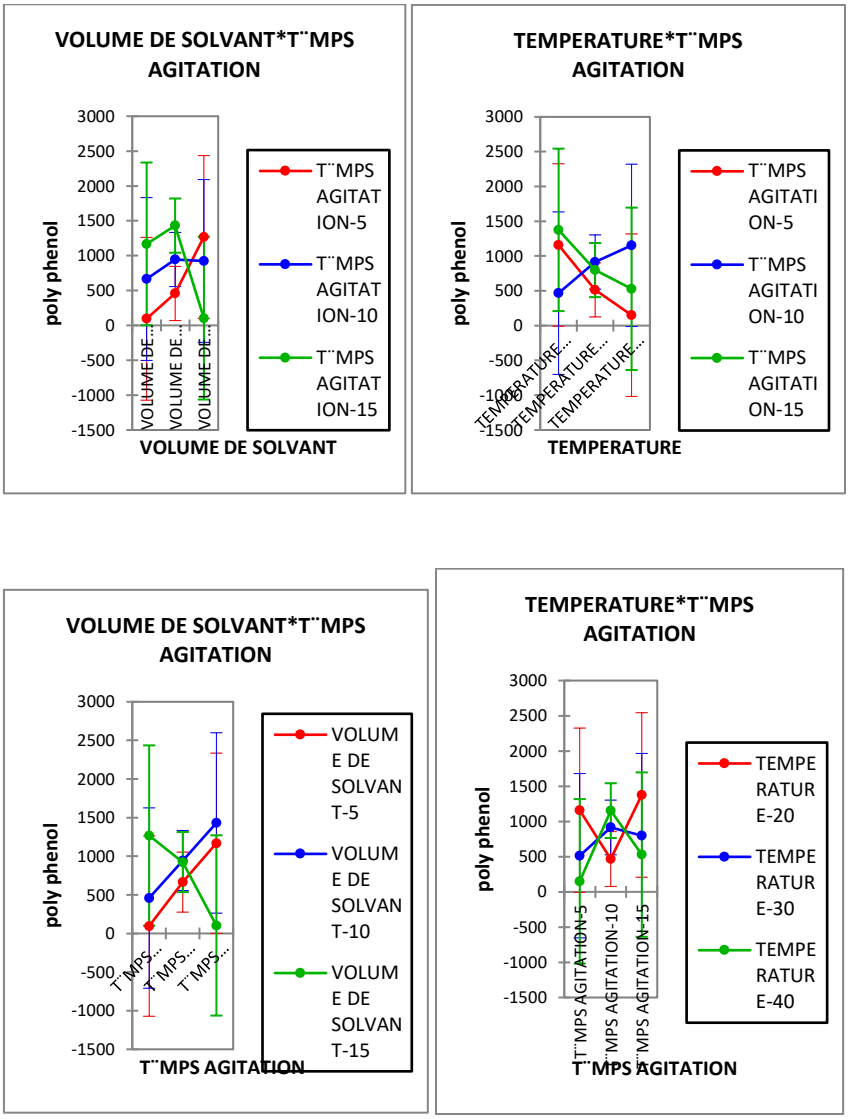


Figure IV.12: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement flavonuide).



.

Figure IV.13: Valeurs Résiduelles en fonction et la relation entre les deux facteur entre eaux (rendement tanins).

D'après la figure au-dessus qui représente la variation des valeurs résiduelles normalisés en fonction de rendement d'extraction, on observe que Les valeurs résiduelles normalisées sont généralement considérées comme importantes. Sur la base de la figure IV.12., on remarque que les valeurs résiduelles sont éparpillées autour du zéro.

D'après la figure au-dessus qui représente la variation des valeurs résiduelles normalisés enfonction de rendement, on observe que Les valeurs résiduelles normalisées

1.8 sont généralement considérées comme importantes. Sur la base de la figure III.3, on remarque que les valeurs résiduelles sont éparpillées autour du zéro.

IV.4.5.6 Diagramme des effets d'interactions des facteurs sur les rendement :

Les diagrammes des interactions sont généralement utilisés pour visualiser les interactions pendant une variance, dans laquelle l'effet d'un facteur dépend du niveau d'un autrefacteur.

Le diagramme suivant montre que les droites parallèles indiquent l'absence d'interactions. Plus la différence de pente est grande entre les lignes, plus le degré d'interaction est élevé.

IV.4.5.8 L'interprétation du résultat :

D'après les diagrammes au-dessus qui représente l'influence des effets d'interaction des facteurs entre elle, on observe une forte interaction et surtout entre temperature et polarites ;et vitesse de retataation et et le temp et donc une bonne corrélation.

IV.4.6 Conclusion de la partie pratique :

Cette étude a montré qu'un modèle polynomial d'ordre un semble modéliser correctement le phénomène étudié ici. Il apparait que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles permettant de maximiser la réponse, , sont obtenues pour les niveaux hauts des facteurs. Ces variables sont, l'huile d'olive, le tensioactif Tween et le Co tensioactif (CTA). D'après l'étude statistique nous pouvons conclure que :

Le modèle obtenu est statiquement significatif P = 0,0001 (< 0,05).

Il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées, R^2 =100% et R^2a jus= 100% pour les tanins.ET 50 % pour les flavonoide ;et faible pour poly phenol.

La région du point optimal pour une valeur élevée de la formulation est obtenue lorsque les SIX facteurs sont fixés au niveau haut.

REFFERANCES ET BEBLIOGRAPHIES

[1]Tomas-Barberan ,Gil,2008, Improving the health-pro moting properties of fruit andvegetable products. Technology and Nutrition No. 157. CEBAS (CSIC). Spain 2008).

[2].Barboni T. (2006) Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risquesd'incendie. Thèse de doctorat. Université de Corse Pascal Paoli.

[3]. Ilbert H., Hoxha V., Sahi L., Courivaud A et Chailan C., 2016, le marché des plant es aromatiques et médicinales: Analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie,P 226.

[4].Zerrouk M.,2018,Etud e ethnobotaniqu e des plant es médicinales de la famille de Lythracées, le grenadier (Punica granatume. L) et le henné (Lawsonia inermis. L) cas de la région d'Oued righ),P56.

[5].Malecky.,R, 2005, Métabolisme des terp enoïdes chez les caprins, thèse Pour obt enir le grade de doct eur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de L'Environnement, Agro Paris Tech. P205.

[6]. Elodie W., 2009, Le grenadier (Punica granatum) plante historique et évolution thérapeutiqu es récentes, le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Universite Henri Poincare Nancy 1 ,P149.

[7].Benoit B., Tela B., 2013, Base de donnés Nomenclature de la flore e n France. BDNFF

[8] .Djaziri A.,2017, Contribution à l'étude phytochimique et L'évaluation de l'activité antioxydant dans le jus de grenade (punica granatum .l), Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen,Mémoire de master,P63

[9].Benyahia.,H , Hadbi.,F ,2016, Microencapsulation de la poudre de l'écorce de grenade(PEG) par coacervation complexe (pectine /caséine): Essai d'incorporation dans le yaourt, Mémoire de Master ,Université M'hamed Bougara Boumerdes,P55.

[10].Bendjabeur.,S ,2012, Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extrait végétaux (cas de la grenade Punica granatum L.) en vue de leur utilisatio n alimentaire mémoire de magister, Ecole nationale supérieur agronomique El-harrach-Alger,P212

[11]. Ilham,2013, Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (punica granatum l.) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais, thèse de doctorat , Université De Béni Mellal (Maroc),P177.

[12].Naumann, R.A., 2007 .,1000 Plantes aromatiques et médicinales, P 336.46. Rakotonanahary.,M , 2012, Thèse présentée pour l'obt ention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. P96.

[13]. Alhijna D.,Bourich E .,2017 ,Grenade de BeniSnous :étude et caractérisat ion

chimique des extraits de pépins,évaluation de l'activité microbiologique, Thése, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen,P64.

[14]. international collectif. (1996). L'encyclopédie visuelle des aliments .livre. Quebec-Amerique (EDS),Singapour, 685p.

[15]. Calin, S. A et Carboneli, B, A.2005. La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hermandez (EDS), Murcia Espagne,P 77 .

[16]. Cazin ,F.J.(1868). Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. De l'envol (EDS) 1189 p.

[**17]. Garnier, G et Bezanger-Bauqeuesne, L.(1961**).Ressources médicinales de la flore française. Tome II. Vigot Frères (EDS). 1511p.

[18]. Paris ,R.R. Moysz, H. (1981). Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. 2° édition. Tome II. Masson (EDS), 518 p

[19]. Fournier, P.(1948). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome II. Paul Lechevalier (EDS), 504 p.

[20] .Wald, E. (2009). Le grenadier Punicagranatum : Plante historique et evolution thérapeutiquerécentes. Universite Henri Poincare.Thése.158p.

[21] .Lanskye ,P. Newman , R. A.(2007(. Punica granatum (pomegranate) and itspotential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology. N°109. 206p.

[22]. Basu ,A. Penugonda , K.)2009). Pomegranate juice: aheart-healthy fruit juice. Nutr Rev.67(1):49-56.

[23] .Seeram ,N.P. Lee, R. Heber, D. (2004(. Bioavailability of ellagicacid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (Punicagranatum L.) juice. Clin Chim Acta; 348(1-2):63-8.

[**24]. Schubert, S.Y. Lansky, E.P. Neeman ,I.) 1999(.**Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol;66(1):11-7.

[25] .Albrecht, M. Jiang. W Kumi-Diaka ,J. Lansky, E.P.Gommersall ,L.M .et Patel ,A.)2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograftgrowth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food. Fall;7(3):274-8

[26] .Malik .A. Afaq ,F. Sarfaraz ,S. Adhami, V.M. Syed ,D.N .Mukhtar ,H.)2005). Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;102(41):14813-8.

[27] .Pantuck ,A.J. Leppert. J.T.Zomorodian, N. Aronson , W.Hong ,J. et Barnard .RJ. (2006).Phase II study of pomegranate juice for men withrising prostate-specificantigefollowing surgery or radiation for prostate cancer. Clin Cancer Res;12(13):4018-26.

[28].Esmaillzadeh ,A. Tahbaz, F. Gaieni, I. Alavi-Majd ,H.Azadbakht ,L. (2006).Cholesterol lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. Int J Vitam NutrRes;76(3):147-51.

[29] .Rosenblat , M. Hayek T, Aviram M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. Atherosclerosis. Aug;187(2):363-71.

[30]. Prashanth ,D et Asha, M.K.(2001). Antibacterial activity of Punicagranatum. Fitoterapia. 2001. N°72. Pages 171-173.

[31]. ***Championnièrre J. L.(1850).*** *Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des mediciens praticiens. Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.*

[32].*Ajaikumar ,KB Et al.(2005).**The inhibition of astricmucosalinjury by Punicagranatum L. (pomegranate) methanolic extract. J Ethnopharmacol. 4;96(1-2):171-6.*

[33].Schaffer, R.E. et Gourley, L.M. (1982). Sorghum as an energy source. Dans *Sorghum in The Eighties,* House LR, Mughogho LK, Peack JM (eds). ICRISAT: Patancheru, Inde; 477-783.

[**34]. Wang, L. et Weller, C. L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, volume 17, numéro 6, p. 300-312.

[35]. Société chimique de France. Lignine. Dans *Société chimique de France*. [en ligne] URLhttp://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/lignine.html(page consultée en mars 2015).

[36]. Soxhlet, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Dingler's Polytech*. J 1879, 232, 461–465.

[37]. Benguelil et Aouifour ,2017, Etud e phytochimique et évaluations des activités anti-bactérienne et antifongique des deux éspèces :Achillea millefolium L et Sambucus nigra L, Université d es Frères Mentouri Constantine,P78.

[38] . Khorssi,2015, substances d'origine végétale, Université Mohamed Khider-Biskra,P66.

[39]. Djimli .,M Kouiza.,I 2016, Contribution à l'étude phytochimique et du pouvoir antioxydant des feuilles de blé tendre (Triticum aestivum). Université des Frères Mentouri Constantine,P44.

[40] . Moualkia .H Gourmati .**M** ,2015, Déter mination de subst ances naturelles a potentialités antioxydant e et anti- inflammatoire de plant es Punica granatum L et Lawsonia inermis , Mémoire de master, Université Abderrahmane Mira Bejaia,P125.

[41] Ayad.,R, 2008, Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum, Mémoire magister En Chimie Organique, Université Mentouri Constantine ,P 124

[42]. Ayad.,R, 2008, Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum, Mémoire magister En Chimie Organique, Université Mentouri Constantine ,P 124

[43] . Malecky.,R, 2005, Métabolisme des terp enoïdes chez les caprins, thèse Pour obt enir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de L'Environnement, Agro Paris Tech. P205.

[44] .Benaissa.,O , 2011, Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique, Thèse Doctorat , université Mento uri Constantine, P108.

[45]. Badiaga.,M , 2011, Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques d e Nauclea Latifolia Smith une plant e médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako ,P137.

[46]. Krief .,S ,**2003**,Métabolites secondaires des plantes et compo rtement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire natur elle ,P 32.

[47] .Mauro.,N,**2006,** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptot hécine, thèse doctora t, l'université Josep h Fourier Greno ble, P186.

[48]. Rakotonanahary.,M , 2012, Thèse présentée pour l'obt ention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'ét at, université Joseph Fourier. P96.

[**49]- Cotelle N**. **(2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem 1: 569590.

[50]- Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B.,and Simic M.G. (1994). Flavonoids asantioxidants.*J. Am. Chem. Soc.*116: 4846-4851.

[51]- Marfak A. (2003). Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. pp: 6-7-10.

[52]- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, K., Tamura, Y. & Kinoshita,T. (1998) Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in Glycyrrhiza inflata. Bioorganic& Medicinal Chemistry 6, 339–347.

[53]- Tim C.T.P, and Andrew J. L. (**2005)**. Antimicrobial activity of flavonoids.*Int. J. Antimicrob. Ag.* 26:343–356.

[54]- Galeotti F., Barile E ., Curir P., Dolci M ., Lanzotti V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters, **1***: 44-48.

[55]- Wachter G.A., Hoffmann.J.J.,Furbacher.T., Blake.M.E.,and Timmermann.B.N. (1999).

Antibacterialand antifungal flavanones from EysenhardtiaTexana. *Phytochemistry.* 52: 1469-1471.

[56]- Luigia Longo, Giuseppe Vasapollo., (2006). Extraction and identification of anthocyanins from Smilax aspera L. berries, *Food Chemistry* .226–231.

[57]- Paris M et Hurabielle. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.

[58]- Kansole, M.M.R,. (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicansis(Jacquin).*

[59]- Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

[60]- Khanbaba K, Ree T.R. (2001). Tannins: Classification and Defenition. Journal of Royal Society of Chemistry: 18, 641-649.

[61]- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.

[62]- Wilfred .V et Ralph .N. (2006). Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.

[63]- Jacques B, and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219- 220-223-225.

[64]- Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*.77: 147-161.

[65]- Hazout A., Menezo Y., Madelenat P., Yazbeck C., Selva J., Cohen-Bacrie P.. (2008).Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 36, 1109–1117.

[66]- Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience& Nutrition*. 4 (6):7.(cited in Mohammedi Z, 2005).

[67]- Gammoudia, A. Dandanaa, H. Chaheda, S. Ferchichia, S. Ernezb, A. Mileda. (2013). Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. Immuno-analyse et biologie spécialisée : 28,39–42.

[68]- Nkhili Zohra, (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interaction avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant, ; thèse Doctorat.

[69]- Larousse des plantes médicinales, 2001.

[70]- Boulemtafes, 2011

[71]- Sofowora, 2010 Sofowera A. (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, *Economie et Développement*. Paris: 384

[72]- Pierre et Lis, 2007). **Pierre M., Lis .M (2007)** Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1: 463

[73]- (**Nshimiyimana et He, 2010 Nshimiyimana D S and He Q. (2010)** Radical Scavenging Capacity of Rwandan CTC Tea Polyphenols Extracted Using Microwave Assisted Extraction.*Pakistan Journal of Nutrition*. **9 (6):** 589-593.

[74]- Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids-New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine, 353*(16), 1711–1723.

[75]- Burian, M., & Geisslinger, G. (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology & Therapeutics*, *107*(2), 139-154. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004

[76]- Wang, R.-F., Xie, W.-D., Zhang, Xing, D.-M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C., & Du, L.-J.(2004). Bioactive Compounds from the Seeds of Punica granatum (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, *67*(12), 2096-2098. https://doi.org/10.1021/np0498051

[77]- Bendriss. H, Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales : " r*uta chalpensis* et *Marrubium vulgare*". Mémoire de magister, 2003

[78]- Jacques Goupy. Tutoriel les plans d'experiences. N° 34, (2006), PP (75, 101).

[79]- J. GOUPY, **2006.** Les plans d'expériences, in Revue MODULAD. P.74-116

[80]- J.J. Rousselle, **2003.** Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais,

[81]- Goupy, J., Creighton, L. 2006. Introduction aux Plans d'expériences. 3e édition,DUNOD, Paris.

[82]-Benoist. D., Tourbier. Y., Germain-Tourbier. S. 1994. Plans d'expériences :Construction et analyse, Technique & documentation-Lavoisier, Edition. Paris.