

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 1955-SKIKDA



**Faculté des sciences**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Mémoire Présenté en Vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Filière: Sciences Biologiques**

**Option: Biochimie appliquée**

**Intitulé**

**Optimisation d'éco-extraction et évaluation de l'activité  
antioxydante des composés phénoliques de  
pissenlit Taraxacum officinale**

**Présenter par:**

**Benredouane zineb maroua**

**Bendjama khaoula**

**Bennaga insaf**

**Remita bouchra**

**Membre de jury:**

**NASSER. M M.C.A**

**Présidente**

**Université du 20 Août 1955-Skikda**

**LAIB. I M.C.A**

**Directeur de mémoire**

**Université du 20 Août 1955-Skikda**

**KHADRI. S M.C.B**

**Examinatrice**

**Université du 20 Août 1955-Skikda**

**Année universitaire 2021/2022**

# Remerciement

*Avant tout, nous remercions le bon Dieu de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour achever ce modeste travail.*

*Nos vifs remerciements et profonde gratitude s'adressent à notre promoteur Mme LAIB. I, qui a accepté de nous encadrer, nous le remercions infiniment pour tous ses conseils avisés et sa supervision éclairée durant la réalisation du présent travail. Également pour sa patience et le temps qu'elle nous a consacré.*

*Nous remercions les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont accordés en jugeant ce travail: Mme NASSER. M, qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury et Mme KHADRI. S, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un chaleureux remerciement à nos parents pour leur amour inestimables, leurs Confiances, leurs soutiens, leurs sacrifices et leurs encouragements, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

# Dédicaces

*Je remercie ALLAH de m'avoir illuminé le chemin de savoir et de m'avoir  
donné la patience et le courage pour arriver jusque-là.*

*Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à :*

*A mes chers parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse,  
leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A mes sœurs Sarah et Yasmin, mon frère Walid pour leurs encouragement.*

*A mes très cher grands parents, je pris Dieu le Tout Puissant de vous prêté  
longue vie.*

*A tous les membres de ma famille.*

*A ma très cher amie "Rahma" qui m'a soutenu tout au long de ce travail*

*A tous mes amies qui ont été à mes cotés*

*A tous ce qui m'aiment et qui sont les plus chères pour moi*

*Zineb maroua*

# Dédicaces

*Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce travail à tous ce qui en participe à ma réussite :*

*A mes chers parents « **ABDELHAK** » et « **SALIMA** » Qui m'ont toujours poussé pour le mieux, ils ont été une source de force et de motivation ce modeste travail est donc l'aboutissement de leur soutien, leurs sacrifices et leurs prières. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent me donner, que dieu leur bénisse une longue vie et bonne santé.*

*Et bien sur ma Grand-Mère «**Khadîdja**»*

*A ma belle-sœur «**KHOULOUD**» et mes adorables frères « **KHALED** », « **KHALIL** », « **KHEIR EDDINE** » et « **ABDOU** » ceux qui ont partagé avec moi les moments d'émotions, elles sont une source de motivation et de tendresse dans tous les moments de stress, que dieu vous protège et vous donne le meilleur.*

*A tous les voisins, les cousins plus spécialement mes cousines «**Rayene**» et « **Yasmine** » qui ont été toujours à mes coté dans les moments difficiles.*

*Un dédicace tout particulier à ma tante « **Fatiha** » et son marie « **Rabah** »  
Aucun langage ne serait exprimer mon respect et ma considération pour tous  
votre soutien.*

*Sans oublier mes copines «**Bouchra**» «**Insaf**» et «**Maroua**» pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension.*

*khaoula*

# Dédicaces

*Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :*

- ♥ *A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences, qui n'ont épargné aucun effort pour me rendre heureuse*

*Ma vie, ma très chère Mère*

- ♥ *A celui qui s'est change la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions, mon précieuse offre de dieu, qui doit ma vie et tous mes respects*

*Mon héros, mon très cher Père*

- ♥ *A mes très chères sœurs ma source de bonheur Abir, Kawther et Yasmine*

- ♥ *Aux âmes de mon grand-père et mon oncle Mourad que Dieu leur fasse miséricorde et les mettes en paix*

- ♥ *A toute la famille BENNAGA et BAKKOUCHE*

- ♥ *A tous mes amis es qui ont toujours été présents à mes cotes pour m'aide et me bénéficier*

- ♥ *A tout ceux qui m'ont soutenu et qui m'ont appris même si un lettre, le jour et venu pour leur dire MERCI...*

- ♥ *Sans oublie mon quadrinôme pour leur patience et leur compréhension tout au long de ce travail*

*Insaf*

# Dédicaces

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu, qui m'a donné la force et la patience  
d'accomplir ce modeste travail.*

*Je remercie mes collègues et amis dans ce travail pour leur patience et leur  
compréhension pendant toute la durée des travaux*

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes  
embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout  
mon respect mon père **djamel eddin**.*

*A la femme qui a souffrir sans me laisser souffrir qui n'a jamais dit non  
âmes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse  
mon adorable mère **Zohra**.*

*A ma grand-mère **yamina** et mon grand-père **Ahmed***

*A mes chers sœurs **Imen** et **Ikrem***

*et mes chers frères **Ahmed**, **Mohamed** et **Alilou**.*

*A tout la famille **Remita** , **Sacihadef**.*

*Sans oublier mes amis **Afef** , **Ahlem**, **Anfel** ,**Anfel B**, qui n'ont pas cessée de  
me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études, que Dieu*

*les protège et leurs offres*

*La chance et le bonheur.*

*Bouchra*

# Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Pissenlit

<b>1. Description botanique de la plante</b> .....	3
1.1. Origine du nom.....	3
1.2. Description et caractéristique.....	3
<b>2. Classification botanique</b> .....	4
<b>3. Répartition géographique</b> .....	5
<b>4. Composition chimique</b> .....	5
<b>5. Toxicité</b> .....	7
<b>6. Utilisations du pissenlit</b> .....	7
6.1. Utilisation culinaire.....	7
6.2. Utilisation thérapeutique.....	7

### Chapitre II : Les polyphénols

<b>1. Généralités</b> .....	9
<b>2. Classification des polyphénols</b> .....	9
<b>3. Localisation des polyphénols dans la plante</b> .....	10
<b>4. Biosynthèse des polyphénols</b> .....	11
4.1. Voie de l'acide shikimique.....	11
4.2. La voie des phénylpropanoïdes.....	12
4.3. Voie de l'acétate / malonate.....	13
<b>5. Dégradation des polyphénols</b> .....	14
5.1. Oxydation enzymatique des polyphénols .....	14
5.2. Dégradation thermique.....	14
<b>6. L'interaction des composés phénoliques (protéines, lipides, polysaccharides)</b> .....	15
6.1. Complexation des protéines.....	15
6.2. Interactions polyphénols-polysaccharides.....	16
<b>7. Activités biologiques des polyphénols</b> .....	16

<b>7.1. Activité antioxydante des polyphénols</b> .....	16
<b>7.1.1 Mécanismes antioxydants des polyphénols</b> .....	17
a) Piégeage ou réduction des radicaux libres .....	17
b) Chélation des ions métalliques.....	18
c) Inhibition des enzymes productrices des ERO.....	18
<b>7.2. Autre activités</b> .....	19

### **Chapitre III: Eco-extraction**

<b>1. Généralités</b> .....	21
<b>2. Définition de l'extraction verte</b> .....	22
<b>3. Les six principes d'éco extraction</b> .....	22
<b>3.1.Principe 1 : vers une matière première renouvelable</b> .....	22
<b>3.2.Principe 2 : privilégier l'usage de solvants alternatifs</b> .....	22
<b>3.3.Principe 3 : générer des coproduits au lieu des déchets</b> .....	23
<b>3.4.Principe 4 : réduction de la consommation énergétique</b> .....	23
<b>3.5.Principe 5 : réduction du nombre d'opérations unitaires</b> .....	24
<b>3.6.Principe 6 : privilégier un produit non dénaturé «éco extrait»</b> .....	24
<b>4. Les techniques d'extraction</b> .....	25
<b>4.1.les techniques conventionnelles</b> .....	25
<b>4.1.1. Macération</b> .....	25
<b>4.1.2. Soxhlet</b> .....	26
<b>4.2. Les techniques vertes d'extraction</b> .....	26
<b>4.2.1. Extraction assistée par ultrasons</b> .....	26
<b>4.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)</b> .....	26
<b>4.2.3. Extraction de fluide supercritique (SFE)</b> .....	27
<b>4.2.4. Extraction accélérée par solvant (ASE)</b> .....	27
<b>5. Les avantages des techniques d'éco-extraction</b> .....	27
<b>6 .La nature des solvants utilisés en éco extraction</b> .....	28
6.1. L'eau comme solvant vert.....	28
6.2. Solvants naturels eutectiques (NADES).....	28
6.3. Les agro-solvants.....	29
6.4. Gaz liquéfiés et le CO2 supercritique.....	29

### **Matériel et méthodes**

<b>1. Matériel végétal</b> .....	31
----------------------------------	----

<b>2. Extraction des polyphénols de pissenlit</b> .....	32
<b>3. Dosage des polyphénols totaux</b> .....	32
<b>4. Dosage des flavonoïdes</b> .....	33
<b>5. Dosages des tanins</b> .....	34
<b>6. Evaluation de l'activité antioxydante</b> .....	35
<b>6.1. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH</b> .....	35
<b>6.1.1 Principe</b> .....	35
<b>6.1.2 Méthodes</b> .....	35
<b>7. Optimisation</b> .....	36
<b>7.1. Modèle mathématique</b> .....	36
<b>7.2. Niveaux des variables</b> .....	36
<b>7.3. Analyse du plan</b> .....	37
<b>8. Analyse statistique</b> .....	38

### **Résultats et discussion**

<b>1. Teneurs en composés phénolique des feuilles fraîches de pissenlit</b> .....	39
<b>1.1 Les courbes d'étalonnage</b> .....	39
<b>2. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux de pissenlit</b> .....	40
<b>3. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes de pissenlit</b> .....	43
<b>4. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des Tanins de pissenlit</b> .....	46
<b>5. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de pissenlit</b> .....	49
<b>6. Discussion</b> .....	50
<b>6.1. Teneurs en polyphénols totaux</b> .....	50
<b>6.2. Teneurs en flavonoïdes</b> .....	50
<b>6.3. Teneurs en tanins</b> .....	50
<b>7. Modélisation et optimisation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de pissenlit par la méthode DPPH</b> .....	51
<b>8. Discussion</b> .....	54
<b>Conclusion</b> .....	56
<b>Références bibliographiques</b> .....	57

## Résumé

Cette étude porte sur l'optimisation de l'éco-extraction des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) de pissenlit (en utilisant le bioéthanol) et leur activité antioxydante. Pour évaluer la quantité des composés phénoliques extraits à partir de pissenlit, un plan d'expérience a été réalisé. Les facteurs du plan ont été proposés en relation avec la méthode d'extraction des polyphénols (concentration du solvant, temps de macération). L'étude a été entamée selon le plan composite centré pour tester les effets des deux facteurs sur les réponses "taux et des polyphénols totaux, taux des flavonoïdes et taux des tanins et l'activité antioxydante de pissenlit. Les teneurs optimales des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins obtenues sont de 13,6311 mg EAG /g, 10, 8377 mg EQ/g, 7.584 mg EAT/g, respectivement. Un minimum d'IC50 de 0.0892mg/ml a été enregistré pour les extraits de pissenlit.

**Mots clés :** Polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins, *Taraxacum officinale*, éco- extraction, plan composite centré, activité antioxydante

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحسين الاستخراج الصديق للبيئة للمركبات الفينولية (إجمالي البوليفينول والفلافونويد والتانينات) من الهندباء (باستخدام الإيثانول الحيوي) ونشاطها المضاد للأكسدة. من أجل تقييم كمية المركبات الفينولية المستخرجة من الهندباء، تم إجراء تصميم تجريبي. تم اقتراح عوامل التصميم فيما يتعلق بطريقة استخراج البوليفينول (تركيز المذيب، وقت النقع). بدأت الدراسة باستخدام التصميم المركب المتمركز لاختبار تأثيرات العاملين على معدلات الاستجابة وإجمالي البوليفينول ومستويات الفلافونويد والتانين ونشاط الهندباء المضاد للأكسدة. المستويات المثلى من إجمالي البوليفينول ، EAT/g ، 7.584 ملغ ، EQ/g ، 8377 ملغ ، 10 ، EAG/g والفلافونويد والتانين التي تم الحصول عليها هي 13.6311 ملغ ، بحد أدنى 0.0892 ملغم/مل لمستخلصات الهندباء IC50 على التوالي. تم تسجيل مؤشر الكلمات الرئيسية: إجمالي البوليفينول، الفلافونويد، التانين، ، الاستخراج البيئي، التصميم المركب المتمركز ، نشاط *Taraxacum officinale* ، مضادات الأكسدة

### **Abstract**

This study focuses on the optimization of the eco-extraction of phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids and tannins) from dandelion (using bioethanol) and their antioxidant activity. To evaluate the amount of phenolic compounds extracted from dandelion, an experimental design was carried out. The factors of the design were proposed in relation to the method of extraction of polyphenols (solvent concentration, maceration time). The study was carried out according to the centered composite design to test the effects of the two factors on the responses " total polyphenols, flavonoid and tannin levels and antioxidant activity of dandelion. The optimum contents of total polyphenols, flavonoids and tannins obtained were 13.6311 mg EAG /g, 10.8377 mg EQ/g, 7.584 mg EAT/g, respectively. A minimum IC<sub>50</sub> of 0.0892mg/ml was recorded for dandelion extracts.

**Keywords:** total polyphenols, flavonoids, tannins, *Taraxacum officinale*, eco-extraction, centered composite design, antioxidant activity

## Liste des abréviations

---

**PAL** : phénylalanineammonialyase  
**TAL** : tyrosine ammonialyase  
**CCR** : cinnamateCoA réductase  
**CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase  
**CHS** : chalconesynthase  
**CHI** : chalconeflavanone isomérase  
**TR** : transférases  
**PPO** : la polyphénoloxydase  
**ERO** : espèces réactives de l'oxygène  
**LDL** : LowDensityLipoproteins  
**COV** : composés organiques volatils  
**UAE** : ultrasound-assisted extraction  
**MAE** : microwave assisted extraction  
**SFE**: supercritical fluid extraction  
**ASE**: accelerated solvent extraction  
**PFE**: pressurized fluid extraction  
**NADES** : solvants Eutectiques profonds naturels  
**FC** : Folin- Ciocalteu  
**EAT** : Equivalent acide tannique  
**EQ** : Equivalent quercétine  
**EAG** : Equivalent acide gallique  
**DPPH**: 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyle  
**ANOVA** : Analyse de la variance  
**BHT** : butylhydroxytoluene  
**BHA** : butylhydroxyanisol

<b>Figure 01:</b> <i>Taraxacum officinale</i> .....	04
<b>Figure 02 :</b> Répartition du <i>Taraxacum officinale</i> dans le monde .....	05
<b>Figure 03 :</b> Principaux polyphénols et de leurs structures chimiques .....	10
<b>Figure 04 :</b> Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule .....	11
<b>Figure 05 :</b> les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés .....	13
<b>Figure 06 :</b> schéma général des réactions impliquées dans le brunissement d'origine enzymatique .....	14
<b>Figure 07 :</b> Hypothèse de mécanisme de dégradation des proanthocyanidines en milieu acide à chaud .....	15
<b>Figure 08 :</b> Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage.	18
<b>Figure 09 :</b> Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes .....	19
<b>Figure 10 :</b> Rôles des polyphénols chez l'homme .....	20
<b>Figure 11 :</b> Les 12 principes de la chimie verte .....	21
<b>Figure 12:</b> Les six principes de l'éco-extraction .....	25
<b>Figure 13:</b> origine des biosolvants .....	29
<b>Figure 14 :</b> lieu de récolte de la plante .....	31
<b>Figure 15 :</b> feuilles du pissenlit .....	32
<b>Figure 16 :</b> Protocole d'extraction des polyphénols .....	32
<b>Figure 17 :</b> Mécanisme d'action du DPPH .....	35
<b>Figure 18 :</b> Représentation graphique d'un plan d'expérience central composite à deux facteurs (X1 et X2) et trois niveaux (-1, 0 et +1) avec les valeurs extrêmes $\pm \alpha$ .....	37
<b>Figure 19:</b> Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) : 1 : Acide gallique ; 2 : Quercétine ; 3 : Acide tannique .....	39
<b>Figure 20 :</b> Diagramme de <i>Pareto</i> des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des polyphénols totaux de Pissenlit .....	41
<b>Figure 21 :</b> Surface de réponse du taux des polyphénols totaux de Pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour .....	42
<b>Figure 22 :</b> Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'extraction des polyphénols totaux de Pissenlit en fonction de la désirabilité 1 .....	43
<b>Figure 23 :</b> Diagramme de <i>Pareto</i> des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des flavonoïdes de Pissenlit .....	44

<b>Figure 24 :</b> Surface de réponse du taux des polyphénols de Pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour .....	45
<b>Figure 25 :</b> Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour maximiser la teneur des flavonoïdes du Pissenlit en fonction de la désirabilité 1 .....	46
<b>Figure 26 :</b> Diagramme de Pareto des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des Tanins de Pissenlit .....	47
<b>Figure 27 :</b> surface de réponse du taux des tanins de pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour .	48
<b>Figure 28 :</b> optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'extraction des tanins de pissenlit en fonction de la désirabilité 1 .....	49
<b>Figure 29 :</b> Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins des feuilles fraîches de pissenlit .....	49
<b>Figure 30:</b> Diagramme de Pareto des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'évaluation de l'activité antioxydante .....	50
<b>Figure 31 :</b> Surface de réponse de l'activité antioxydante en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour .....	52
<b>Figure 32 :</b> Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'évaluation de l'activité antioxydante.....	54

<b>Tableau 01</b> : Noms et localisation de quelques composants du <i>Taraxacum officinale</i> .....	06
<b>Tableau 02</b> : Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux en polyphénols totaux de pissenlit .....	40
<b>Tableau 03</b> : La prédiction des conditions optimales des taux de polyphénols totaux .....	43
<b>Tableau 04</b> : Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux en flavonoïdes de pissenlit .....	43
<b>Tableau 05</b> : La prédiction des conditions optimales des taux de flavonoïdes .....	46
<b>Tableau 06</b> : Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux des tanins de Pissenlit .....	46
<b>Tableau 07</b> : La prédiction des conditions optimales des taux de tanins .....	49
<b>Tableau 08</b> : Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de pissenlit .....	51
<b>Tableau 09</b> : La prédiction des conditions minimales d'IC50 .....	54
<b>Tableau 10</b> : Les valeurs d'IC50 de pissenlit, BHA et BHT .....	54

# **Introduction**

Les relations entre les plantes et l'homme existent depuis l'antiquité (**Ngene et al., 2015**), elles ont été utilisées pour soulager les douleurs, guérir les maux et panser les blessures (**Benkhniue et al., 2010**). Il a été confirmé qu'une thérapie alternative basée sur des remèdes naturels peut jouer un rôle dans le traitement de nombreuses affections ; par exemple, les maladies cardiovasculaires (**OMS, 2018**). En effet les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales en raison de leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles (**Lahsissene et al., 2009**). Malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement. Notamment l'Algérie est l'un des pays qui regorge des plantes médicinales vue ses milliers d'hectares de forêt et de pâturage, mais, elles restent encore méconnues. En effet, l'utilisation de ces plantes dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique, ainsi que pour la production alimentaire, reste une perspective en Algérie (**Miara et al., 2013**). De plus, ces plantes constituent des ressources inépuisables de substances bioactives pour l'industrie pharmaceutique. Il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales, parmi eux nous avons étudié (*Taraxacum officinale*), une plante très répandue en médecine traditionnelle Algérienne (**Achika et al., 2014**).

Le pissenlit (*Taraxacum officinale*), membre de la famille des *astéracées* figure parmi les plantes qui présentent des effets bénéfiques sur la santé. *Taraxacum officinale* est largement distribués dans les zones tempérées les plus chaudes de l'hémisphère Nord (**Sharifi-Rad et al., 2018**). Le pissenlit contient une large gamme de composés photochimiques avec des activités biologiques spécifiques y compris les polyphénols dont les acides phénoliques présentent des propriétés antioxydants et immunostimulantes; les coumarines démontrent des propriétés anti tumorales, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticoagulantes; ainsi que des flavonoïdes ayant une activité antioxydante (**Gonzalez-Castejon et al., 2012; Xu et al., 2019**). Plusieurs substances phytochimiques ont été identifiées dans les différentes parties du pissenlit, elles se trouvent à la fois dans les racines et les feuilles, ces racines contiennent des sesquiterpènes, plusieurs composés phénoliques ainsi que des coumarines. Outre les métabolites secondaires, les racines de pissenlit constituent une riche source de polysaccharides (**Petkova et al., 2015**).

De ce constat, l'extraction de ces composés constitue une étape technologiquement importante mais les procédés classiques qui sont habituellement utilisés requièrent

généralement l'utilisation de solvants toxiques, des températures élevées pendant des temps de traitement longs entraînant ainsi des consommations importantes d'énergie (**Pradal, 2016**), il paraît donc indispensable d'agir et améliorer ces techniques conventionnelles en vue d'aboutir à des produits sûrs, de meilleure qualité, issus de technologies alternatives efficaces, rentables et plus protectrices de l'environnement.

Actuellement, l'utilisation des biosolvants représente une approche prometteuse pour substituer les solvants toxiques conventionnels. Ces derniers sont produits à partir de matière première renouvelable tels que le bois, l'amidon, les huiles végétales et les fruits et présentent de nombreux avantages : ils sont biodégradables, ininflammables, ont un bon pouvoir solvant et sont pour la majorité d'entre eux non toxique (**Chaabani, 2019**).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) et l'activité antioxydante de pissenlit (*Taraxacum officinale*) par un plan d'expérience du second degré (un plan composite centré). Le plan composite centré permet une modélisation quadratique de la réponse en fonction des paramètres étudiés et la détermination de l'interaction entre ces derniers.

Le travail présenté dans ce mémoire comporte deux parties :

-Dans la première partie nous avons présenté, quelques généralités sur la plante médicinale étudiée (*Taraxacum officinale*), une étude bibliographique sur les polyphénols ainsi que les principales techniques d'éco-extraction de ces composés d'intérêt.

-La seconde partie décrit la partie expérimentale (matériel et méthodes), avec une présentation des techniques de dosage et d'optimisation des composés phénoliques, d'évaluation de l'activité antioxydante, ainsi que les résultats obtenus et la discussion de ces derniers.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et les perspectives envisagées.

**Synthèse**  
**bibliographique**

# **Chapitre I : Pissenlit**

## 1. Description botanique de la plante

### 1.1. Origine du nom

Le pissenlit ou *Taraxacum officinale* est connu dans le monde entier sous différents noms plusieurs origines ont été attribuées du nom *Taraxacum*, la plus probable étant du grec "tarax" (désordre, perturbation) "akos" (remède) et le nom d'espèce «officinale» signifie médicinal ou capable de produire des médicaments. (Singh *et al.*, 2008).

*Taraxacum officinale* à plusieurs noms : dent-de-lion, pissenlit, horloge de fée, endive blanc en français, dandelion, wet-a-bed, lion'stooth, blowball en anglais, الّهندباء en arabe, Thoughmasthemgharth en kabyle et Tifaf ou Tarkhashqoun en arabe Algérien : (Murray *et al.*, 2020 ; Tahtamouni *et al.*, 2011).

### 1.2. Description et caractéristique :

Le pissenlit est une plante vivace variable qui atteint une hauteur de 12 pouces. Ses feuilles en forme de spatule sont profondément dentées, brillantes et glabres et sont disposées en rosette au niveau du sol. Les fleurs jaunes, qui fleurissent presque toute l'année (**figure01**), sont sensibles à la lumière et aux conditions météorologiques : elles s'ouvrent au lever du jour et se referment à la tombée de la nuit, et s'ouvrent par temps sec et se referment par temps humide (une fleur de pissenlit fermée signale la pluie). Lorsque la fleur arrive à maturité, elle se referme, les pétales se fanent et elle se transforme en une boule contenant des graines qui sont dispersées par la brise. (**Figure01**)

La rosette de feuilles rainurées canalise l'eau de pluie vers le centre et la racine pivotante, qui est épaisse et brun foncé, presque noire à l'extérieur. La racine est cylindrique, effilée et quelque peu ramifiée. Elle a une légère odeur et un goût sucré. L'intérieur de la racine de pissenlit séchée est jaunâtre, très poreux et sans moelle. Le fruit ressemble à des akènes, brun clair ou brun olive avec un floccule blanc de 10 mm de longueur qui augmente la surface pour le vol (**Figure01**), (Modaresi *et Resalatpour*, 2012 ; Lis *et Olas*, 2019, Murray *et Pizzorno*, 2020).

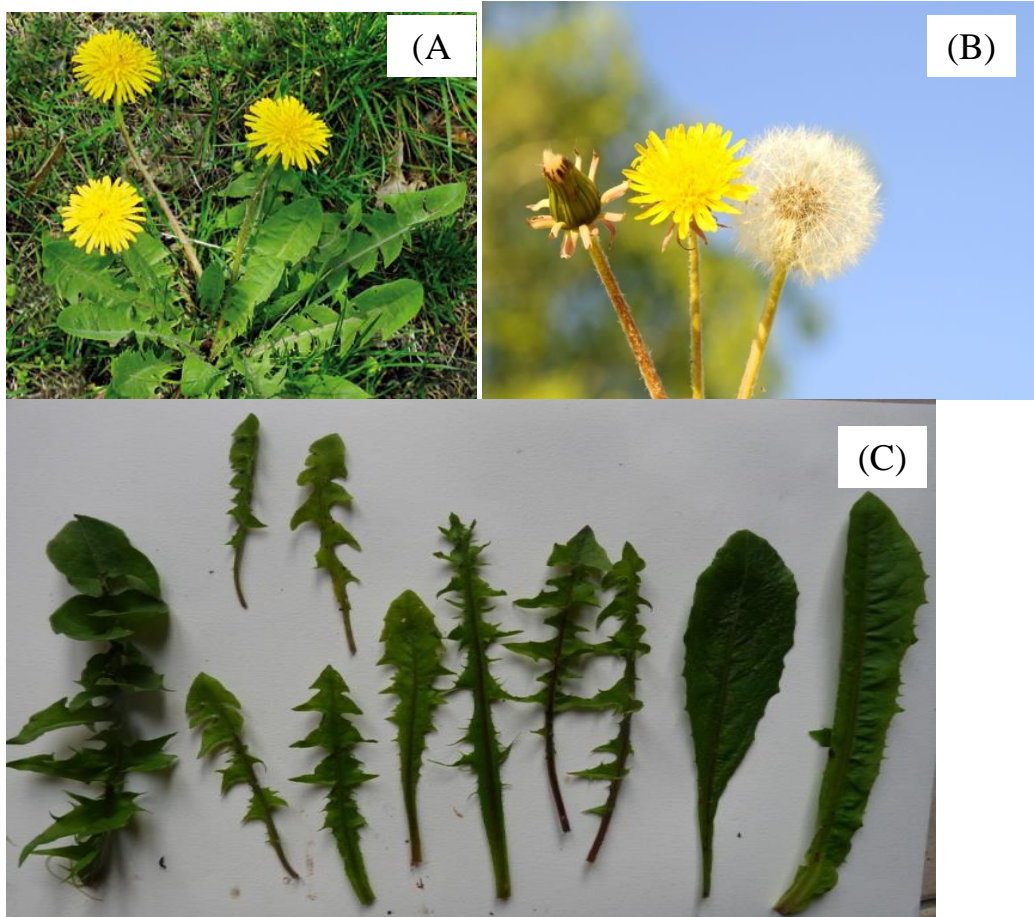


Figure 01 : *Taraxacum officinale* : (A) : plante complète, (B) : Fleurs, (C) : feuilles

## 2. Classification botanique :

➤ La classification botanique du pissenlit est comme suit :

Domaines: Eucaryotes

Règnes : Plantes (Plantae)

Sous-règne :Trachéophytes

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement: Angiospermes (= Magnoliophyta)

Classe : Eudicotylédones évoluées

Clades: Asteridées

Ordre : Astérale

Famille : Astéracées (Asteraceae)

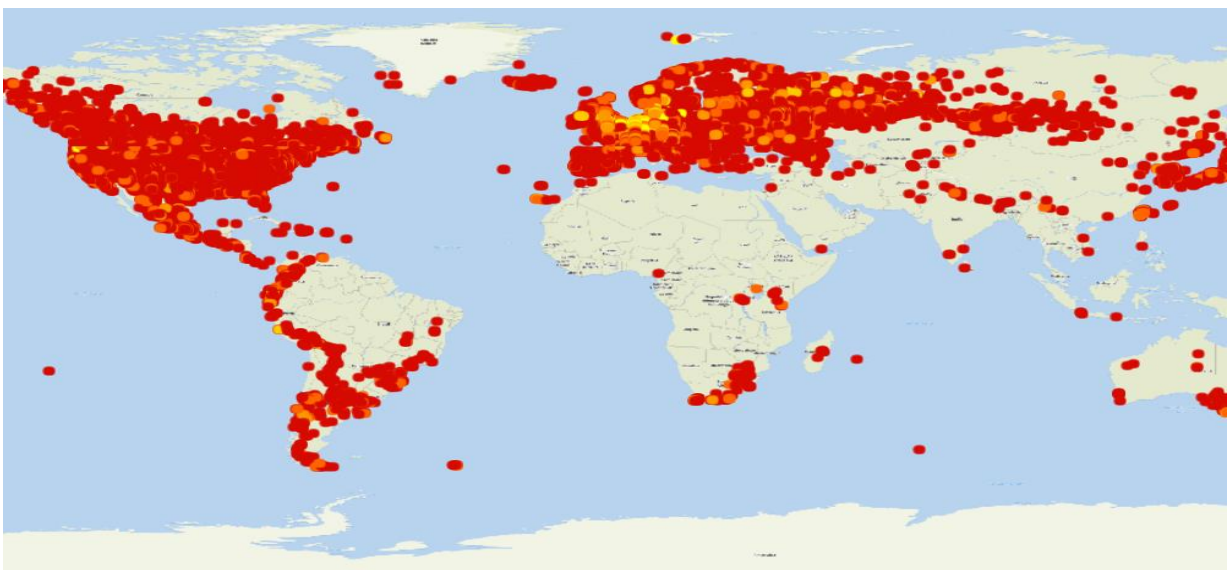
Genre: *Taraxacum*

Espèce: *Taraxacum officinale*

### 3. Répartition géographique :

Le pissenlit se rencontre partout en Europe, en Sibérie, au Japon, en Amérique du nord et en Afrique du nord (**Figure 02**). En Algérie, C'est une espèce sub-cosmopolite relativement commune dans toutes les régions septentrionale (**Baba aissa, 2011**).

Préférant les climats plus frais. Bien que *Taraxacum* soit très adaptable, elle préfère les sols humides et riches en azote à des altitudes moins de 6000 pieds. La plupart des espèces se trouvent dans les zones tempérées de l'hémisphère nord, la plus grande concentration se trouvant dans le nord-ouest de l'Europe (**Murray et Pizzorno, 2020**).



**Figure 02** : Répartition du *Taraxacum officinale* dans le monde (**Baba aissa, 2011**).

### 4. Composition chimique

Le pissenlit est une source de divers éléments nutritifs et de substances biologiquement actives ce qui lui apporte une longue histoire d'utilisation en tant que remède à base de plantes. Leur feuilles et racines contiennent des constituants légèrement différents dans l'ensemble (**tableau 01**) les principaux composants sont les caroténoïdes, les coumarines, les sesquiterpènes, les polysaccharides, flavonoïdes et divers acides phénoliques (**Benabdejlil et al., 2018**).

Tableau 01 : Noms et localisation du quelque composant du *Taraxacum officinale*

Composition	Exemple	Partie	Référence
<b>Acides phénoliques</b>	<p><b>-Acide caféique :</b>                      l'acide chlorogénique ,                      l'acide dicafféoyltartrique (acide chicorique)                      l'acide monocafféoyltartrique</p> <p><b>-les coumarine :</b>                      chichoriine et l'aesculine</p>	Feuilles Et raciness	(Schütz <i>et al.</i> , 2006)
<b>Flavonoïdes</b>	<p>-7-O-glucoside de lutéoline                      - 7-O-rutinoside de lutéoline                      -3-O-glucoside de l'isorhamnétine                      -7-O-glucoside de l'apigénine</p>	Feuilles	(Singh <i>et al.</i> , 2008)
<b>Les vitamines et les minéraux</b>	<p>- potassium (le plus abondant ) , le zinc, le magnésium, le calcium, le fer, le cuivre de la choline, sélénium, bore et silicium                      - les vitamine A, B, C et le complexe B</p>	Feuilles	(Benabdejlil <i>et al.</i> , 2018)
<b>lactones sesquiterpéniques</b>	<p><b>-Guaianolides :</b> la taraxacine, lactucine, et cichorine sont les principaux amers.  <b>-Germacranolides :</b> la 11<math>\beta</math>, 13-dihydrolactucine , l'ixérine D, ainslioside acide taraxinique <math>\beta</math>-glucopyranosyl .  <b>-Eudesmanolides :</b>                      La tétrahydroridentine-B et le taraxacolide-O-<math>\beta</math>-glucopyranoside.</p>	Racines	(Singh <i>et al.</i> , 2008)

### **Autre composés :**

Polysaccharides : Glucanes et mannanes et inuline.

Les acides gras : acide palmitique, acide linoléique et l'acide linoléique

On trouve aussi : des stérols, des triterpènes, une sérine protéinase: taraxalisine, des acides aminés, de la choline,

du mucilage et de la pectine (**Singh et al., 2008**).

### **5. Toxicité**

En raison de l'absence de toxines et d'alcaloïdes dans ses constituants, le pissenlit présente une faible toxicité. Des études sur des lapins, des souris et des rats, avec des lapins traités par voie orale avec de la plante séchée de pissenlit (3 à 6 g/kg de corps), et des souris traitées avec des extraits éthanoliques de pissenlit, n'ont montré aucun signe significatif ou visible de toxicité. Cependant, des réactions allergiques sont possibles, et peuvent survenir chez les personnes sensibles. L'acide taraxinique et la lactone sesquiterpénique se sont avérés être les composants les plus allergiques du pissenlit, provoquant des dermatites de contact et des réactions allergiques chez les personnes sensibles (**Fonyuy et al., 2016**).

### **6. Utilisations du pissenlit**

#### **6.1. Utilisation culinaire :**

La partie de la plante la plus couramment utilisée est la racine. Cependant, les feuilles et la plante entière peuvent également être utilisées. En plus de son usage médicinal, le pissenlit est un aliment et une boisson nutritifs. Les feuilles tendres sont utilisées crues dans les salades et les sandwichs ou légèrement cuites comme un légume. Les feuilles servent à la préparation du thé, les racines à la préparation du succédant café, et les fleurs servent à faire du vin et du schnaps (**Grauso et al., 2019**).

#### **6.2. Utilisation thérapeutique :**

Les différentes parties de la plante ont une longue histoire d'utilisation en tant que remède à base de plantes ; les racines de cette herbe sont d'abord considérées pour améliorer la digestion. De même, les racines sont généralement utilisées comme tonique du foie en stimulant la production de bile, en éliminant les toxines et en rétablissant l'hydratation et l'équilibre électrolytique (**Mahboubi et al., 2020**). Les feuilles de pissenlit peuvent être utilisées avec succès comme stimulant digestif et diurétique. En outre, des études récentes ont démontrés que cette plante a une activité hypolipidémique via l'inhibition de la lipase pancréatique et peut avoir un effet anti-obésité (**Di Napoli et Zucchetti, 2021**). Plusieurs effets bénéfiques ont été rapportés sur la muqueuse intestinale concernant l'architecture des

villosités, le rapport hauteur des villosités/profondeur des cryptes ainsi que l'infiltration cellulaire. Le pissenlit a de nombreuses propriétés comme immunomodulateur, stimulant digestif, prébiotique, stimulant de l'insuline (**Fonyuy *et al.*, 2016**), anti-inflammation, antiangiogénique, antinéoplasique et démulsiifiant (**Pfingstgrafet *al.*, 2021**).

En outre, le pissenlit traite l'indigestion et l'infection par l'hépatite B et améliore le métabolisme des hormones androgènes. En raison de la rareté des études *in vivo* sur le pissenlit, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ses avantages et son efficacité (**Qureshi *et al.*, 2017**).

## **Chapitre II : Polyphénols**

### 1. Généralités

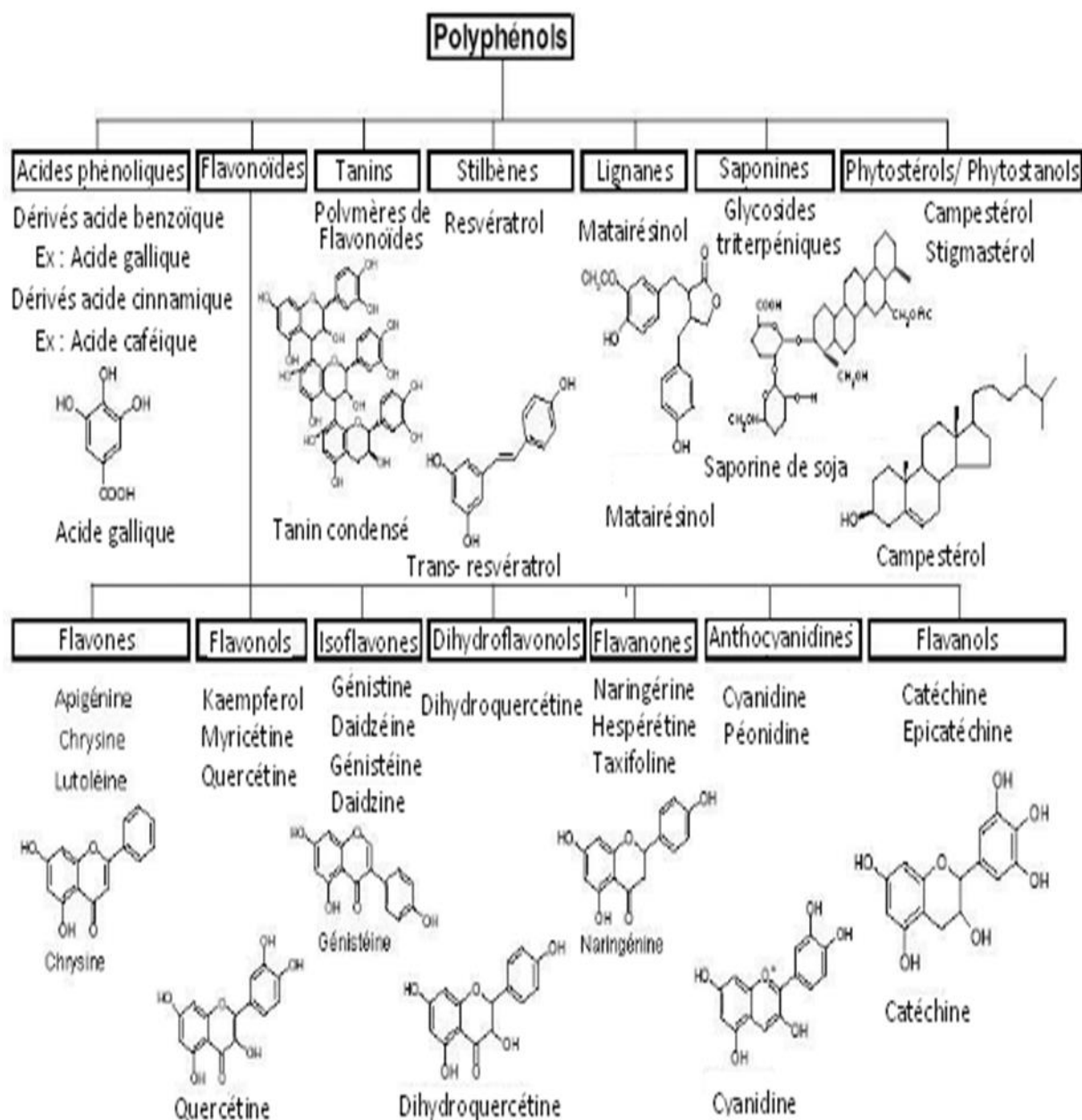
Les polyphénols sont les métabolites secondaires naturels des plantes supérieures, qui ont joué un rôle impératif dans l'application industrielle et thérapeutique. (**Rasouli et al., 2017 ; Singla et al., 2019**), et sont des grandes molécules, d'un poids moléculaire d'environ 800 Daltons, qui leur permettent de traverser la membrane cellulaire, (**Singla et al., 2019**).

Les polyphénols possèdent un ou plusieurs cycles benzéniques portants un ou plusieurs fonctions hydroxyles. Le « phénol » est l'élément structural fondamental qui se caractérise par la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (**Balasundram, 2006**).

Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et acides phénoliques, présents dans ces aliments (**Edeas, 2006**).

### 2. Classification des polyphénols

Selon la diversité structurale, les composés phénoliques sont regroupés en des nombreuses classes différentes par la complexité du squelette de base (un simple composé en C6 à des formes hautement polymérisés), ensuite par les degrés d'hydroxylation et oxydation, enfin par les liaisons de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides ou protéines) (**Macheix et al., 2005**). Les formes les plus simples présentant des structures chimiques tel que l'acide phénolique en C6-C1 ou C6-C3, flavonoïdes en C15 et les molécules condensées comme les tannins en (C15) n. Ce sont les trois grandes classes distinguées et suscitent un intérêt particulier grâce à leurs propriétés fort intéressantes dans les domaines agroalimentaire, cosmétiques et pharmaceutiques (**Ignat et al., 2011**).



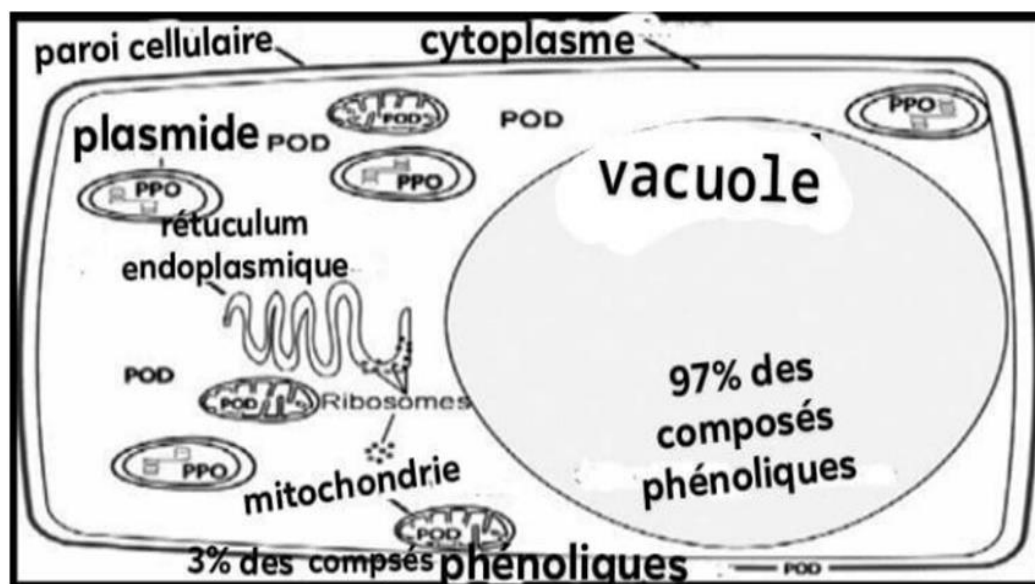
**Figure 03** : Principaux polyphénols et de leurs structures chimiques (Bessas, 2008)

### 3. Localisation des polyphénols dans la plante

A l'échelle de la cellule : les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi (**Figure 04**). Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol (**Boubekri, 2014**). Une partie des enzymes impliquées dans la

biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation. (Bénard, 2009).

Au niveau tissulaire, La localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Il faut noter que certains composés ne sont Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (Bénard, 2009).



**Figure 04** : Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule (Toivonen et Brummell, 2004).

#### 4. Biosynthèse des polyphénols :

La biosynthèse des polyphénols se fait par des voies principales (Figure 05), qui sont :

##### 4.1. Voie de l'acide shikimique :

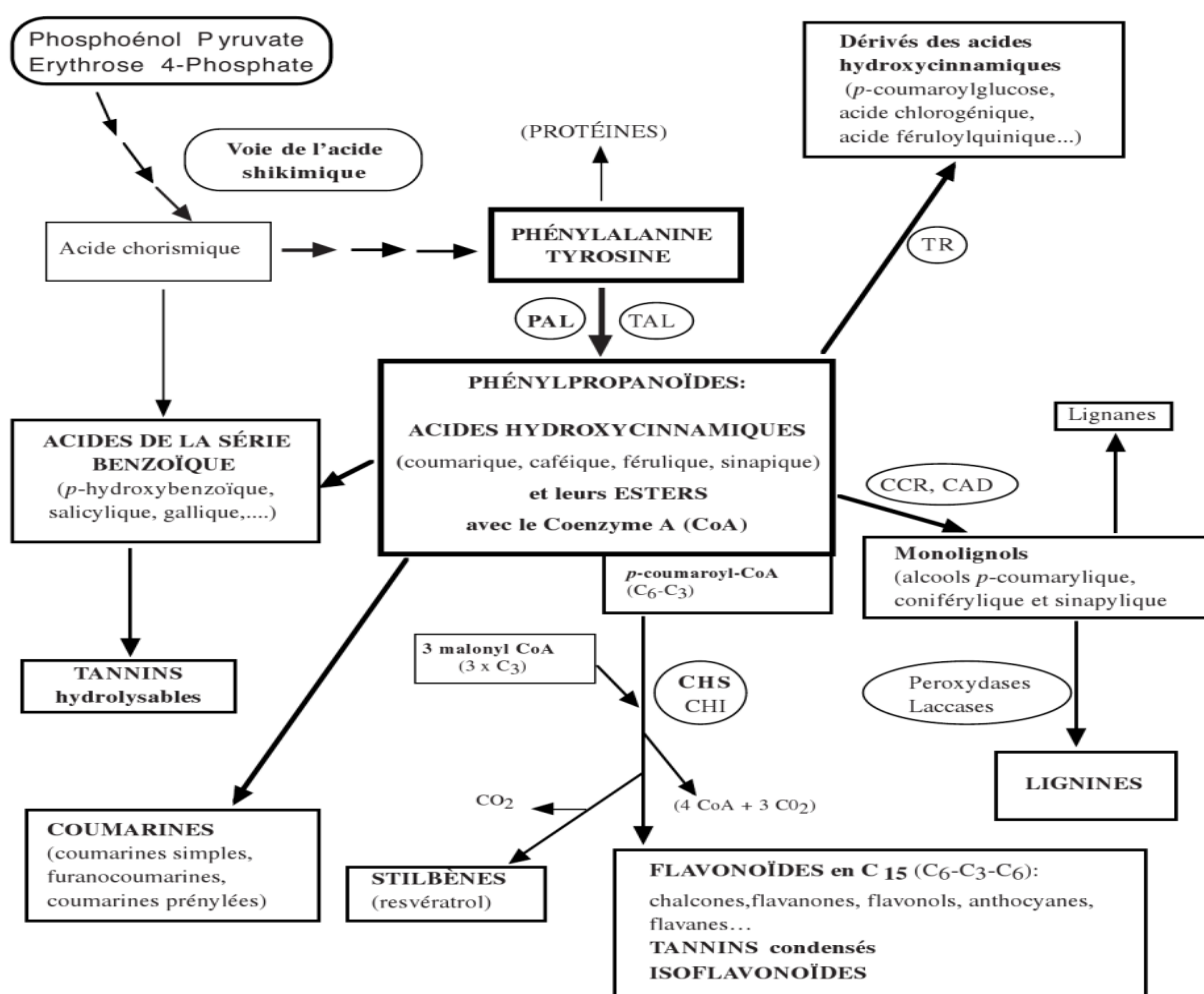
La majorité des polyphénols dérive directement de la voie Shikimate (Collin et Crouzet, 2011). Dans les conditions normales de croissance, 20% du carbone fixé par les plantes passe par la voie du shikimate. Cette dernière lie le métabolisme des carbohydrates à la voie de biosynthèse des composés aromatiques en conduisant à la synthèse de la structure de base, le noyau aromatique.

Dans une succession de sept étapes métaboliques le phosphoénolpyruvate (un intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose-4-phosphate (un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate, le précurseur des acides aminés aromatiques. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone, qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (**Dewick, 1995**). En plus de la phénylalanine, tous les intermédiaires de la voie peuvent-être considérés comme des points de branchements vers d'autres voies métaboliques.

### **4.2. La voie des phénylpropanoïdes :**

Bien que la formation de composés particuliers (alcaloïdes, coumarines...etc.) puisse passer par des voies différentes, la désamination de la phénylalanine est une première étape primordiale de la biosynthèse de l'immense majorité des composés phénoliques naturels.

La désamination de la phénylalanine conduit à la formation de l'acide cinnamique, molécule non encore phénolique (le premier phénylpropane formé) mais qui est directement à l'origine de la séquence biosynthétique, généralement dénommée voie des phénylpropanoïdes, permettant le lien entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. Cette voie conduit directement à la formation des acides hydroxycinnamique, p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Bruneton, 2009 ; Merlin, 2015**).



**Figure 05 :** les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques. abréviations des principales enzymes : PAL : phénylalanineammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; CCR : cinnamateCoA réductase ; CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; CHS : chalconesynthase ; CHI : chalconeflavanone isomérase ; TR : transférases (Collin et Crouzet, 2011).

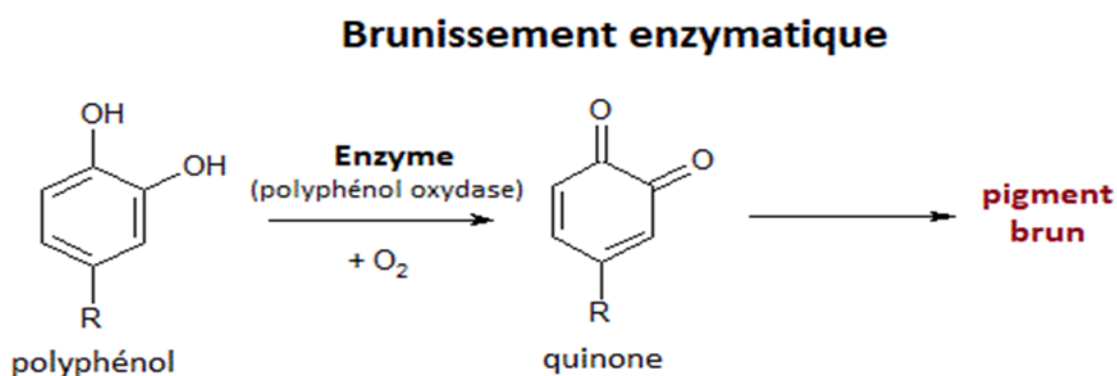
#### 4.3. Voie de l'acétate / malonate:

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Akroum, 2010).

### 5. Dégradation des polyphénols :

#### 5.1. Oxydation enzymatique des polyphénols :

L'oxydation des phénols est un des plus importants aspects de ces composées pour le biologiste. L'oxydation des composées phénoliques entraîne le brunissement des tissus végétaux. L'oxydation des composées phénoliques peut être catalysée par une enzyme, la polyphénoloxydase (PPO) ou peut résulter de l'action de l'oxygène atmosphérique (auto-oxydation). L'oxydation enzymatique est occasionnée par le contact des polyphénols, de la PPO et de l'oxygène suite à une découpe. La PPO comporte en effet, les activités créolase et catécholase. L'activité créolase catalyse l'hydroxylation de monophénol en o-diphénols. Cette activité n'est cependant pas toujours présente et reste minoritaire par rapport à l'activité catécholase, activité principale des PPO. Selon la structure monophénolique ou o-diphénolique. Les composées phénoliques sont substrats de l'activité créolase ou de l'activité catécholase des PPO. Les composées phénoliques peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur participation au brunissement (Kebe, 2014).

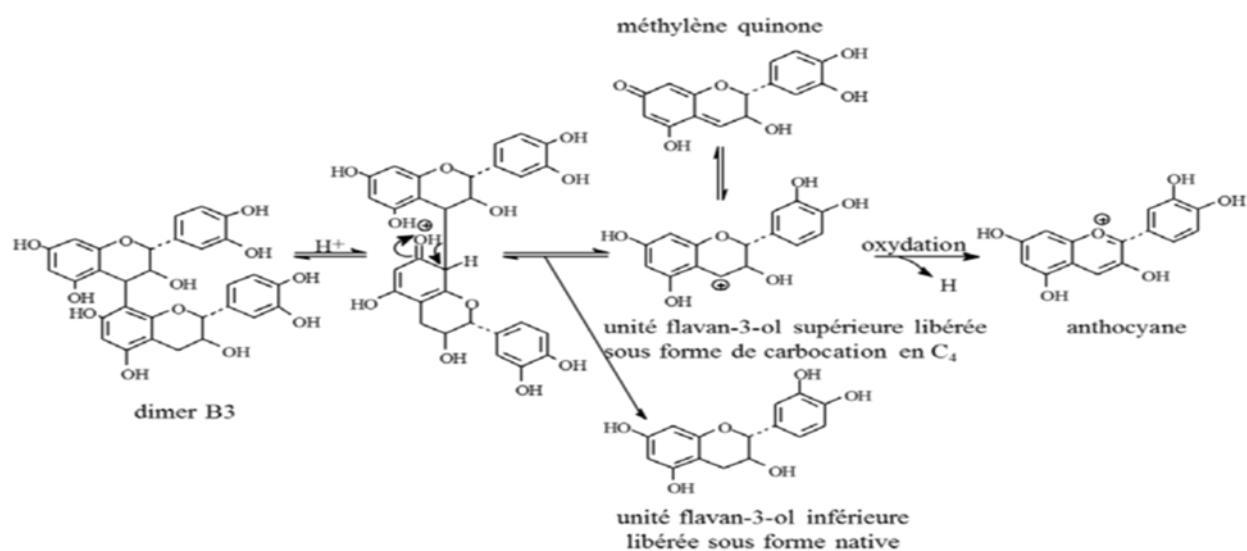


**Figure 06:** schéma général des réactions impliquées dans le brunissement d'origine enzymatique (Macheix et al., 2003).

#### 5.2. Dégradation thermique :

Un mécanisme spécifique de dégradation par clivage de liaison C-C, susceptible de se produire dans les produits acides traités thermiquement, a été décrit pour les proanthocyanidines. Les polymères de flavan-3-ols sont nommés proanthocyanidines car ils conduisent à la formation d'anthocyanes lors de leur dépolymérisation en milieu acide. En milieu acide à chaud, la liaison interflavanique des procyanidines, qui est relativement fragile, est rompue (**Figure 07**). Sa rupture conduit à la formation d'un carbocation réactif localisé en C(4) de l'unité flavan-3-ol supérieure (position 4, stabilisée en résonance avec sa forme

méthylène quinone) et, à la libération de l'unité (-)-épicatéchine ou (+)-catéchine (position 6 ou 8) correspondant à l'unité inférieure. Les carbocations formés sont des molécules très réactives qui peuvent s'oxyder dans le milieu afin de former des anthocyanes. De plus, ces carbocations, formés en milieu acide, peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines, des polysaccharides et des polyphénols puis former des liaisons exogènes avec la chaîne polypeptidique, polysaccharidique ou des liaisons polyphénol/polyphénol (**Renard et al., 2014**). Lors de traitements à haute température (50-60°C) au cours des transformations industrielles, la structure phénolique des polyphénols peut être dégradée. De plus, les traitements thermiques peuvent conduire à la formation d'o-quinones et d'o-semi-quinones, molécules très réactives qui peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines et/ou des polysaccharides.



**Figure 07** : Hypothèse de mécanisme de dégradation des proanthocyanidines en milieu acide à chaud (**Renard, 2014**).

### 6. L'interaction des composés phénoliques (protéines, lipides, polysaccharides) :

Les polyphénols sont des composés pouvant interagir avec d'autres molécules telles que les protéines, les métaux, d'autres polyphénols ou les polysaccharides (**Kebe, 2014**).

#### 6.1. Complexation des protéines :

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines, via des interactions de Van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons (groupements OH phénoliques) hydrogènes. Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes et sont vraisemblablement à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes (**Achat, 2013**).

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes avec un cycle C insaturé, noyaux aromatiques polarisables non polaires, peuvent développer de fortes interactions de dispersion. En solution aqueuse, ces interactions sont renforcées par la désolvation partielle des surfaces lors de la liaison hydrophobe.

De plus, le groupe OH phénolique peut agir comme donneur d'hydrogène (via son proton acide) et un accepteur d'hydrogène (via la paire non conjuguée du noyau phénolique). Compte tenu de la propension intrinsèque du noyau phénolique pour développer des interactions moléculaires, il n'est pas surprenant que des exemples de complexation flavonoïde-protéines soient nombreuses et concernent une grande variété de protéines (**Saidi, 2019**).

### **6.2. Interactions polyphénols-polysaccharides :**

Les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides sont de plus en plus étudiées car elles ont un impact sur l'extraction des polyphénols de la matrice alimentaire (des fruits et légumes mais aussi du vin et d'autres boissons), mais également sur l'extractabilité des polysaccharides, sur le brunissement enzymatique et sur la bioaccessibilité des polyphénols une fois la matrice déstructurée (**Cheyrier, 2005**).

Les composés issus de la complexation polysaccharides-polyphénols ont attiré l'attention de la communauté scientifique, car elles peuvent affecter l'activité antioxydante des composés polyphénoliques et les effets physiologiques des polysaccharides (**Cirillo et al., 2016**). Comme pour les polyphénols, la consommation de polysaccharides possède des avantages pour la santé humaine, tels que l'amélioration de la santé gastro-intestinale, le traitement de certaines maladies cardiovasculaires et de certains types de cancer (**Terry et al., 2001**). La réduction de l'hyperlipidémie et de l'hypertension, la modification de la tolérance au glucose et de la réponse à l'insuline, ainsi que l'augmentation de la satiété sont d'autres effets physiologiques associés à la consommation de polysaccharides (**Anderson et al., 2009**).

## **7. Activités biologiques des polyphénols :**

### **7.1. Activité antioxydante des polyphénols**

Le stress oxydant a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, diabète et vieillissement. Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la

dégradation et la mort de cellules (**Ghedadba et al., 2015**). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation, ils possèdent encore plus de potentiel antioxydant in vitro que les vitamines et les caroténoïdes (**Weichselbaum et Buttriss, 2010**).

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu (**Boubekri, 2014**).

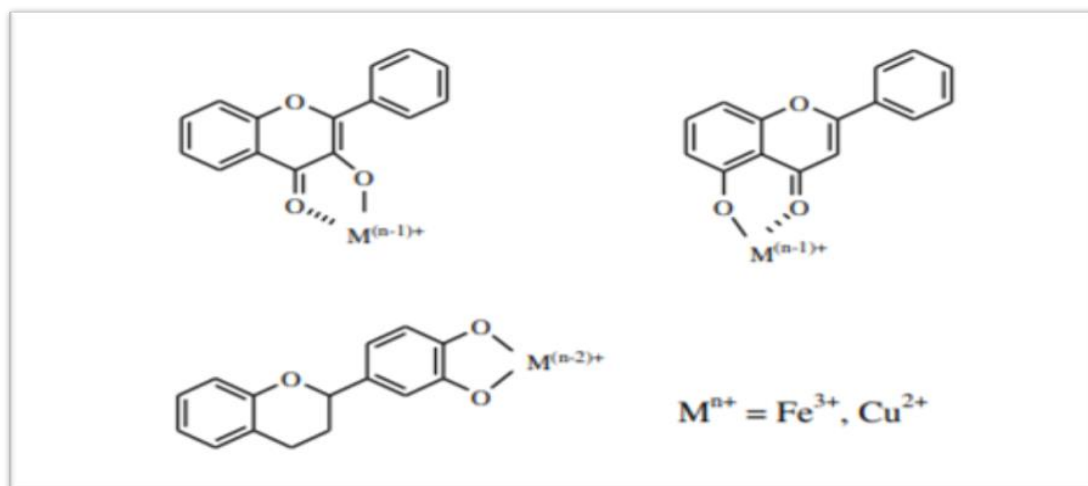
### 7.1.1 Mécanismes antioxydants des polyphénols

Les principaux mécanismes antioxydants des polyphénols sont :

#### 1. Piégeage ou réduction des radicaux libres

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont susceptibles de piéger la plupart des radicaux libres : radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ), anions superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et radicaux peroxylipidiques. Cette aptitude est due à leur structure chimique (**Figure 08**), dont la présence des éléments suivants :

- la structure 3',4'-dihydroxy du cycle B, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- la double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe oxo ( $\text{C}_4=\text{O}$ ), qui est responsable de la délocalisation d'électrons du noyau B, ce qui améliore encore plus l'activité antiradicalaire.
- Les hydroxyles en positions C3 et C5 qui permettent une activité maximale (**Boubekri, 2014**).



**Figure 08** : Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage (Dangles, 2006)

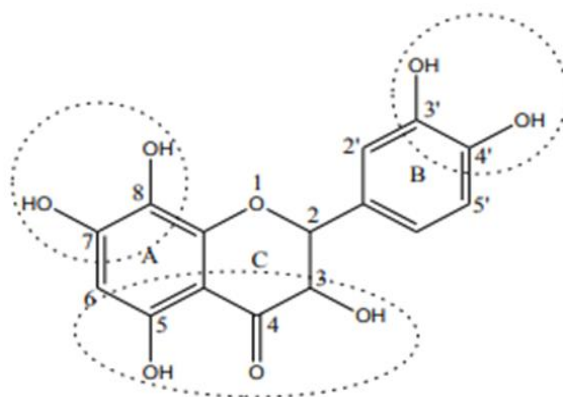
## 2. Chélation des ions métalliques :

En plus du piégeage radicalaire, l'activité antioxydant des composés phénoliques peut être résulté aussi de leurs capacités à chélater et / ou à réduire les ions des métaux tels que le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^{+}$ ). Les métaux catalysent la formation de radicaux alimentaires en abstrayant l'hydrogène. Ils favorisent également la décomposition des hydroperoxydes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou participent à la production du radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ) dans la réaction de Fenton (Craft et al., 2012) :



Il a été constaté que les flavonoïdes peuvent chélater les métaux et le succès de ce processus dépend du nombre de groupes hydroxyle et du pH du milieu. Les trois sites de coordinations principales sont entre (Figure 09) :

- 5-OH (cycle A) et le groupe 4-carbonyle (cycle C)
- 3-OH et le groupe 4-carbonyle (tous deux dans le cycle C)
- 3'-OH et 4'-OH dans le cycle B (Olszowy et al., 2019)



**Figure 09:** Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Amic et al., 2003).

### 3. Inhibition des enzymes productrices des ERO :

Les polyphénols jouent un rôle important dans le processus d'inhibition des enzymes génératrices des ERO dans les systèmes biologiques en formant des complexes inhibiteur-enzyme (Olszowy et al., 2019). Cette action est mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase qui est impliqué dans la lésion oxydative des tissus lors de la reperfusion post-ischémique. Certains flavonoïdes comme par exemple, l'apigénine, la lutéoline et le kaempférol peuvent agir en tant qu'inhibiteurs compétitifs de cette enzyme en empêchant la fixation de son substrat spécifique qui est la xanthine (Acuña et al., 2014). D'autres flavonoïdes tels que l'apocynine et l'épicatéchine sont connus également pour leurs pouvoirs d'inhiber l'activité du NADPH oxydase, en interférant avec l'assemblage ou en inhibant l'expression de ses différentes sous-unités. La monoamine oxydase (liée aux mitochondries) est une autre enzyme productrice des ERO et qui est sensible à la modulation inhibitrice de certains polyphénols comme par exemple, la cyanidine et la curcumine (Acuña et al., 2014).

#### 7.2. Autre activités :

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 antioxydant du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LowDensityLipoproteins 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. Les polyphénols agirait aussi en

inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs. Un certain nombre de molécules poly phénoliques sont également en étude clinique comme de antiagrégant plaquettaire ou hypotenseur sans résultats probants. L'amélioration de la vasodilatation endothéliale par les polyphénols.

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques 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, Ces composés antioxydants, anti carcinogènes (Zhou et al., 2016), anti-inflammatoires (Taïlé, 2021) , antiathérogènes montrent des activités, anti thrombotiques analgésiques (Manach et al., 2005 ; Gormaz et al., 2016), antibactériennes (Chaker, 2021), antiviraux, anti-allergènes, vasodilatateurs (manallah, 2012).

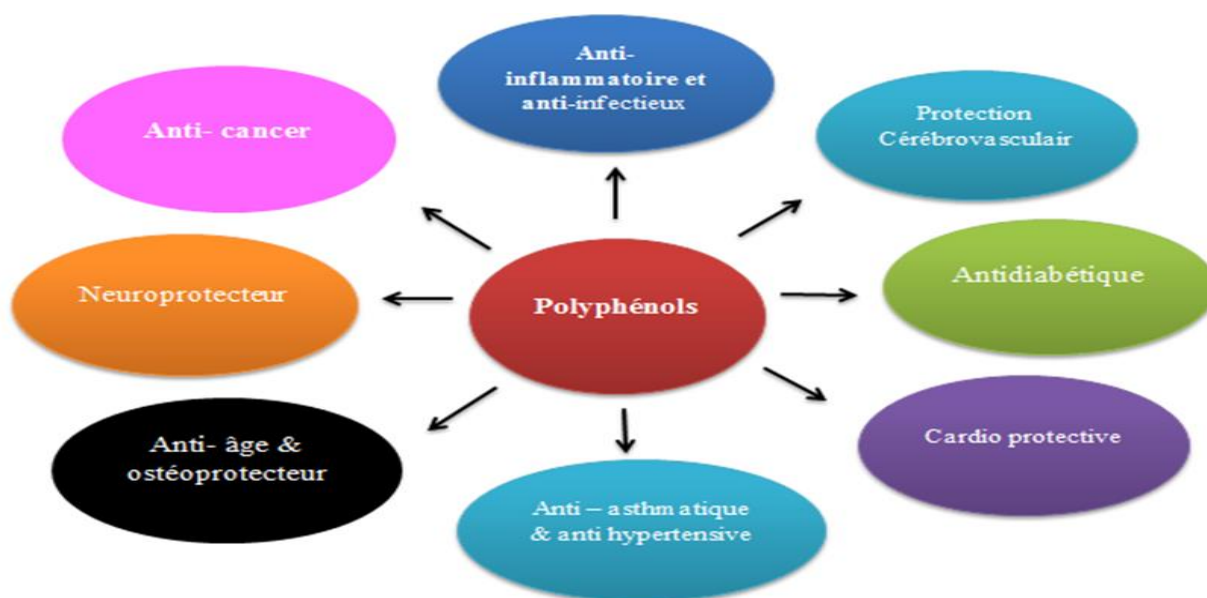


Figure 10 : Rôle des polyphénols chez l'homme (Ganesan et Baojun, 2017).

## **Chapitre III : Eco-extraction**

### 1. Généralités :

Les polyphénols, en tant que substances phytochimiques ont acquis une grande importance en raison de leurs nombreux avantages pour la santé en ce qui concerne les maladies liées au mode de vie et le stress oxydatif. À ce jour, le développement d'une méthode standard unique pour l'extraction efficace et rapide des polyphénols à partir de matrices végétales est resté un défi en raison des limites inhérentes aux diverses méthodes d'extraction conventionnelles. L'exploitation des polyphénols en tant que composés bioactifs à différents niveaux commerciaux a motivé les scientifiques à explorer des techniques d'extraction plus écologiques, efficaces et rentables, basées sur une approche d'extraction écologique (kashif *et al.*, 2017).

Ainsi, le concept de la chimie verte a été développé aux Etats-Unis à partir de 1990, en 1998, Anastas et Warner ont définis les 12 principes de la chimie verte qui a pour but de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances (matière première, produits, sous-produits, solvants, réactifs, etc) dangereuses pour l'homme et l'environnement. Ces principes sont résumés dans la (Figure 11).

Cette nouvelle réglementation encourage ainsi la recherche de solvants alternatifs pour remplacer les solvants conventionnels à risques. Par conséquent, plusieurs équipes se sont lancées dans la recherche de solvants « verts » et se sont orientées vers l'éco-extraction (Chaabani, 2019).

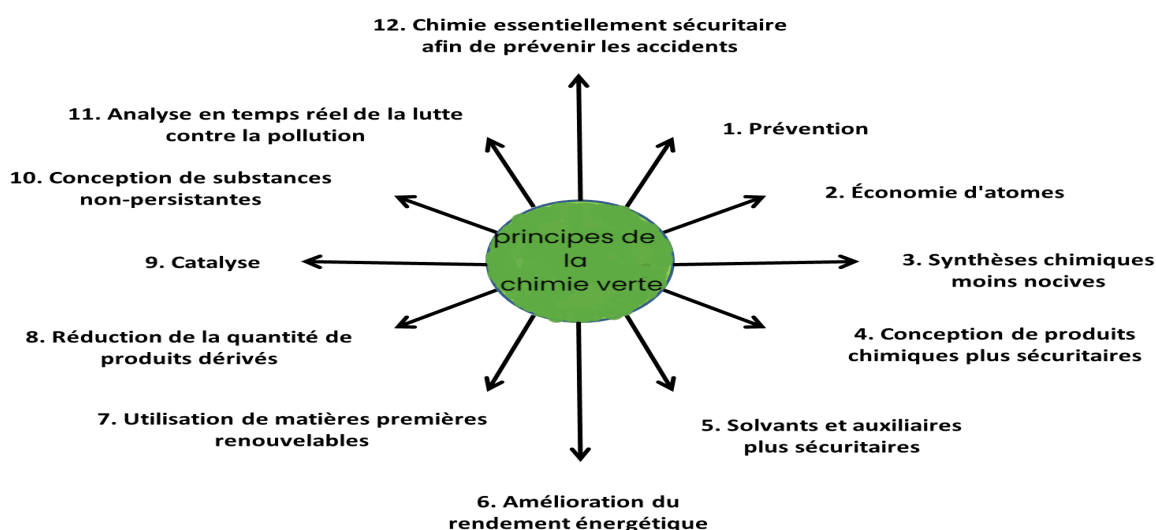


Figure 11 : Les 12 principes de la chimie verte (Anastas et Warner, 1998).

### 2. Définition de l'extraction verte

Une définition générale de la chimie verte est l'invention, la conception et l'application de produits et de procédés chimiques visant à réduire ou à éliminer l'utilisation et la production de substances dangereuses.

En ce qui concerne l'extraction verte de produits naturels, cette définition peut être modifiée comme suit : "L'éco-extraction est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction qui réduisent la consommation d'énergie, permet l'utilisation de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables, et garantit un extrait/produit sûr et de haute qualité.

Trois solutions majeures ont été identifiées pour concevoir et démontrer l'extraction verte à l'échelle du laboratoire et de l'industrie afin d'approcher une solution maximale de matières premières, de solvants et d'énergie :

- L'amélioration et l'optimisation des procédés existants
- l'utilisation d'équipements non dédiés
- l'innovation dans les processus et les procédures, mais aussi dans la découverte de solvants alternatifs (**chemat *et al.*, 2012**).

### 3. Les six principes d'éco extraction :

#### 3.1. Principe 1 : vers une matière première renouvelable :

La demande croissante en extraits naturels pour divers besoins en agroalimentaire, en cosmétique ou en pharmacie peut conduire à une surexploitation des ressources naturelles. Les producteurs d'extraits naturels doivent prendre en compte les paramètres liés au respect de l'environnement car une surexploitation « démesurée » de plantes d'une région peut conduire à l'extinction de certaines espèces endémiques. Ainsi, la préservation des ressources naturelles et de la biodiversité doit être prise en compte vis-à-vis de notre biodiversité, notre environnement et des générations futures. Dans le contexte de l'éco-extraction, l'utilisation de matières premières renouvelables, l'amélioration variétale ou le recours à des procédés biotechnologiques ingénieux sont autant de pistes à considérer afin d'éviter l'extinction des espèces endémiques (**chemat *et al.*, 2012**).

#### 3.2. Principe 2 : privilégier l'usage de solvants alternatifs :

Les réglementations actuelles ont un impact direct et progressif sur la diminution de la consommation de solvants pétrochimiques et de composés organiques volatils (COV). Les fabricants qui utilisent des solvants organiques doivent démontrer l'absence de risque lors de l'extraction et l'innocuité des ingrédients en ce qui concerne les traces de solvants. La plupart

des solvants organiques sont inflammables, volatils et souvent toxiques et sont responsables de la pollution de l'environnement et de l'effet de serre. Les aspects sécuritaires, environnementaux et économiques obligent l'industrie à se tourner vers des solvants plus verts.

Parmi les solvants verts, les agro-solvants ou bio-solvants jouent un rôle important dans le remplacement des solvants pétrochimiques. Ils constituent une ressource renouvelable produite à partir de biomasses telles que le bois, l'amidon, les huiles végétales ou les fruits. Ces bio-solvants ont un pouvoir solvant élevé, sont biodégradables, non toxiques et ininflammables. Leurs limites et leurs inconvénients sont dus à leur coût, à leur viscosité élevée, à leur point d'ébullition élevé et à la génération de mauvaises odeurs et d'arômes indésirables (**chemat *et al.*, 2012**).

### **3.3. Principe 3 : générer des coproduits au lieu des déchets**

Les industriels du domaine de l'extraction de produits naturels, que ce soit les producteurs de jus à partir de fruits et légumes, les producteurs d'huile végétale à partir de graines ou les fabricants de molécules bioactives à partir de différents types de végétal, ciblent généralement un seul et unique produit à partir d'une biomasse donnée. Cela a pour conséquence la génération d'une très grande quantité de déchets, sous-produits ou coproduits selon la valorisation effectuée. Par ailleurs, ces produits générés lors de l'extraction sont sensibles à la dégradation chimique ou microbiologique et peuvent encore plus contribuer à l'augmentation de la pollution de l'air et à l'appauvrissement en matière organique du sol. Depuis la loi Grenelle 2 de 2012, les producteurs ou détenteurs de quantités importantes de bio déchets sont tenus de mettre en place un tri à la source et une valorisation organique (compostage, méthanisation) selon l'article L 541-21-1 du Code de l'environnement.

Ce concept consiste à optimiser la valorisation de toutes les composantes des agro ressources afin de produire, par exemple, des énergies renouvelables, des substances chimiques à haute valeur ajoutée, des molécules plateformes, des biomatériaux, des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale (**chemat *et al.*, 2012**).

### **3.4. Principe 4 : réduction de la consommation énergétique**

La consommation énergétique est actuellement une des préoccupations principales des industriels, quel que soit le secteur d'activité. Les enjeux majeurs peuvent être liés à des problèmes environnementaux, à des coûts de production accrus ainsi qu'à une perte de rentabilité. Dans ce contexte, l'optimisation mais aussi l'intensification des procédés industriels, et notamment des procédés d'extraction, représente un enjeu économique

important. En général, la consommation d'énergie liée aux procédés d'extraction peut être réduite dans le cadre d'une démarche d'éco-extraction selon quatre voies :

- l'optimisation des procédés existants ;
- la récupération de l'énergie libérée ;
- l'intensification ou l'assistance aux procédés existants en particulier à l'aide des technologies innovantes
- l'innovation de procédé (**chemat et al., 2012**).

### **3.5. Principe 5 : réduction du nombre d'opérations unitaires**

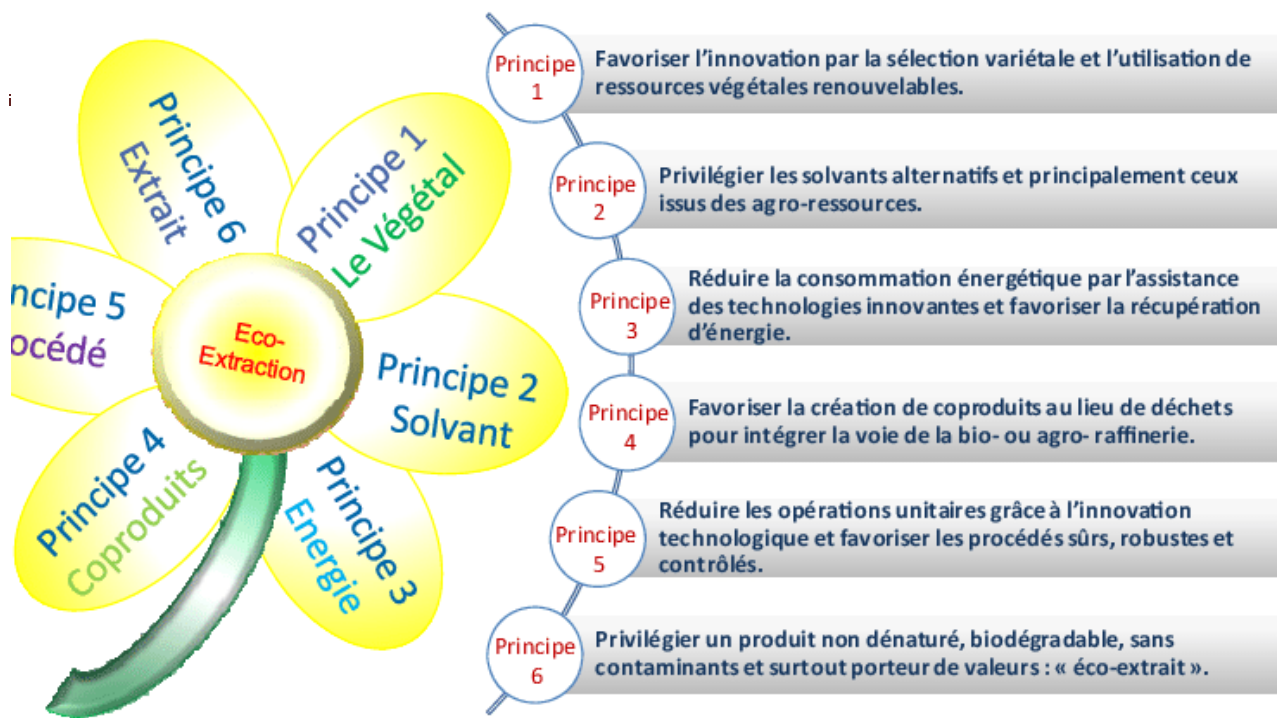
Avec les préoccupations économiques et environnementales actuelles, l'industrie de l'extraction végétale doit développer des procédés efficaces en termes de rendements d'extraction, de réduction des impacts environnementaux, de sécurité des opérateurs et d'utilisation de l'espace. Généralement, un procédé d'extraction complet est composé des étapes suivantes :

- prétraitement de la matière première végétale par séchage et broyage pour augmenter la surface de contact et la pénétration du solvant.
- extraction solide-liquide avec un solvant approprié.
- séparation solide-liquide par filtration ou centrifugation.
- élimination des solvants et recyclage pour éliminer toute trace de solvant résiduel dans l'extrait ou le résidu final (**chemat et al., 2012**).

### **3.6. Principe 6 : privilégier un produit non dénaturé «éco extrait»**

Le concept de naturalité est assez difficile à définir, en particulier dans le cas d'extraits de plantes où la définition d'un véritable extrait naturel n'est pas claire. Selon la législation REACH, une substance naturelle est « une substance naturelle, telle quelle, non traitée ou traitée uniquement par des moyens manuels mécaniques ou gravitationnels, par dissolution dans l'eau, par flottation, par extraction par l'eau, par distillation à la vapeur ou par chauffage uniquement pour éliminer l'eau ou qui est extraite de l'air par un quelconque moyen ».

- Cette définition inclut que la substance ne doit pas être modifiée chimiquement ; en d'autres termes, sa structure moléculaire doit rester inchangée indépendamment du procédé utilisé même s'il est chimique. Ainsi, selon cette législation, l'huile d'olive ou les jus de fruits et de légumes peuvent être considérés comme « naturel » (**chemat et al., 2012**).



**Figure 12** : Les six principes de l'éco-extraction (Tixier *et al.*, 2013).

#### 4. Les techniques d'extraction :

Les techniques d'extraction employées dans l'extraction des molécules bioactives peuvent être classées en deux catégories (Cheok *et al.*, 2014) :

- Les techniques conventionnelles qui sont basées sur la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ces techniques utilisent souvent une grande quantité de solvant pour extraire le soluté désiré. Les techniques conventionnelles se résument en extraction par macération, soxhlet, reflux ou la combinaison de ces techniques.
- Les techniques vertes « greens technologies » qui donnent plus d'efficacité, moins de temps et utilisent des matières premières renouvelables, par conséquent moins de pollution. Les techniques vertes se résument essentiellement en extraction assistée par ultrasons (UAE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction accélérée par solvant (ASE) et extraction par fluide supercritique (SFE) (Imbimbo *et al.*, 2020).

##### 4.1. les techniques conventionnelles

###### 4.1.1 Macération :

L'extraction par macération est une extraction solide-liquide où le composé bioactif (soluté) de la plante est extrait par trempage de la matière végétale dans un solvant spécifique pendant un certain temps. L'efficacité de ce processus est déterminée par deux facteurs principaux, la solubilité et la diffusion effective. Cette méthode ne nécessite pas d'équipement spécial, c'est pourquoi elle est la plus courante chez les chercheurs. L'inconvénient de la

macération est la longue durée d'extraction mais elle peut être réduite toutefois par agitation (**Cheok *et al.*, 2014**).

### **4.1.2 Soxhlet :**

L'extraction Soxhlet est une procédure conventionnelle utilisée pour l'extraction des lipides et des caroténoïdes. Il est effectué par utilisant des solvants à température d'ébullition et à pression ambiante, et bien qu'il exige une grande quantité de solvants et une longue durée d'extraction, il offre des rendements élevés et n'affecte pas la bioactivité des molécules extraites (**Imbimbo *et al.*, 2020**).

## **4.2. Les techniques vertes d'extraction :**

### **4.2.1. Extraction assistée par ultrasons (UAE)**

Le principe de fonctionnement des UAE est l'utilisation des ultrasons (ondes avec une fréquence comprise entre 20 - 100 MHz) pour des bulles à l'intérieur du solvant. Ces bulles, une fois créées par le phénomène de cavitation perturbation et accélérera la pénétration du solvant dans le matériel végétal (**Ligor *et al.*, 2018**).

En général, les UAE sont subdivisés en UAE directs et indirects. Dans les UAE directes, un sonotrode (outil acoustique inerte) est immergé dans le mélange échantillon-solvant, suivi de l'application directe du rayonnement ultrasonique. Le rayonnement ultrasonique indirect des UAE est appliqué au mélange échantillon-solvant par un bain ultrasonique, qui peut être utilisé simultanément pour plusieurs échantillons. Les deux approches exigent une étape de nettoyage supplémentaire. Les paramètres communs pour optimiser les UAE sont la température, le cycle de sonication, la granulation/le degré d'homogénéisation et le temps d'extraction (**Benedikt *et al.*, 2020**).

### **4.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)**

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) implique l'utilisation de micro-ondes pour chauffer le solvant en contact avec la cellule permettant ainsi d'extraire des pigments, des lipides et d'autres molécules bioactives. L'échauffement est causé par deux phénomènes : rotation dipôle et conduction ionique, qui peut se produire individuellement ou simultanément. MAE est généralement effectuée en systèmes pour éviter la dissipation de chaleur. De cette façon, le mécanisme de chauffage est ciblé et sélectif, réduisant ainsi le temps d'extraction et l'amélioration du rendement final. Toutefois, la principale limite de cette méthode est la température élevée qui pourraient affecter la bioactivité de l'extrait molécules (**Imbimbo *et al.*, 2020**).

### 4.2.3. Extraction de fluide supercritique (SFE)

L'extraction de fluide supercritique est une technique d'extraction précieuse et respectueuse de l'environnement utilisée pour extraire une grande variété de composés bioactifs, présentant les avantages rapide, sélectif et économe en solvants. État supercritique se produit lorsque la température et la pression du fluide sont élevées au-dessus de son point critique. Le dioxyde de carbone est le plus solvant utilisé dans le SFE étant très efficace pour l'extraction de graisse, lipides et autres composés non polaires. Pour l'extraction de substances polaires, un modificateur polaire appelé Co-solvant (par exemple méthanol, éthanol, acétone, eau, éther éthylique ou dichlorométhane) doit être ajouté à la supercritique pour augmenter la solubilité (**Ligor et al., 2018**).

### 4.2.4. Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'extraction accélérée par solvant aussi appelé sous pression extraction de fluide (PFE), extraction par solvant amélioré (ESE), ou extraction au solvant haute pression (HPSE), dans cette méthode d'extraction différents solvants sont nécessaires; les plus populaires sont le méthanol, l'éthanol ou des mélanges d'autres solvants.

Il s'agit d'une technique d'extraction rapide automatisée qui utilise un solvant minimal à haute température et pression. Le mérite de l'utilisation augmentation de la température est d'améliorer la solubilité et le transfert de masse de soluté dans le solvant, et la pression élevée maintient le solvant sous son point d'ébullition, permettant une extraction rapide, sûre et efficace des analytes cibles de matières végétales au solvant d'extraction. Un processus d'extraction est généralement terminé en 15 à 25 minutes en utilisant seulement 15-45 ml consommations de solvant (**Ligor et al., 2018 ; Cheok et al., 2014**).

## 5. Les avantages des techniques d'éco-extraction :

L'extraction verte de produits naturels est un donc un concept qui répond aux défis du 20<sup>ème</sup> siècle, en protégeant à la fois l'environnement et les consommateurs et dans le même temps, en améliorant la compétitivité des industries en devenant plus écologique, plus efficace et plus rentable (**Chemat et al., 2012**).

Les techniques vertes présentent de nombreux avantages par rapport aux techniques classiques parmi lesquels (**kashif et al., 2017**) :

- Processus continu avec pas d'intermittence
- Facilité d'utilisation grâce à la simplicité de technique
- Moins de temps par rapport aux techniques traditionnelles, telles que l'extraction Soxhlet, la macération et l'hydrosilation)

- Les ultrasons permettent la pénétration des solvants dans des matrices d'échantillons plus profondes afin de faciliter le transfert de masse accru des solutés vers l'extraction au solvant.
- Facilité de récupération de solvant employé Utilisation des cosolvants avec cosolutes entraîner une amélioration de l'efficacité

### **6. La nature des solvants utilisés en éco extraction**

#### **6.1. L'eau comme solvant vert**

D'un point de vue "naturel", l'eau apparaît comme le solvant le plus vert. Il est non seulement peu coûteux et inoffensif pour l'environnement, mais il est également non toxique et ininflammable, ce qui offre des possibilités de traitement propre et de prévention de la pollution. L'extraction à l'eau sous-critique (SWE) utilise l'eau dans des conditions de pression et de température très différentes,et nécessite donc un équipement spécifique. L'eau sous-critique se produit à des températures situées entre le point d'ébullition et le point critique de l'eau (100 °C à 1 bar et 374°C à 221 bars), à des pressions suffisamment élevées pour maintenir l'eau à l'état liquide .Il a été observé que la température a un effet plus important que la pression sur la polarité de l'eau subcritique. Idéalement, les molécules organiques sont plus solubles dans l'eau dans des conditions sous-critiques en raison de la polarité plus faible dans cet état. L'eau est utilisée pour l'extraction des aliments et des produits naturels depuis des siècles. Avec différents procédés et procédures : macération, décoction, infusion et percolation, mais elle est connue pour être un mauvais solvant pour les composés non polaires ou certains composés semi-polaires (**Kouchaksaraie et al., 2016**).

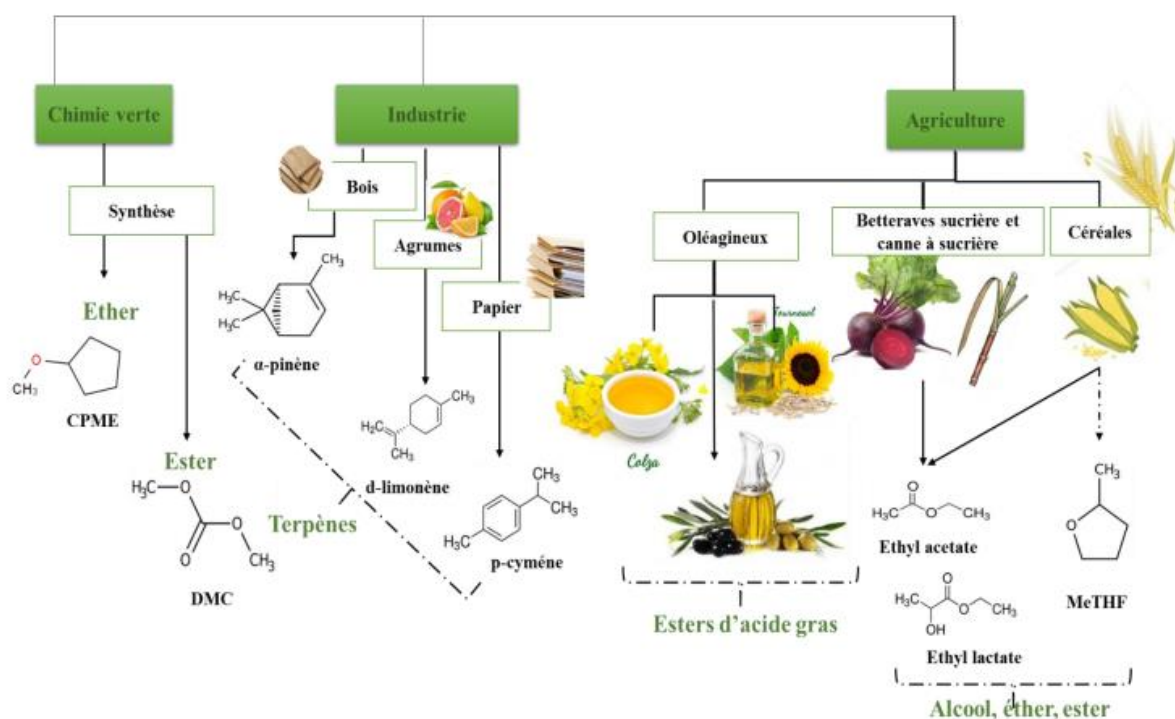
#### **6.2. Solvants naturels eutectiques (NADES)**

Les NADES sont considérées comme respectueuses de l'environnement et biodégradables en raison de l'origine naturelle de leurs composants (**Shishov et al., 2017**). Ils sont constitués d'acides organiques, d'acides aminés, de sucres, de polyols, de choline et d'urée (**Choi et al., 2011**). Par conséquent, les extraits obtenus peuvent être utilisés de façon sécuritaire dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique (**Choi et al., 2019**). Ces métabolites naturels constituent une source prometteuse pour la préparation de mélanges eutectiques puisqu'ils sont abondants dans la biomasse, biodégradables, comestibles, présentent une grande diversité structurale et sont peu toxiques. Les NADES ont une meilleure propriété extractive car ils sont liquides au-dessous de 0°C, ils ont une viscosité ajustable, et une grande capacité de solubilisation des composés apolaires et polaires. En outre, ces NADES sont de

plus en plus utilisés pour l'extraction des composés naturels à partir des plantes et d'autres matrices naturelles (Bajkacz et Adamek, 2017 ; Bajkacz et Adamek, 2018).

### 6.3. Les agro-solvants

Parmi les solvants verts, on distingue les agro-solvants ou encore appelés les biosolvants. Ces derniers proviennent de matières premières renouvelables d'origine, végétale ou animale transformées ou non, dont la majeure partie de la molécule finale est d'origine naturelle. Ces solvants biosourcés peuvent être classés en fonction de la filière d'où ils sont issus (Figure 13) (Calvo *et al.*, 2018).



**Figure 13:** origines des biosolvants (Emna Chaabani, 2019).

### 6.4. Gaz liquéfiés et le CO<sub>2</sub> supercritique

Les fluides supercritiques à l'extraction des gaz liquéfiés (SCF) sont une alternative bien établie aux méthodes traditionnelles d'extraction par solvants organiques. L'extraction par gaz liquéfié (GGL) est généralement effectuée à des températures ambiantes, avec une consommation d'énergie minimale et une quantité négligeable de solvant résiduel dans les extraits, préservant ainsi la qualité des matières premières et des extraits (Badens *et al.*, 2012).

Pour le CO<sub>2</sub> supercritique comme solvant alternatif, le processus d'extraction se déroule en quatre étapes : la diffusion du fluide supercritique dans la matrice poreuse de l'échantillon, la séparation de l'interaction soluté-soluté au sein de la matrice, la diffusion des solutés hors de

la matrice et la récupération de l'échantillon soluté au sein de la matrice, la diffusion des solutés hors de la matrice, et la récupération des analytes de l'échantillon lors de la décompression (**Yousefi *et al.*, 2018**).

# **Matériel et méthodes**

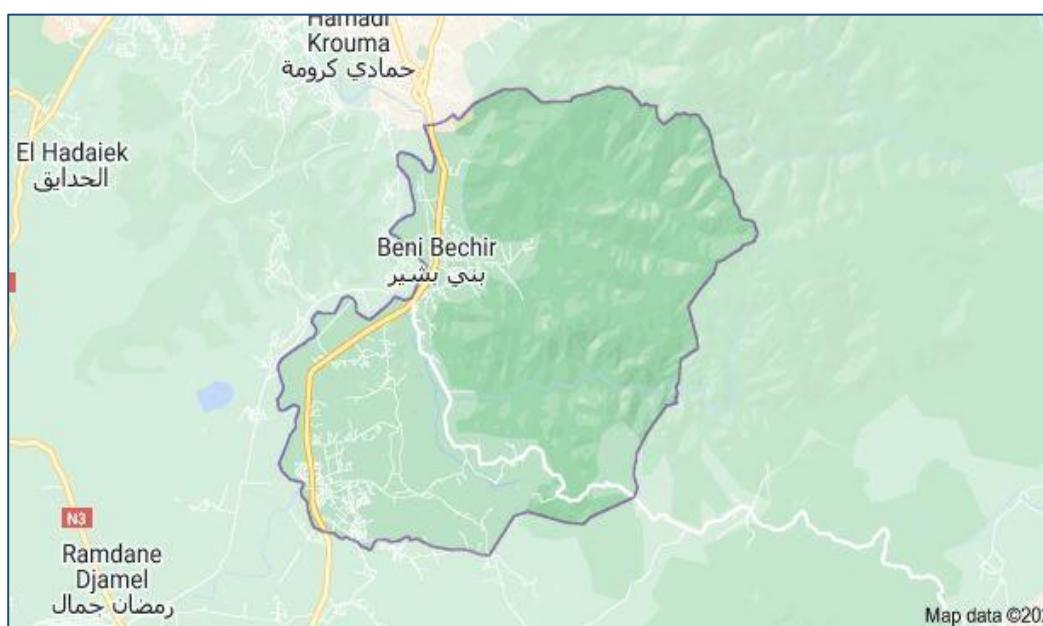
Objectifs : nous rappelons que l'objectif principal de cette étude est d'optimiser l'écoc extraction des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) et l'activité antioxydante des feuilles de pissenlit *Taraxacum officinale*.

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée au laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, Université 20 Août 1955 Skikda, pendant la période allant de Février jusqu'au mois de Mars 2022.

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est les feuilles de pissenlit ou dents de lion (*Taraxacum officinale* L. Espèce sub-cosmopolite relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale). La récolte était entreprise manuellement le 14 Février 2022, ce qui coïncide avec le stade de floraison et une croissance végétative élevée de cette plante.

Les échantillons ont été prélevés dans la région de Beni bechir, wilaya de Skikda (Longitude : 6.983°, Latitude : 36.8°, Altitude : 198m), cette commune est située à 13 km de la wilaya de Skikda (**figure 14**).



**Figure 14** : lieu de récolte de la plante.

Les feuilles récoltées ont été nettoyées et débarrassées de la poussière et d'autres impuretés, et ont été découpées en petits morceaux puis elles sont placées dans des sacs en plastique stériles, transportées dans une glacière au laboratoire. L'échantillon étudié a été photographié (**Figure 15**).



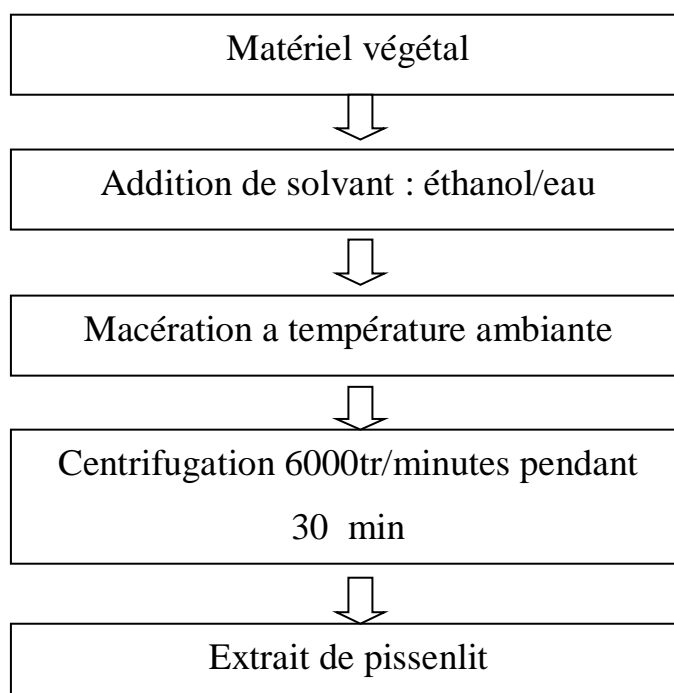
**Figure 15** : feuilles du pissenlit

## 2. Extraction des polyphénols de pissenlit

Les polyphénols sont extraits par macération selon la méthode décrite par **Xiang et Na see (2018)** avec quelques modifications, cette méthode consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs.

La concentration du solvant d'extraction et le temps de macération de l'échantillon ont été optimisés en se référant à des analyses préliminaires et à la bibliographie (**Spigno et al., 2007, Galan et al., 2017, Jovanović et al., 2017**).

La séparation des extraits phénoliques est réalisée par centrifugation à 6000 tour/min pendant 30 min. Les surnageants sont considérés comme extraits des feuilles de pissenlit et ils sont immédiatement utilisés pour effectuer les différents essais (**Figure 16**).



**Figure 16** : Protocole d'extraction des polyphénols (Xiang et Na see,., 2018)

### 3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin- Ciocalteu (FC) décrite par Waterhouse (1999).avec quelques modifications. Le FC est un solution d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange de complexes de sels de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleue.

1ml de chaque extrait est mélangé avec 0,4 mL du réactif Folin-Ciocalteu et 0.8 mL de  $Na_2CO_3$  à 2%. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 2h, la lecture des absorbances est mesurée à 760nm par un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique / g de matière fraîche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique réalisée avec 6 valeurs de concentrations (variant de 0 à 1 mg/ml) Le contenu phénolique total d'extrait a été calculé par la formule suivante:

$$QP = \frac{C_0 V_0 F}{m}$$

Où : **QP** : la teneur en polyphénols en mg EAG/ g de matière fraîche

**m**: la masse de la plante utilisée pour l'extraction

**C0** : la concentration de l'extrait obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg EAG/ml.

**V0** : le volume final de la solution (volume des réactifs + le volume de la solution fille) en ml

**F** : le facteur de dilution=  $V_m / V_f$  dont  $V_m$  est le volume de la solution mère en ml et  $V_f$  est le volume de la solution fille prélevé en ml

### 4. Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par **Dehpour et al., (2009)** avec légères modifications. 0,2 ml de l'extrait est ajouté à 1,72 ml d'éthanol à 96%, 0,4 ml de  $AlCl_3$  à 10% et 0,1 ml d'acide acétique, le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30min. L'absorbance est mesurée à 415nm.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine / g de matière fraîche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

La concentration des composés flavonoïdes a été calculée selon l'équation suivante:

$$QF = \frac{C_0 V_0 F}{m}$$

- Où :
- QF** : la teneur en flavonoïdes en mg EQ/ g de matière fraîche
  - m** : la masse de la plante utilisée pour l'extraction
  - C0** : la concentration de l'extrait obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg EQ/ml
  - V0** : le volume final de la solution (volume des réactifs + le volume de la solution fille) en ml
  - F** : le facteur de dilution=  $V_m / V_f$  dont  $V_m$  est le volume de la solution mère en ml et  $V_f$  est le volume de la solution fille prélevé en ml

### 5. Dosages des tanins

Les tanins se dissocient sous l'effet de la chaleur en milieu acide donnant une coloration spécifique.

1 ml d'extrait de la plante est additionné à un volume de 2 ml du réactif butanol-HCL (77mg FeSO<sub>4</sub> dissouts dans 500ml butanol-HCL (2 ; 3)). Le mélange est ensuite incubé à 95°C pendant 15 minutes et l'absorbance est mesuré à 530 nm. La concentration des tanins est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide tannique et la teneur en tanins est exprimée en mg équivalent acide tannique /g de matière fraîche.

La concentration des tanins est calculée selon l'équation suivant :

$$QT = \frac{C_0 V_0 F}{m}$$

- Où :
- QT**: la teneur en tanins en mg EAT/ g de matière fraîche
  - m**: la masse de la plante utilisée pour l'extraction
  - C0** : la concentration de l'extrait obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg EAT/ml.
  - V0** : le volume final de la solution (volume des réactifs + le volume de la solution fille) en ml
  - F** : le facteur de dilution=  $V_m / V_f$  dont  $V_m$  est le volume de la solution mère en ml et  $V_f$  est le volume de la solution fille prélevé en ml

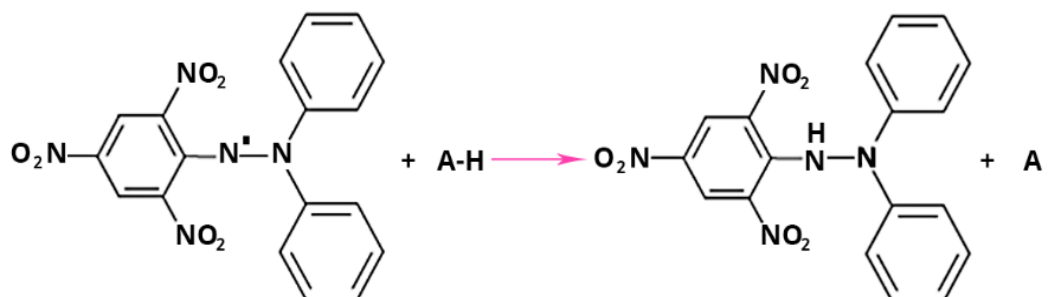
## 6. Evaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes de dosage de la capacité antioxydante totale mesurent la capacité des antioxydants à neutraliser un radical libre. Les antioxydants ont différentes caractéristiques physiques et chimiques. Chaque antioxydant pouvant, dans la plupart des cas, agir de façon différente dans un système simple. De plus, les antioxydants peuvent réagir de manière différente face à différents radicaux ou sources oxydantes (**Prior *et al.*, 2005**). L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode **DPPH**.

### 6.1. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

#### 6.1.1.Principe

L'intérêt du test de DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle) permet de déterminer l'activité anti-oxydante en milieu organique (Blois, 1958). Ce test consiste en la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H (**Figure 17**). En effet, la présence des radicaux DPPH• donne une coloration pourpre foncée à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm. Au cours de la réaction, la colorimétrie de la solution change sous l'effet d'un agent antioxydant qui entraîne la décoloration de la solution (**Armun Hidayat *et al.*, 2017**).



**Figure 17** : Mécanisme d'action du DPPH (Armun Hidayat *et al.*, 2017).

#### 6.1.2.Méthodes

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 6mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Différentes concentrations de solutions échantillons (0-1000ppm) et témoin sont ajoutées à 1,6ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures séparées  $\pm$  écart type.

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante :

$$I\% = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

**A blanc** : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

**A échantillon** : Absorbance du composé d'essai.

Les concentrations d'extrait et d'antioxydants de référence (BHA et BHT), en fonction des pourcentages du DPPH inhibé, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50% (*Sharififar et al., 2007*).

### 7. Optimisation

Un plan d'expérience central composite a été utilisé pour optimiser les deux facteurs (concentration du solvant et temps de macération) sur la réponse notée teneur en polyphénols. Ce plan est basé sur la méthode des surfaces de réponse qui est la plus couramment utilisée dans ce type d'expériences. Il consiste à modéliser les résultats sous la forme de fonctions polynomiales du second degré qui est un modèle quadratique (*Almansoory et al., 2016*).

#### 7.1. Modèle mathématique

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ils sont utilisés pour les variables continues.

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ii} X_i^2 + \sum a_{ij} X_i X_j$$

Avec :

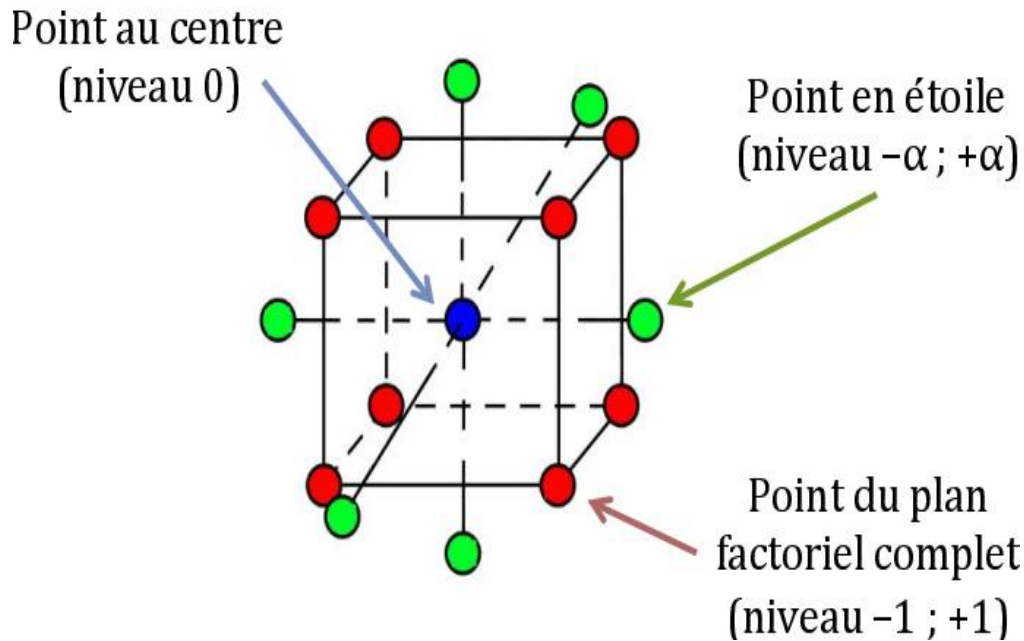
$a_i$  : coefficients de régression des effets linéaires ;

$a_{ii}$  : coefficients de régression des effets quadratiques ;

$X_i$  et  $X_j$  : variables expérimentales codées (*Reddy et al., 2008 ; Almansoory et al., 2016*).

#### 7.2. Niveaux des variables

Nous avons attribué pour chaque variable codée ( $X_i$ ) trois niveaux : -1, 0 et +1. Les  $\pm \alpha$  représentent les valeurs extrêmes (max, min). Pour que le plan soit orthogonal et rotatable, la valeur de  $\alpha$  a été fixée par le logiciel à 1,414 (**figure 18**).



**Figure 18** : Représentation graphique d'un plan d'expérience central composite à deux facteurs ( $X_1$  et  $X_2$ ) et trois niveaux ( $-1$ ,  $0$  et  $+1$ ) avec les valeurs extrêmes  $\pm \alpha$  (Fleury, 2017).

Ce plan d'expérience central composite à deux variables est composé de :

- *Points factoriels* : également appelés points du cube, ils sont codés  $-1$  et  $+1$ ;
- *Points axiaux* : également appelés étoiles, sont à  $+\alpha$ ,  $0$  ;  $-\alpha$ ,  $0$ .
- *Points centraux* : le central du plan est à  $0,0$

Le nombre total d'essais  $n$  à réaliser est la somme des essais de ces trois parties, du plan factoriel ( $nf$ ), du plan en étoile ( $né$ ) et les essais au centre ( $n0$ ).

Donc :  $n = nf + né + n0$  (Sadhukhan *et al.*, 2016).

La relation entre les valeurs codées ( $X_i$ ) des variables entrées et ses valeurs réelles ( $A_i$ ) est décrite par l'équation suivante :

$$X_i = (A_i - A_0) / \Delta A$$

Avec :

$X_i$  : valeur codée du facteur ;

$A_i$  : valeur réelle de ce facteur ;

$A_0$  : valeur réelle du même facteur au niveau central ;

$\Delta A$  : pas entre le niveau central et les niveaux  $\pm 1$  (Goupy, 2006).

### 7.3. Analyse du plan

Dans cette étude, l'analyse des résultats obtenus est réalisée par la méthodologie de réponse en surface avec le logiciel Minitab<sup>®</sup> LLC (Minitab Statistical Software for windows released 2019, version 19.1.1.0 Minitab, LLC sis 1829 Pine Hall Road, State College,

PA, USA). Cette méthode d'optimisation génère des profils en deux dimensions et des surfaces tridimensionnelles à partir des effets linéaires, quadratiques et interactifs de deux ou plusieurs variables indépendantes sur une variable dépendante. Elle y intègre ensuite les données expérimentales pour calculer la réponse optimale du système (**Dey *et al.*, 2001 ;Shih *et al.*, 2002**).

L'identification des valeurs optimales se déroule en plusieurs étapes (Statsoft, 2004). En premier lieu, le logiciel transpose les effets des variables indépendantes et de leurs interactions sur la réponse de la variable dépendante dans un modèle polynomial de second ordre. Le modèle contient les composantes linéaires des variables indépendantes sur une variable dépendante ainsi que les effets interactifs entre chaque variable indépendante (deux à la fois). De plus, des composants quadratiques y sont intégrés afin d'explorer de façon plus approfondie la sous-région de la réponse en surface. Le degré d'importance de chaque variable indépendante sur la réponse de la variable dépendante est évalué par une estimation des effets. Une analyse de régression est également appliquée pour déterminer les coefficients de régression de chaque composante. Les coefficients de régression indiquent si les composantes ont une influence positive ou négative sur la réponse de la variable dépendante. Ils sont alors fixés dans une équation de régression permettant de prédire la réponse de la variable dépendante. La signifiante statistique des effets et des coefficients de régression est évaluée par un test de Student (*t*) et les valeurs de probabilité (*P*) associées.

La seconde étape consiste à identifier le point de la réponse en surface qui définit la courbure de la surface. Ce point correspond aux valeurs optimales locales recherchées. Finalement, l'ANOVA détermine la signifiante du modèle mathématique. Le meilleur modèle est celui qui présente une valeur de sa probabilité de nullité  $\alpha$  est inférieure ou égale 0,05% avec des bons coefficients de détermination.

### **8. Analyse statistique**

Le calcul des moyennes plus ou moins l'écart type des trois répétitions ainsi que les représentations graphiques ont été effectués par Excel 2013 (Microsoft Excel Version 3. 2013, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

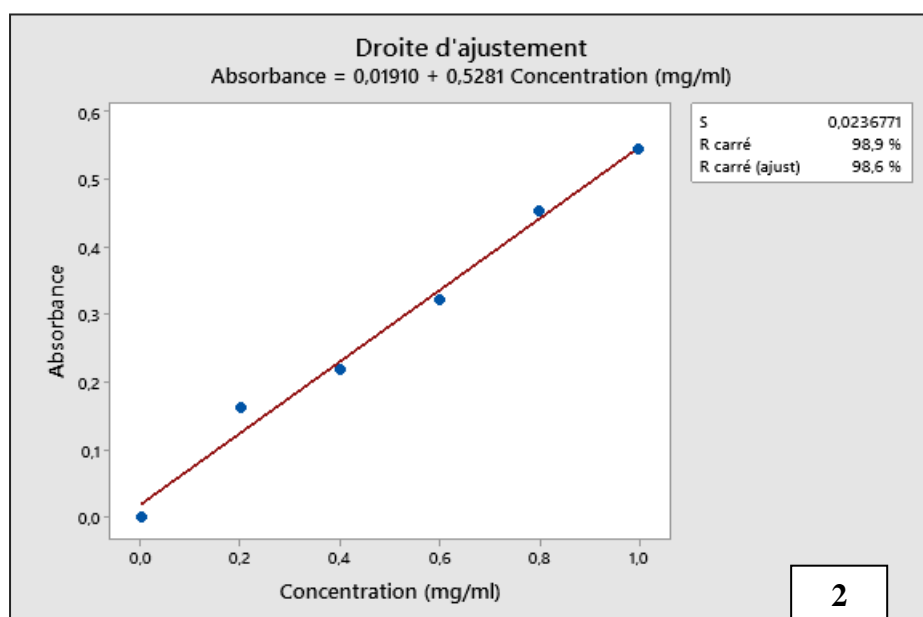
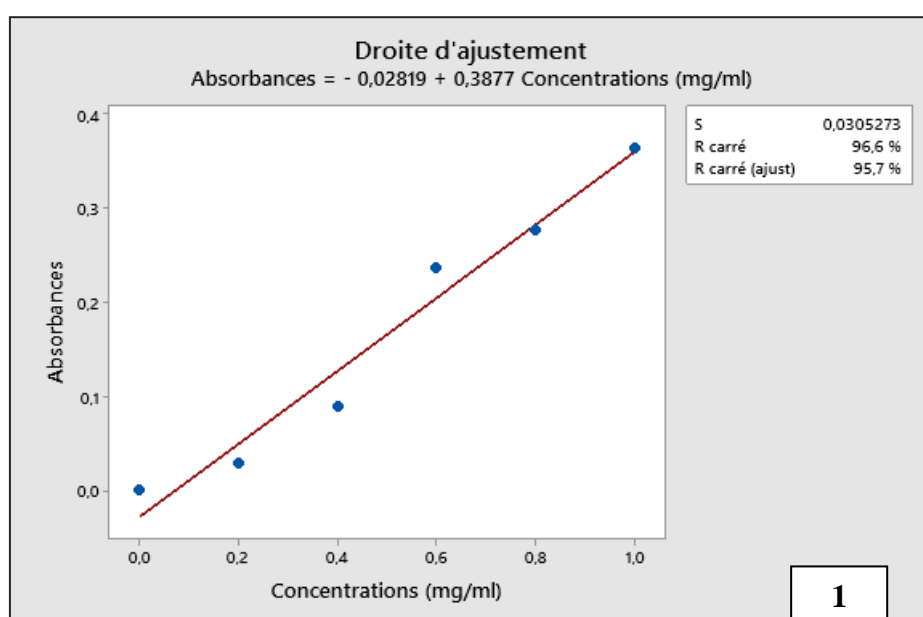
Un test ANOVA à un seul facteur suivi par test *Post hoc* – Tukey a été réalisé à l'aide du logiciel Minitab® LLC (Minitab Statistical Software for windows released 2019, version 19.1.1.0 Minitab, LLC sis 1829 Pine Hall Road, State College, PA, USA) pour comparer moyennes obtenues. Les lettres en exposant ; a, b, c, d indiquent une différence significative au seuil de signification 0,05.

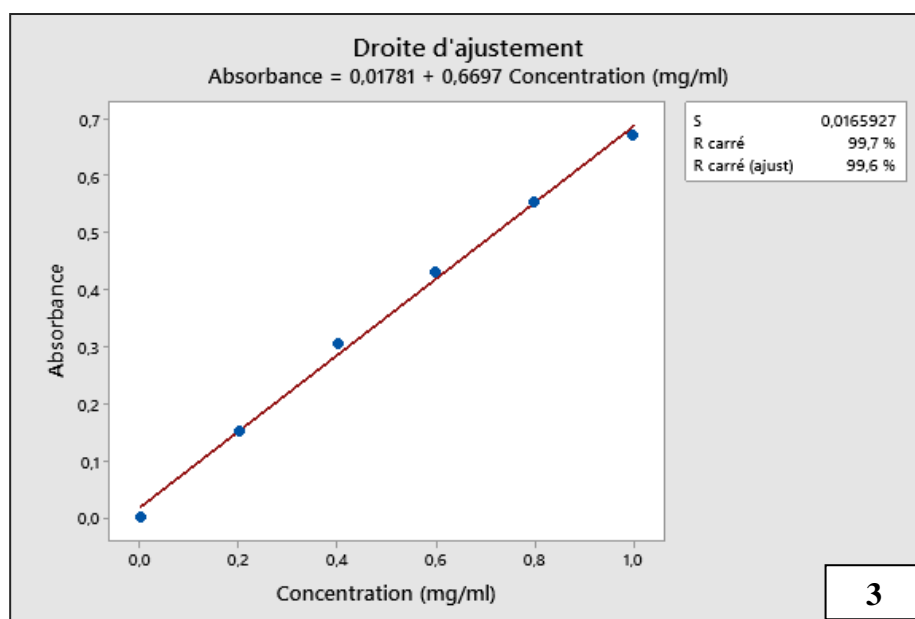
## **Résultats et discussion**

## 1. Teneurs en composés phénolique des feuilles fraîches de pissenlit

### 1.1. Les courbes d'étalonnage

Les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins ont été calculées en se basant sur les courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine et l'acide tannique respectivement. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) pour le dosage des polyphénols totaux, en milligramme équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) pour le dosage des flavonoïdes et en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS) pour les tanins (**Figure 19**).





**Figure 19** : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) : 1 : Acide gallique ; 2 : Quercétine ; 3 : Acide tannique

### 2. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux de pissenlit

La matrice des essais du plan composite centré et les réponses obtenues sont mentionnées dans le tableau 02.

**Tableau 02** : Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux en polyphénols totaux de pissenlit

N° d'essai	Niveaux du facteur concentration du solvant	Niveaux du facteur Temps de macération	Taux des polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait sec)
1	0	0	10,7818
2	-1	1	10,1130
3	-1	-1	7,6909
4	0	0	5,4506
5	1	-1	10,7818
6	1	1	13,4896
7	0	0	7,9961
8	-1,414	0	5,5026
9	0	0	12,2429
10	1,414	0	10,7818

11	0	-1,414	10,7818
12	0	0	10,7818
13	0	1,414	5,6325

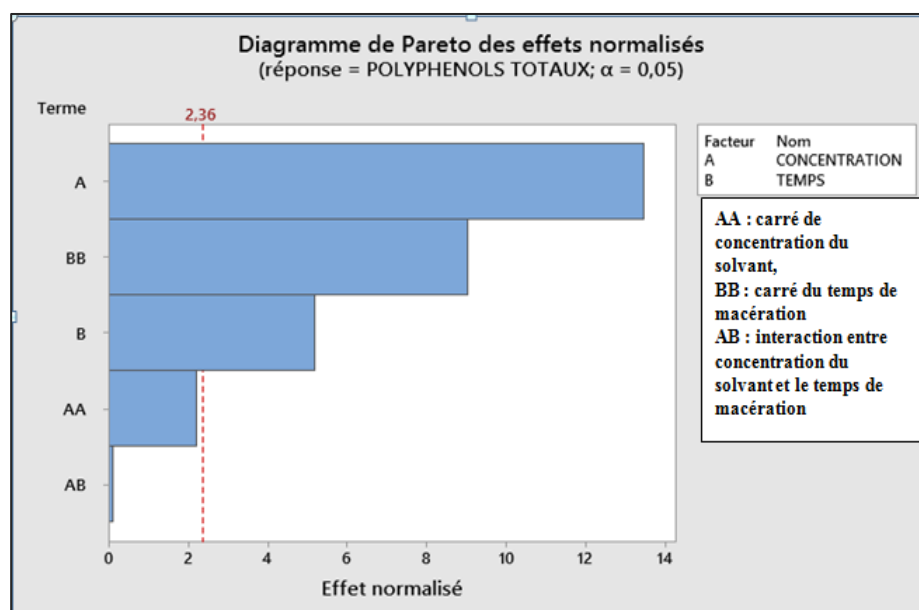
L'analyse de variance partitionne la variabilité de taux des polyphénols totaux pour chacun des effets. La valeur-p est inférieure à 0,05 ce qui signifie que le modèle est significatif. Le  $R^2$  de détermination indique le modèle explique plus de 97.64% de la variabilité de la réponse. L'équation polynomiale quadratique pour la réponse taux des polyphénols totaux est:

$$\text{Polyphénols totaux} = -26,57 + 0,529 \text{ CONCENTRATION} + 0,4585 \text{ TEMPS} - 0,00220 \text{ CONCENTRATION*CONCENTRATION} - 0,005845 \text{ TEMPS*TEMPS} + 0,00007 \text{ CONCENTRATION*TEMPS}$$

L'analyse de variance montre que les effets des linéaires des facteurs A, B et l'effet du terme quadratique BB ont des effets significatifs ( $P < 0,05$ ).

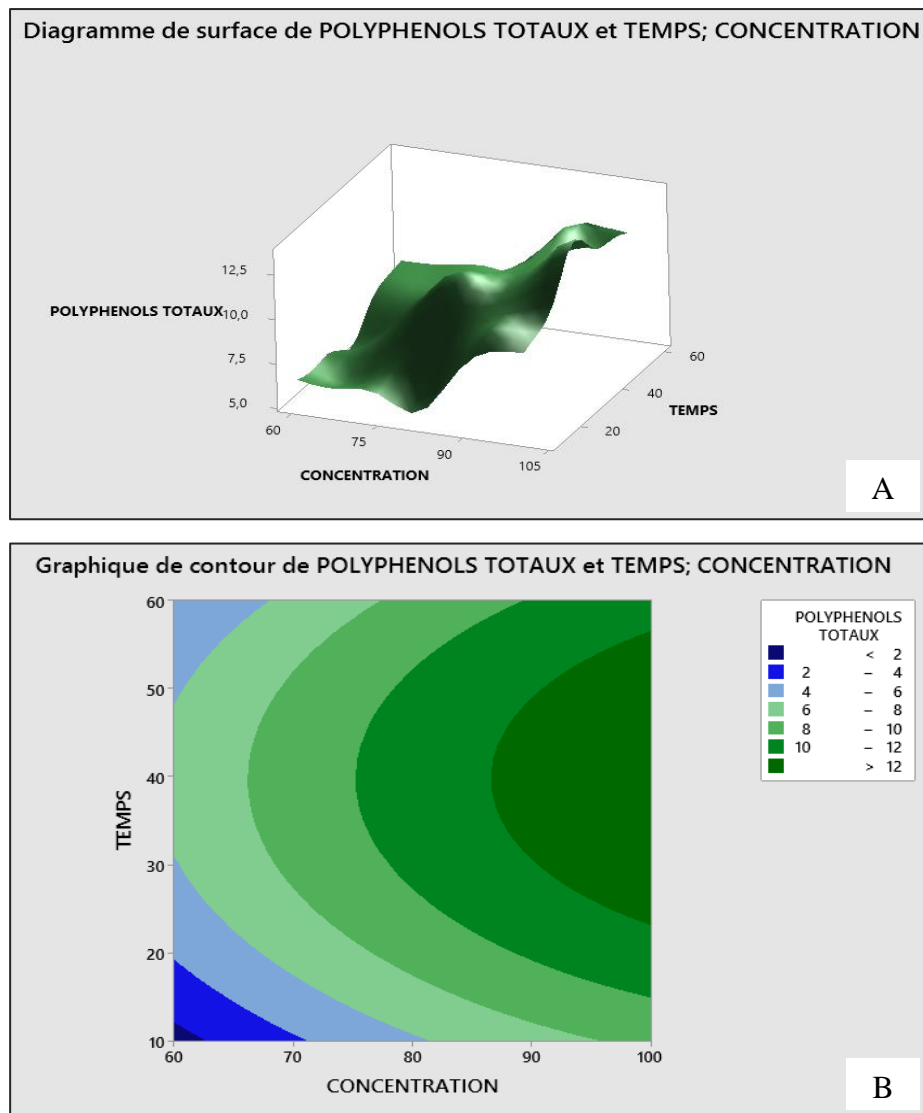
Les effets du terme quadratique AA et l'interaction à deux facteurs AB ne sont pas significatifs pour ce modèle ( $P > 0,05$ ).

Le diagramme de *Pareto* (Figure 20) démontre que l'effet de la concentration de solvant et le terme quadratique du temps de macération ont l'effet le plus important suivi par l'effet linéaire du temps de macération.



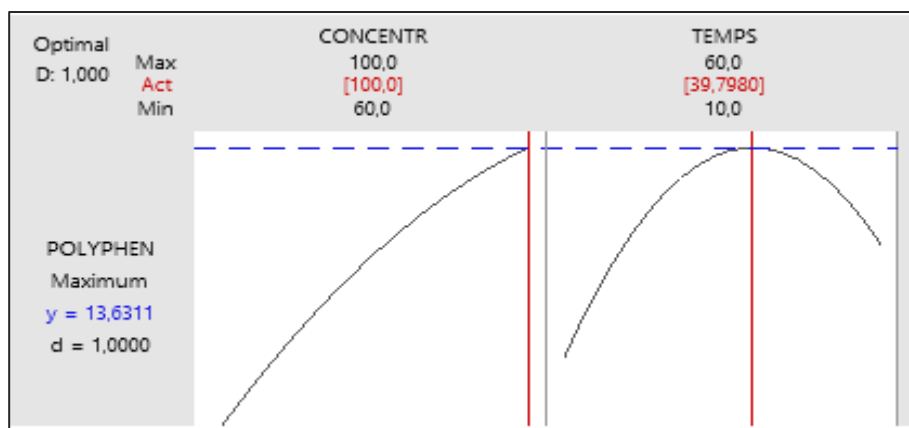
**Figure 20 :** Diagramme de *Pareto* des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des polyphénols totaux de Pissenlit.

Le diagramme de surface de réponse et le graphique de contour qui illustrent l'évolution de la réponse (taux de polyphénols totaux) en fonction des niveaux des deux facteurs (concentration de solvant et temps de macération) sont illustrées dans la **figure 21**



**Figure 21** : Surface de réponse du taux des polyphénols totaux de Pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour

Selon la figure 22 les valeurs optimales du taux des polyphénols totaux se situent dans la zone verte limitée par les points : Concentration du solvant (88-100 %) et temps de macération (25-55 min). La courbe de désirabilité permet de réaliser des simulations des conditions opératoires à fin de maximiser le taux des polyphénols totaux. Le maximum de précision est obtenu pour une désirabilité égale ou proche de 1 (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'extraction des polyphénols totaux de Pissenlit en fonction de la désirabilité 1

La prédiction des conditions optimales sont : concentration du solvant (100%) et temps de macération (39,79min). (**Tableau 03**)

Points	Taux de polyphénols totaux max (mg EAG/g d'extrait sec)
(100% , 39.79min)	13,6311

### 3. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes de pissenlit

La matrice des essais du plan composite centré et les réponses obtenues sont mentionnées dans le tableau 04

**Tableau 04 :** Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux en flavonoïdes de pissenlit

N° d'essai	Niveaux du facteur concentration du solvant	Niveaux du facteur Temps de macération	Taux des flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait sec)
1	0	0	8,7263
2	-1	1	3,0919
3	-1	-1	1,4985
4	0	0	6,5142
5	1	-1	8,7263
6	1	1	9,2016
7	0	0	4,4437
8	-1,414	0	6,8419

9	0	0	10,0095
10	1,414	0	8,7263
11	0	-1,414	8,7263
12	0	0	8,7263
13	0	1,414	6,3589

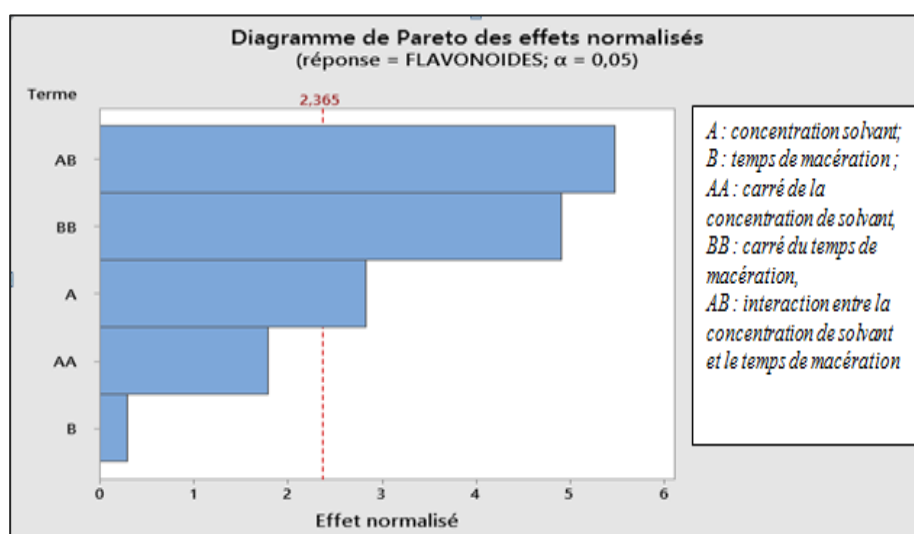
L'analyse de variance partitionne la variabilité de taux des flavonoïdes pour chacun des effets. Le modèle est significatif ( $P < 0,05$ ) et présente un  $R^2$  élevé (90,03%). L'équation polynomiale quadratique pour la réponse taux des flavonoïdes est :

$$\text{Flavonoïdes} = 4,6 + 0,248 \text{ CONCENTRATION} - 0,500 \text{ TEMPS} - 0,00365 \text{ CONCENTRATION*CONCENTRATION} - 0,00640 \text{ TEMPS*TEMPS} + 0,01178 \text{ CONCENTRATION*TEMPS}$$

L'analyse de variance montre que les effets du terme quadratique du temps de macération (BB), l'interaction à deux facteurs (AB) et l'effet linéaire de la concentration du solvant (A) ont des effets significatifs ( $P < 0,05$ ).

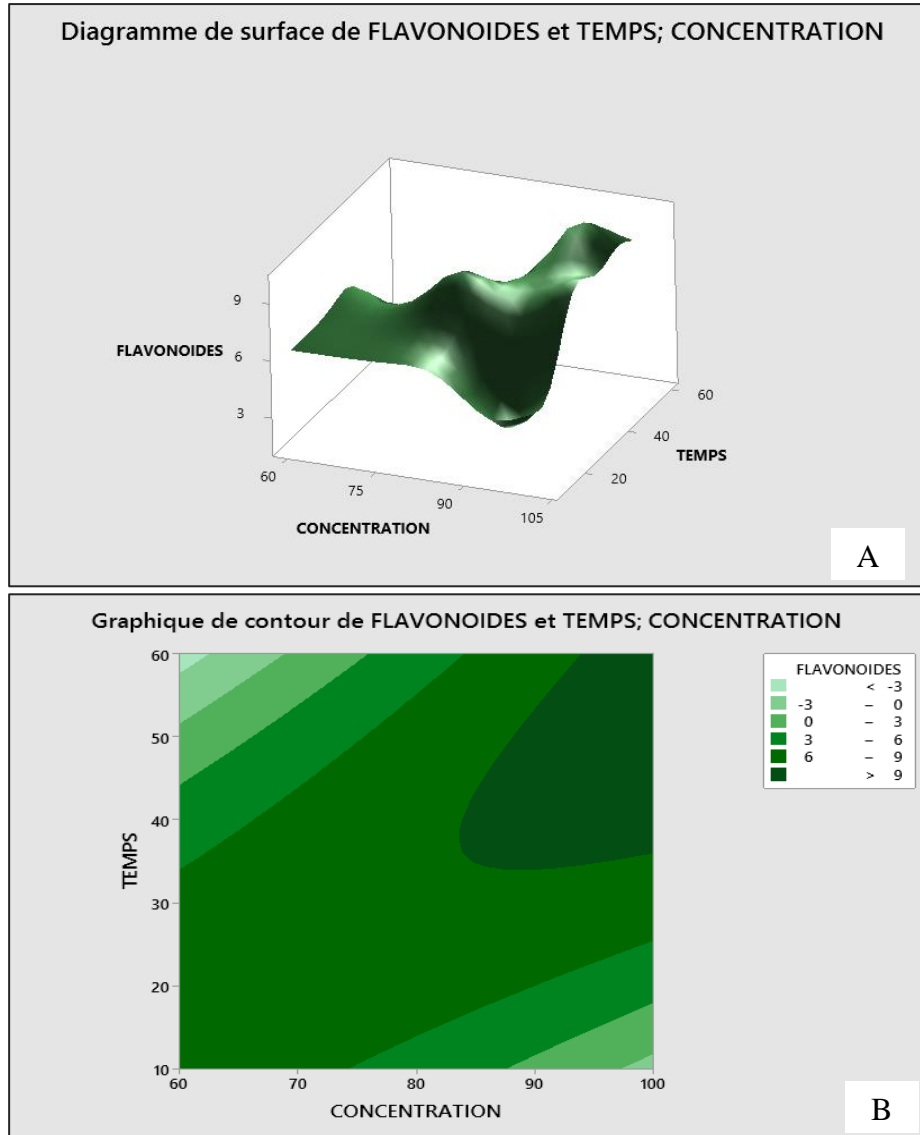
L'effet linéaire du facteur temps de macération (B) et le terme quadratique de la concentration du solvant (AA) ne sont pas significatifs pour ce modèle ( $P > 0,05$ ).

Le diagramme de *Pareto* (**Figure 23**) confirme que le taux des flavonoïdes dépend principalement de l'effet de l'interaction entre le temps de macération et la concentration du solvant suivi par le terme quadratique du temps de macération puis par l'effet linéaire du temps de macération.



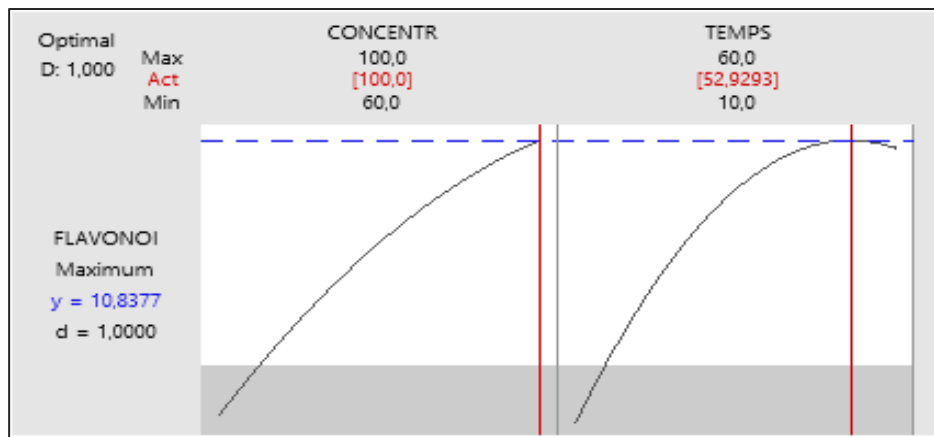
**Figure 23 :** Diagramme de *Pareto* des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des flavonoïdes de Pissenlit.

Le diagramme de surface de réponse et le graphique de contour qui illustrent l'évolution de la réponse taux de flavonoïdes en fonction des niveaux des deux facteurs (concentration de solvant et temps de macération) sont illustrées dans la figure 24.



**Figure 24 :** Surface de réponse du taux des polyphénols de Pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour

Selon la figure 24 les valeurs optimales du taux des polyphénols totaux se situent dans la zone verte limitée par les points : Concentration du solvant (85-100%) et temps de macération (35-60min). La courbe de désirabilité permet de réaliser des simulations des conditions opératoires à fin de maximiser le taux des polyphénols. Le maximum de précision est obtenu pour une désirabilité égale ou proche de 1 (**Figure 25**).



**Figure 25 :** Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour maximiser la teneur des flavonoïdes du Pissenlit en fonction de la désirabilité 1.

La prédiction des conditions optimales sont : concentration du solvant (100%) et temps de macération (52.92min). (**Tableau 05**)

Points	Taux de flavonoïdes max (mg EQ/g d'extrait sec)
(100% - 52.92 min)	10,8377

#### 4. Modélisation et optimisation des conditions d'extraction des Tanins de pissenlit

La matrice des essais du plan composite centré et les réponses obtenues sont mentionnées dans le tableau 06.

**Tableau 06 :** Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation du taux des tanins de Pissenlit

N° d'essai i	Niveaux du facteur concentration du solvant	Niveaux du facteur Temps de macération	Taux des tanins (mg EAT/g d'extrait sec)
1	0	0	7,51755
2	-1	1	5,18745
3	-1	-1	4,61987
4	0	0	7,11426
5	1	-1	7,51755
6	1	1	3,64974
7	0	0	4,58252
8	-1,414	0	4,27633

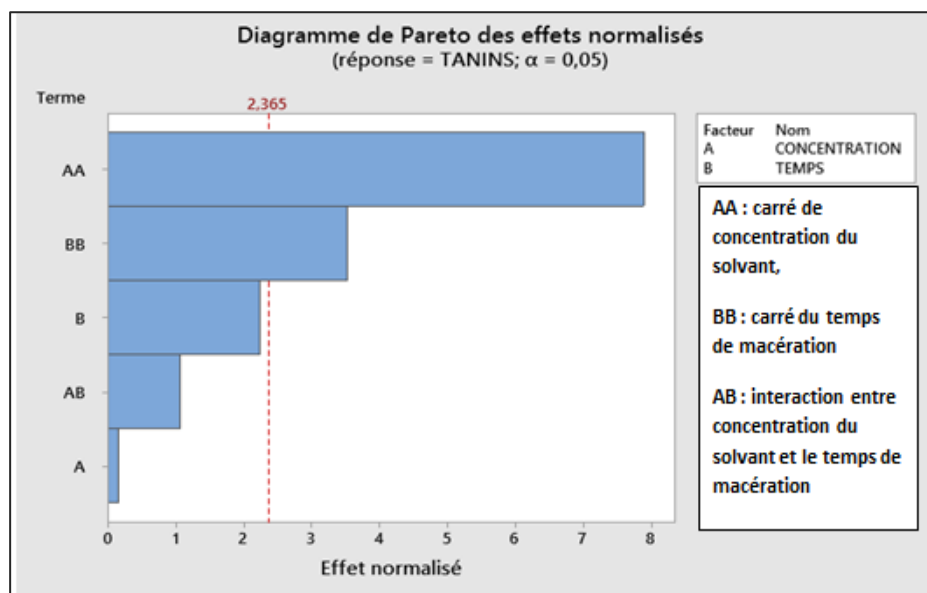
9	0	0	5,78118
10	1,414	0	7,51755
11	0	-1,414	7,51755
12	0	0	7,51755
13	0	1,414	5,22479

L'analyse de la variance a partitionné la variabilité de taux des tanins pour chaque effet. Le modèle est significatif ( $P < 0,05$ ), et présente un  $R^2 = 91,41\%$ . L'analyse de variance montre que les effets du terme quadratique AA et BB ont des effets significatifs ( $P < 0,05$ ).

Les effets des linéaires des facteurs A, B et les l'interaction à deux facteurs AB ne sont pas significatifs ( $P > 0,05$ ) pour ce modèle. L'équation polynomiale pour la réponse taux des tanins est :

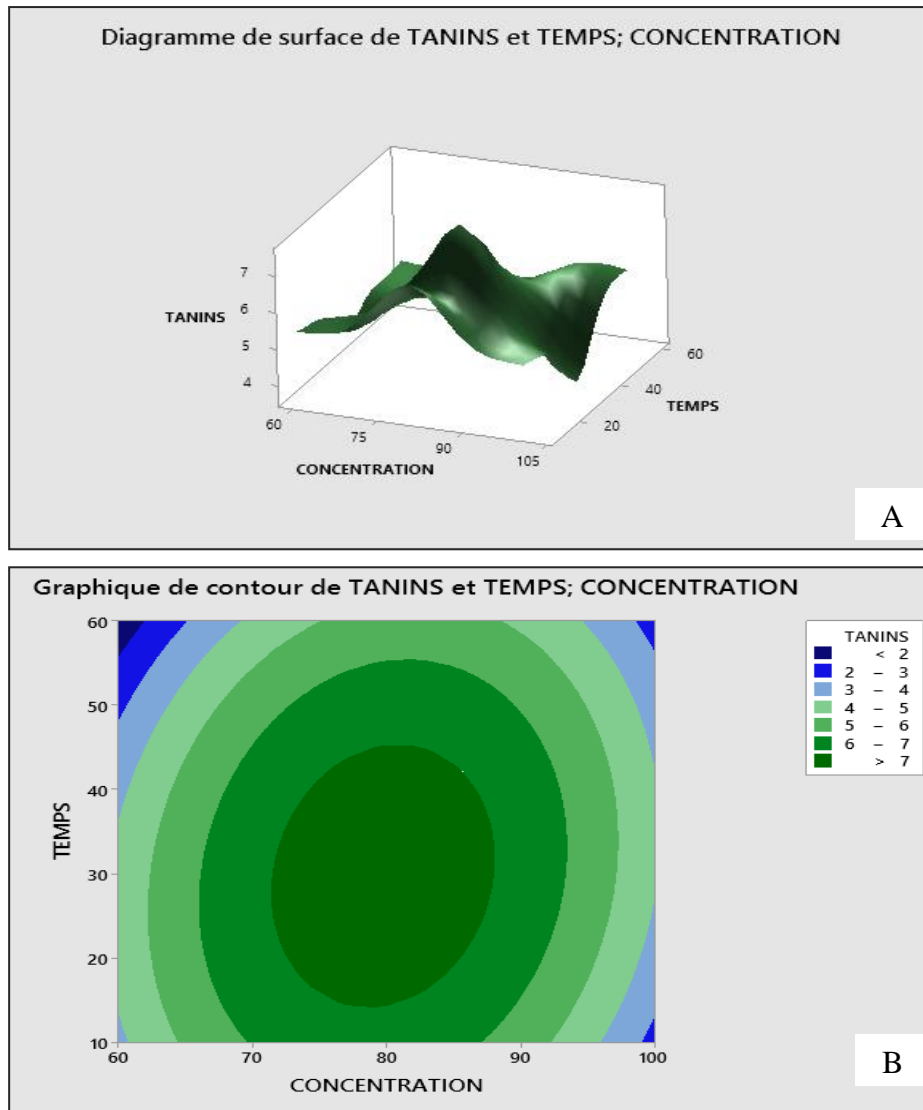
$$\text{Tanins} = -45,88 + 1,322 \text{ CONCENTRATION} + 0,049 \text{ TEMPS} - 0,00851 \text{ CONCENTRATION*CONCENTRATION} - 0,002433 \text{ TEMPS*TEMPS} + 0,00120 \text{ CONCENTRATION*TEMPS}$$

Le diagramme de Pareto montre que le taux des tanins dépend principalement de l'effet du deux termes quadratiques AA et BB (**figure 26**)



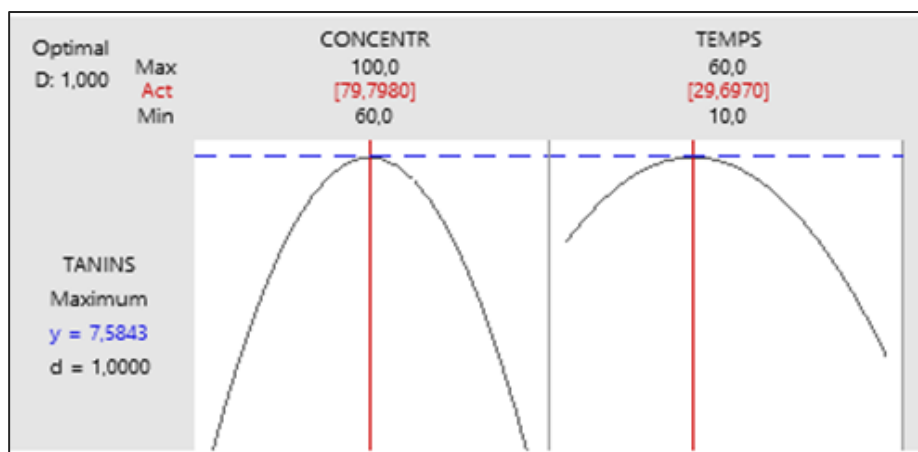
**Figure 26 :** Diagramme de Pareto des effets (linéaires, quadratiques et interactif) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'extraction des Tanins de Pissenlit.

Le diagramme de surface de réponse et le graphique de contour qui illustrent l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des deux facteurs ( concentration de solvant et temps de macération) sont illustrées dans la figure 27.



**Figure 27:** surface de réponse du taux des tanins de pissenlit en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour.

Selon la figure 27 les valeurs optimales du taux tanins se situent dans la zone verte foncée limitées par les points : Concentration du solvant ( 74-86%) et temps de macération ( 14-45 min) . La courbe de désirabilité permet de réaliser des simulations des condition opératoire à fin de maximiser le taux des tanins . Le maximum de précision est obtenu pour une désirabilité égale ou proche de 1 ( **Figure 28**).



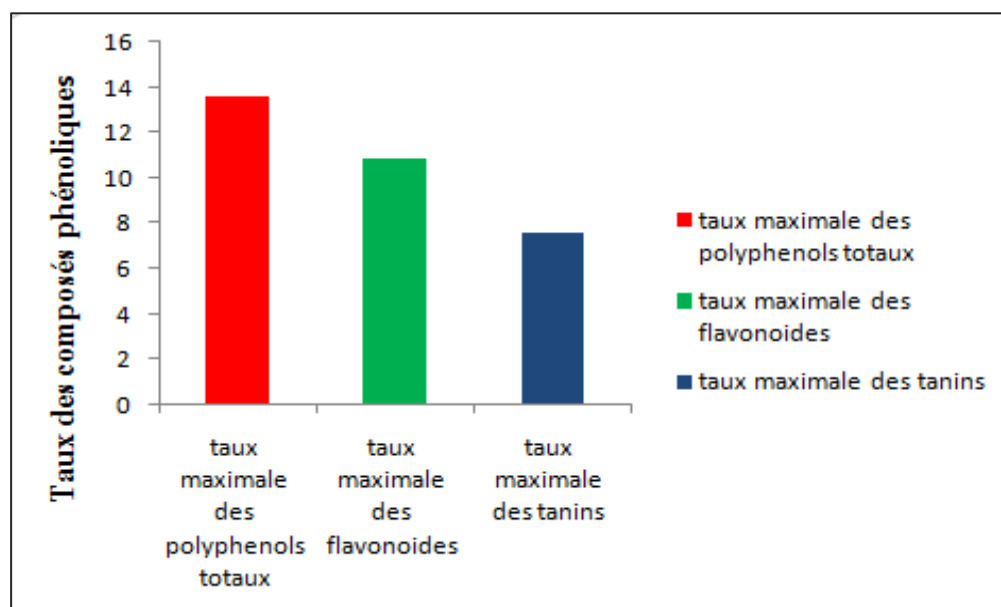
**Figure 28** : optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'extraction des tanins de pissenlit en fonction de la désirabilité 1

La prédiction des conditions optimales sont : concentration du solvant (79,79%) et temps de macération (29,69 min). (**Tableau 07**)

points	Taux de tanins max (mg EAT/g d'extrait sec)
(79,79% ; 29,69min)	7,5843

## 5. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de pissenlit :

Les teneurs des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de pissenlit sont illustrées dans la **Figure 29**.



**Figure 29** : Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins des feuilles fraîches de pissenlit

Les résultats obtenus montrent que les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins sont : 13,6311 mg EAG/g de matière sèche, 10,8377 mg EQ/g et 7,5843 mg EAT/g respectivement.

### 6. Discussion

#### 6.1. Teneurs en polyphénols totaux :

Les extraits de pissenlit ont révélé une quantité considérable de polyphénols totaux équivalent à 13,6311 mg EAG /g. En comparant notre résultat avec d'autres travaux du même contexte on trouve que notre valeur est supérieure à celle de **Jingwen et al. (2021)** et de **Aremu et al. (2019)** qui ont rapporté que les teneurs en polyphénols totaux de pissenlit sont ( $8,93 \pm 0,34$  mg EAG /g ;  $4,35 \pm 0,15$  mg EAG /g) respectivement, et inférieure de celle de **Akhtar et al. 2022** qui ont trouvé une teneur de polyphénols totaux des extraits méthanoliques de pissenlit égale à  $178,27 \pm 17,17$  mg EAG /g ,

En outre, **Aabideen et al. (2020)** qui ont fait une extraction assistée par ultrasons des extraits hydro-éthanolique de *taraxacum officinale* ont trouvé une teneur de 69,42 mg EAG /g.

De même, une étude faite par **Apure et al. (2022)** a enregistré un taux de polyphénols totaux presque équivalent à notre résultat  $\approx 13,15 \pm 0,81$  mg EAG /g.

#### 6.2. Teneurs en flavonoïdes :

Les résultats de notre étude ont indiqué un taux maximal de teneur en flavonoïdes estimé de 10,8377 mg EQ/g.

D'après l'étude de **Carrasco et al. (2015)** qui a analysé des extraits des différentes parties de pissenlit par HPLC, une grande variation des composés phénoliques a été détectée dont les flavonoïdes les plus courants sont les 7-O-glycosides de l'apigénine et de la lutéoline. Leur concentration varie entre les feuilles et les racines, les extraits des feuilles contiennent une quantité plus élevée : 28,32 mg/g d'extrait sec. Celle-ci est supérieure au taux qu'on a obtenu.

Dans le travail de **Jingwen et al. (2021)** les racines de pissenlit ont été extraites par différents solvants : l'eau distillée, le méthanol, l'éthanol, le n-hexane et l'acétate d'éthyle. Les teneurs en flavonoïdes totaux étaient de :  $2,57 \pm 0,06$  ;  $5,31 \pm 0,18$  ;  $10,03 \pm 0,24$  ;  $8,53 \pm 0,04$  et  $7,90 \pm 0,27$  (mg/g) respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celle obtenue dans notre étude.

Les teneurs en flavonoïdes enregistrées par **Aremu et al. (2019)** et **Akhtar et al. (2022)** sont de 23,2 mg EQ/g et  $18,50 \pm 1,64$  mg EQ/g.

#### 6.3 Teneurs en tanins

Plusieurs études ont montré que les tanins font partie de la composition chimique du pissenlit **Akhtar et al. (2022)** et **Marcus et al. (2019)**.

Par contre l'étude de **kassimi et al. (2013)** a indiqué l'absence des tanins dans l'extrait de *Taraxacum officinale*.

La teneur maximale qu'on a obtenu est de 7.584 mg EAT/g d'extrait sec ce résultat est relativement faible par rapport à ce enregistré par **Ciucure et al. (2016)** qui ont trouvé des quantités allant de 4.4549 g / 100 g to 89.5833 g / 100g.

Cette variabilité entre les taux maximaux des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins de notre plante et les résultats des autres études qui ont été réalisées dans ce contexte pourrait être due à la méthode d'extraction (directe ou successive), les différents types de solvants d'extraction utilisés, à la nature de la matière végétale ou à des facteurs intrinsèques tels que le climat et la nature du sol et la saison de récolte des échantillons (**Kouamé et al., 2021**).

### 7. Modélisation et optimisation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de pissenlit par la méthode DPPH

La matrice des essais du plan composite centré et les réponses obtenues sont mentionnées dans le tableau 08

**Tableau 08 :** Matrice d'essais du plan composite centré pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de pissenlit

N° d'essai	Niveaux du facteur concentration du solvant	Niveaux du facteur Temps de macération	Valeurs IC <sub>50</sub> (mg/ml)
1	0	0	0,136277
2	-1	1	0,250000
3	-1	-1	0,110000
4	0	0	0,111000
5	1	-1	0,113000
6	1	1	0,360000
7	0	0	0,160000
8	-1,414	0	0,120000
9	0	0	0,125000
10	1,414	0	0,109000
11	0	-1,414	0,113000
12	0	0	0,119000
13	0	1,414	0,132000

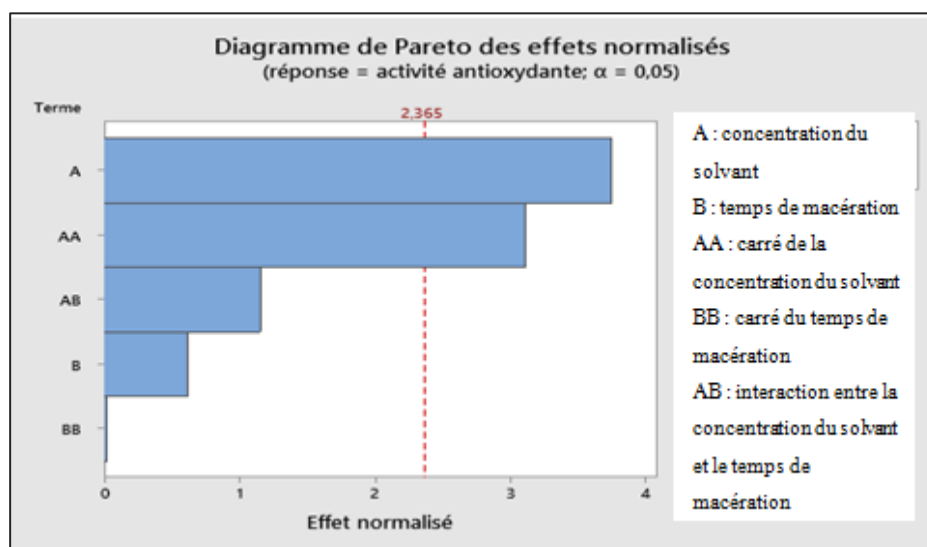
L'analyse de variance partitionne la variabilité des valeurs d'IC50 pour chacun des effets. Le modèle de régression obtenu est significatif ( $P = 0,001$ ) et présente un  $R^2$  de 78,55%. L'équation polynomiale quadratique pour la réponse de l'activité antioxydante est :

$$\text{Activité antioxydante} = 1,199 - 0,0343 \text{ CONCENTRATION} + 0,00761 \text{ TEMPS} + 0,000263 \text{ CONCENTRATION*CONCENTRATION} + 0,000001 \text{ TEMPS*TEMPS} - 0,000103 \text{ CONCENTRATION*TEMPS}$$

L'analyse de variance montre que les effets du terme linéaire de la concentration du solvant (A) et l'effet du terme quadratique de la concentration du solvant (AA) ont des effets significatifs ( $P < 0,05$ ).

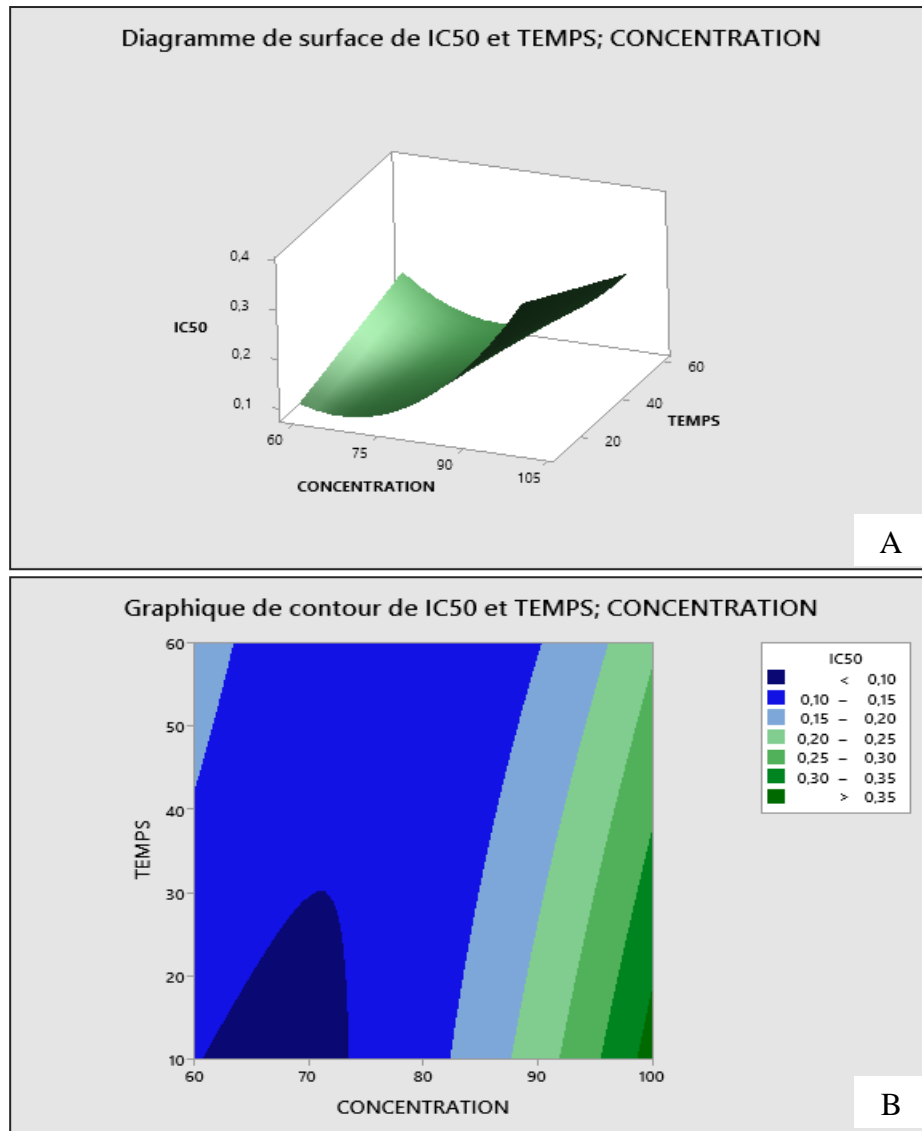
Les effets de l'interaction à deux facteurs AB, l'effet du terme quadratique BB et l'effet linéaire du facteur temps de macération (B) ne sont pas significatifs pour ce modèle ( $P > 0,05$ ).

Le diagramme de *Pareto* (Figure 30) démontre que l'effet de la concentration du solvant et le terme quadratique de la concentration du solvant ont l'effet le plus important sur l'activité antioxydante des composés phénoliques du pissenlit.



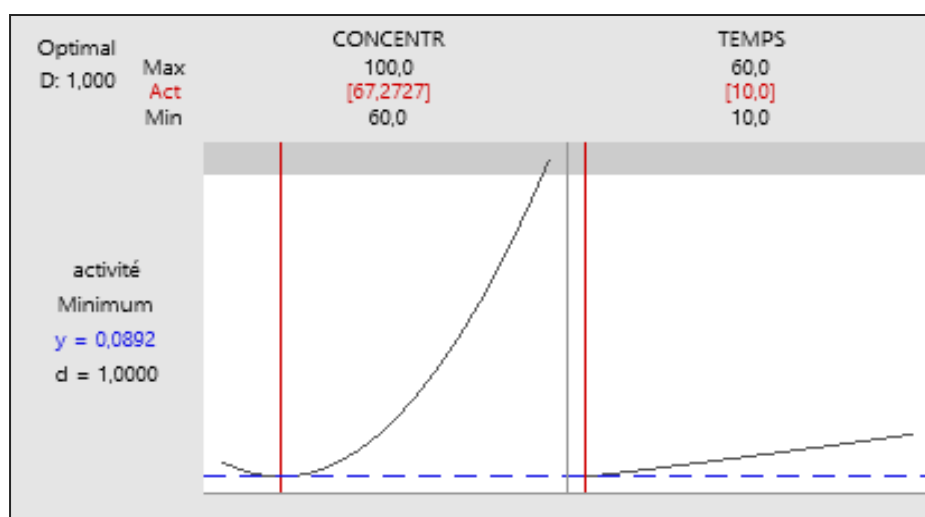
**Figure 30 :** Diagramme de *Pareto* des effets (linéaires, quadratiques et interactifs) normalisés ( $p=0,05$ ) des conditions d'évaluation de l'activité antioxydante.

Le diagramme de surface de réponse et le graphique de contour qui illustrent l'évolution de la réponse (activité antioxydante) en fonction des niveaux des deux facteurs (concentration de solvant et temps de macération) sont illustrés dans la (Figure 31)



**Figure 31 :** Surface de réponse de l'activité antioxydante en fonction de la concentration du solvant et le temps de macération. A : diagramme de surface ; B : graphique de contour.

Selon la figure 31 les valeurs minimales de l'IC50 se situent dans la zone bleu limitée par les points : Concentration du solvant (62-75 %) et temps de macération (10-30 min). La courbe de désirabilité permet de réaliser des simulations des conditions opératoires à fin de minimiser la valeur d'IC50. Le minimum de précision est obtenu pour une désirabilité égale ou proche de 1 (**Figure 32**).



**Figure 32 :** Optimisation de la concentration du solvant et du temps de macération pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

La prédiction des conditions minimales sont : concentration du solvant (67.27%) et temps de macération (10 min). (**Tableau 09**)

Points	Valeur d'IC50 (mg/ml)
(67.27%, 10min)	0.0892

### 8. Discussion

Les résultats de l'activité antioxydante sont exprimés par la valeur d'IC50 (mg/ml) cette valeur a été comparé avec les IC50 des antioxydants de référence BHT et BHA mentionnés dans le **tableau 10**.

**Tableau 10 :** les valeurs d'IC50 de pissenlit, BHA et BHT

	Les valeurs d'IC50 (mg/ml)
Extrait de pissenlit	0.0892 <sup>a</sup>
BHA	0.09 <sup>a</sup>
BHT	0.1 <sup>a</sup>

L'analyse Anova montre qu'il n'y a aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) entre l'IC50 de l'extrait de pissenlit et les antioxydants de référence (BHA et BHT). D'après ces résultats, il est clair que notre échantillon présente une forte activité antioxydante.

Une étude faite par Carrasco *et al.* (2015) indique que les feuilles de pissenlit ont une activité antioxydante forte par rapport aux racines avec des IC50 de (1.9 µg/mL et 12.6

µg/mL) respectivement. Cependant, **Akhtar et al. (2022)** ont effectué un test DPPH pour évaluer l'activité antioxydante en utilisant trois solvants : méthanol, acétone et le n-hexane.

Les résultats ont révélé que tous les extraits possèdent un potentiel antioxydant significatif avec des IC50 suivant : extrait méthanolique (32.80 µg/ml) > extrait acétone (42.63 µg/ml) > extrait n-hexane (60 µg/ml). Toutes ces valeurs rapportées sont supérieures à celle obtenue dans notre étude (0.0892 mg/ml).

En outre, **Aabideen et al. (2020)** ont trouvé une forte activité antioxydante des feuilles de *Taraxacum officinale*. Ce pouvoir antioxydant est lié à la forte teneur en composés phénoliques de cette plante. Egalement, ils ont rapporté une IC50 de 0.091 (mg/ml). Ce résultat est inférieur à ce obtenu dans notre travail.

Plusieurs études sur les Asteraceae ont rapporté une forte activité antioxydante, cette dernière est liée essentiellement à la présence des taux élevés en polyphénols. Les composés phénoliques sont bien connus comme de bons piègeurs des radicaux libres en raison de leur capacité à donner des électrons (**Xue et al., 2017 ; Trinh et al., 2020**).

De même, **Indradi et al. (2017)** ont étudié la corrélation entre les teneurs totales en flavonoïdes et en composés phénoliques et l'activité antioxydante de quatre plantes Asteraceae. Les résultats obtenus ont montré une corrélation négative entre les composés phénoliques et les IC50. Par contre aucune corrélation significative n'a été signalée entre les flavonoïdes totaux et l'IC50.

Le pouvoir antioxydant dépend de la structure chimique des composés phénoliques. Les flavonoïdes avec une substitution di-OH en C3 et C4 donnent les propriétés antioxydantes les plus fortes suivi par ceux qui ont une double liaison C2 et C3 et une substitution -OH en C3.

Ces différences de potentiel antioxydant à piéger les radicaux libres pourraient être dues à l'espèce végétale et à leur richesse en divers composés bioactifs (**Bamba et al., 2021**), la biodisponibilité des polyphénols, la variabilité des méthodes de détermination du pouvoir antioxydant (DPPH, ABTS, FRAP), la concentration et le type de solvant utilisé pour avoir l'extrait de la plante et la concentration du DPPH (**Diallo, 2019**).

# **Conclusion**

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser l'éco-extraction des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins) et l'activité antioxydante des feuilles de pissenlit *Taraxacum officinale*.

Un plan composite centré à deux facteurs (concentration de solvant et temps de macération) a été utilisé pour l'optimisation des teneurs des composés phénoliques et l'activité antioxydante de pissenlit *Taraxacum officinale*.

Les taux des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins de la plante ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques et l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode DPPH.

Les valeurs optimales obtenues pour les polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins sont de 13,6311 mg EAG /g, 10, 8377 mg EQ/g, 7.584 mg EAT/g, respectivement. Une forte activité antioxydante a été enregistrée avec un IC50 de 0.0892 mg/ml.

Ces résultats pourraient servir comme données préliminaires à des analyses futures concernant l'optimisation des teneurs des composés phénoliques et leurs activités biologiques

Mais, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour :

- Elargir le cadre d'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques en utilisant d'autres méthodes d'extraction et des études d'effets sur d'autres parties de la plante d'autres paramètres tels que : granulométrie, rapport solide/liquide.
- Développer l'activité antioxydante in vitro et in vivo et pourquoi pas faire d'autres tests biologiques : anti-tumoral, anticancéreux, anti-inflammatoire, anti-diabétique, anti-coagulant, etc.
- Identifier les principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques et déterminer les conditions optimales d'extraction de ces principes actifs.

**Références  
bibliographiques**

- Aabideen Z. U., Mumtaz M. W., Akhtar M. T., Mukhtar H., Raza S. A., Touqeer T., Saari. N. (2020). Anti-Obesity Attributes; UHPLC-QTOF-MS/MS-Based Metabolite Profiling and Molecular Docking Insights of *Taraxacum officinale*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(21), 4935.
- Achika J. I., Arthur D. E., Gerald I., Adedayo A. (2014). A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. *IOSR J ApplChem*, 7(8), 01-08.
- Akroum S. (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université Mentouri de Constantine-Algérie
- Almansooriya A.F., Abu Hasanb H., Idrisa M., Sheikh Abdullah S. R., Anuarb N., Musa Tibind E. M. (2017). Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratiamarcescens*: Optimization using central composite design (CCD). *J. Indus. and Engin. Chem.*, 47(25), 272-280.
- Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Trinajstic N. (2003). Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemical Acta*, 76.
- Anderson J., Baird P., Davis R., JR., Ferreri S., Knudtson M., Koraym A., Waters V., Williams C. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr. Rev.*, 67, 188–205.
- Aremu O.O., Oyedeji A.O., Oyedeji O.O., Nkeh-Chungag B.N., Rusike .(2019). CRS. In Vitro and In Vivo Antioxidant Properties of *Taraxacum officinale* in N $\omega$ -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME)-Induced Hypertensive Rats. *Antioxidants* (Basel), 15,8(8),309
- Baba-Aissa K. (2011). L'effet comparé de deux bio pesticides formulés sur Tutaabsoluta et sur une gamme de champignons phytopathogènes. Magister Université Blida-Algérie
- Badens E. (2012). Mise en forme de principes actifs pharmaceutiques en phase supercritique. Les techniques de l'Ingénieur, hal-01300400
- Bakhtiari M., Panahi Y., Ameli J., Darvishi B. (2017). Pectective effects of flavonoids against Alzheimer's disease- related neural dysfunctions. *Biomed. Pharmacother*, 93 , 218 – 229.
- Balasundram N., Sandram K., Samman S. (2006) .phenolic compounds in plants and agricultural by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential. *Food chemistry*, 99(1) ,191-203
- Bamba B., Benie C. K. D., Ouattara A., Doukourou D. N., Kamou R. K., Ouattara K. (2021). Teneurs en phenols totaux, activités antioxydantes des macérés et décocté des

- feuilles de *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 54-67.
- Benabdejlil B., Dogaru D.V., Poiana M.A., TracaT. I. (2018). Preliminary aspects regarding the antioxidant activity of some unconventional plants for food applications. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 24(4), 311-316
- Bénard C. (2009). Étude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. *Sciences agricoles*. Institut National Polytechnique de Lorraine, Français.
- Benedikt A., Weggler., Frank L. (2020). Dorman in *Separation Science and Technology*, 12, 1-300.
- Benkhigne O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A., Douira A. (2010). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta botánica barcinonensia*, 191-216.
- Bessas A. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, Université Djillali Liabes- Algérie
- Boubekri C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. *eprint\_fieldopt\_thesis\_type\_phd not defined thesis*, Université Mohamed Khider Biskra- Algérie.
- Braun L., Cohen M. (2015). *Herbs and Natural Supplements, Volume 2: An Evidence Based Guide (Vol. 2)*. (4th ed.). Australia: Elsevier Health Sciences, 272-965.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)* Lavoisier, Technique & Documentation, France, p44.
- Burgos-Morón E., Abad-Jiménez Z., Martínez de Marañón A., Iannantuoni F., Escribano-López., I., López-Domènech ., Roldan I. (2019). Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *Journal of clinical medicine*, 4, 8(9), 1385.
- Chaabani E. (2019). Eco-extraction et valorisation des métabolites primaires et secondaires des différentes parties de *Pistacia lentiscus*. Autre. Université d'Avignon, Université de Carthage-Tunisie.
- Chaker I.B. (2021). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Phlomis scirita*. Thèse doctorat, Université Mohamed Boudiaf Msila-Algérie

- Chaouche T.M. (2014). Etude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Analyse par HPLC-SM les extraits les plus actifs. 10.13140/RG.2.2.13202.25281.
- Chemat F., Vian M.A., Cravotto G. (2012). Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (7), 8615-8627
- Cheok C.Y., Hanaa A.K. S., Rabiha Sulaiman. (2014). Extraction and quantification of saponins, *Article in Food Research International*, 59, 9963-9969.
- Cheyrier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 81, 223-229.
- Choi Y., Verpoorte R. (2019). Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*, 26(10), 1016.
- Choi Y.H., Spronsen J.V., Dai Y., Verberne M et al. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. *Plant Physiol.*, 156, 1701–1705.
- Cirillo G., Curcio M., Vittorio O., Iemma F., Restuccia D., Spizzirri U.G., Puoci F., Picci N. (2016). Polyphenol Conjugates and Human Health: A Perspective Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 56, 326–337.
- Ciucure C. T., Şandru D., Lengyel E., Iancu R., Tiş O. (2016). Identification and quantification of tannins and anthocyanins from plants with bioactive potential. *Advances in biotechnology. International Multidisciplinary Scientific Geo Conference, SGEM*, 1, 575-581.
- Collin S., Crouzet J. (2011). Polyphénols et procédés, Directeur de Collection : Agence Universitaire de la Francophonie, France, p18.
- Craft B., Kerrihard D., A.L., Amarowicz R., Pegg R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173.
- Dangles O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Lavoisier*. 29-50.
- Dehpour A., brahimzadeh., M. Fazel., Nabavi M., Nabavi. (2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites*, 60, 405-412.

- Dey G., Mitra A., Banerjee R., Mitra R., Maiti B.R. (2001). Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochem Eng J*, 1, 227–231.
- Diallo I. (2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture. Thèse de doctorat. Université Montpellier-France.
- Dweck C., Chiu S.C., Hong, Y.Y. (1995). Implicit theories and their role in judgments and reactions: A world from two perspectives. *Psychological Inquiry*, 6(4), 267–285.
- Edeas M. (2006). Les antioxydants. Pepsi Co France 1 place de la Boule Nanterre cedex, 92024
- Fleury C. (2017). Optimisation d'un procédé par CO<sub>2</sub> pressurisé pour la pasteurisation et la préservation de compléments alimentaires liquides. Génie des procédés. Université de Bordeaux. France.
- Galan A.M., Calinescu I., Trifan A., Winkworth-Smith C., Carrascal M., Dodds C., Binner E. (2017). New insights into the role of selective and volume tricheating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compound from seabuckthorn leaves using Microwave-Assisted Extraction and Conventional Solvent Extraction. *Chem. Eng. Process*, 116, 29-39.
- Ganesan K., Baojun X. (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits A critical review on phytochemical profile and health. *International Journal of Molecular Science*, 10(3390), 18112331.
- García-Carrasco B., Fernandez-Dacosta R., Dávalos A., Ordovás J. M., Rodriguez-Casado A. (2015). In vitro Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Leaf and Root Extracts of *Taraxacum officinale*. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 3(2), 38–54.
- Ghaima K., Hashim N.M., Ali S.A. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(5), 96.
- González-Castejón M., Visioli F., Rodriguez-Casado A. (2012). Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition reviews*, 70(9), 534-547.
- Gormaz J.G., Valls N., Sotomayor C. (2016). Potential role of polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases: molecular. *Molecular Bases. Curr Med Chem.*, 23(2), 115-28.

- Goupy J., Creighton L. (2006). Introduction aux plans d'expériences. Edition, Donud, France, 336
- Grauso L, Emrick S, de Falco B. et al. (2019). Common dandelion: a review of its botanical, phytochemical and pharmacological profiles. *PhytochemRev* 18, 1115–1132
- Hidayat M., Puspitaningtyas N., Gani A., Kuswandi B. (2017). Rapid test for the determination of total phenolic content in brewed filtered coffee using colorimetric paper. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3384-3390.
- Ignat I., Volf I., Popa V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*, 126,1821–1835
- Imbimbo B.P., Ippati S., Ceravolo F., Watling M., Watling M. (2020). Perspective, Is therapeutic plasma exchange a viable option for treating Alzheimer's disease *Alzheimer's & Dementia, Translational Research & Clinical Interventions*, 6(1), 12004.
- Imbimbo P., Luigi D., Liberti D., Giuseppe O., Daria Maria Monti. (2020). Towards green extraction methods from microalgae learning from the classics, *104(21)*, 9067-9077.
- Jingwen Li., Luo J., Chai Y., Guo Y., Tianzhi Y., Bao Y. (2021). Hypoglycemic effect of *Taraxacum officinale* root extract and its synergism with *Radix Astragali* extract. *Food Sci Nutr*, Feb 26,9(4),2075-2085.
- Jovanovic A., Dordevic V.B., Zdunic G.M., Branko B. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Sep Purif Technol*, 179, 369-380
- Kashif A., Shahbaz., Hafiz M., Kwon., Joong-Ho. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315.
- Kassimi E.H., Belhaj K., Mahir L., Lolla B. A., Lahrabli S., Lmidmani F., Garch A. (2014). Meniscal lesions and iso kinetic evaluation: About 8 cases. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, (57), 267.
- Kebe M. (2014). Incidence de traitements thermiques sur le parenchyme de Pomme (*Malus Domestica*) et diffusion des composés phénoliques
- Kouamé., Thomas K., Sorho S., Siaka K., Amian Y., Soro. (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigmathonningii* (Caesalpinaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15, 97-105.

- Kouchaksaraie A. Z., Niazmand R., Najafi M.N. (2016). Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 36, 234–244
- Lahsissene H., Kahouadji A., Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, revue de botanique*, 01-30.
- Ligor M., Ratiu I. A., Kielbasa A., Al-Suod H., Buszewski B. (2018). Extraction approaches used for the determination of biologically active compound (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*, 39(15), 1860-1874
- Lis B., Olas B. (2019). Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products—history and present, *Journal of Functional Foods*, - Elsevier, 59, 40-48.
- Macheix J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). les composés phénoliques des végétaux. Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes, France.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes, France, p 40.
- Mahboubi M., Mahboubi M. (2020). Lubna H. Tahtamounia Noor M. Alqurnab Mariam Y. Al-Hudhuda Hameed A. Al-Hajj Dandelion (*Taraxacum officinale*) decreases male rat fertility in vivo Hepato protection by dandelion (*Taraxacum officinale*) and mechanisms, Medicinal Plants Research Department, Research and Development, Tabib Daru Pharmaceutical Company, Kashan, Iran
- Manach C., Mazur A., Scalbert A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*, - journals.lww.com
- Manallah A. (2012). Activités Antioxydante et Anticoagulante des Polyphénols de la Pulpe D'olive *Olea Europaea* L, Magister, Université Ferhat Abbas Sétif-Algérie, p22- p24- p25- p26.
- Marcus A.C., Edori O.S., Maduagu M.C. (2019). Phytochemical and Anti-microbial Screening of *Phyllanthus fratenus* and *Taraxacum officinale* Leaves. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 8(1), 2161-1009.
- Merlin M. (2015). La consommation de polyphénols, en particulier de vin rouge, peut-elle avoir des effets sur la maladie d'Alzheimer ? État de la question. Thèse doctorat, Université de Bordeaux U.F.R des Sciences Pharmaceutiques, France.

- Miara M. D., Hammou M. A., Aoul S. H. (2013). Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *Phytothérapie*, 11(4), 206-218.
- Modaresi M., Resalatpour N. (2012). The effect of *Taraxacum officinale* hydroalcoholic extract on blood cells in mice. *Advances in hematology hindawi*, 1687-910.
- Murray M.T., Pizzorno J. (2020). Textbook of Natural Medicine (*Taraxacum officinale* (Dandelion), General Description. USA, 5(2), 876- 877.
- Napoli D., Zucchetti P. (2021). A comprehensive review of the benefits of *Taraxacum officinale* on human health. *Bull Natl Res Cent*, 45, 110.
- Ndradi B., Fidrianny I., Wirasutisna K. (2017). DPPH Scavenging Activities and Phytochemical Content of Four Asteraceae Plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9, 10, 25258.
- Ngene J. P., Ngoule C. C., Kidik C. P., Ottou P. M., Dibong S. D., & Mpondo E. M. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88, 8194-8210.
- Olszowy M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compound from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 135-143.
- OMS (2018). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, Consulté le 3 juin 2020.
- Petkova N., Ivanov I., Topchieva S., Denev P., Pavlov A. (2015). Biologically active substances and in vitro antioxidant activity of different extracts from dandelion (*Taraxacum officinale*) roots. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 19, 190-7.
- Pfingstgraf I.O., Taulescu M., Pop R.M., Orasan R., Vlase L., Uifalean A., Todea D., Alexescu T., Toma C., Pârvu A.E. (2021). Protective Effects of *Taraxacum officinale* L. (Dandelion) Root Extract in Experimental Acute on Chronic Liver Failure. *Antioxidants*, 10, 504.
- Pradal D., Vauchel P., Decossin S., Dhulster P., Dimitrov K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137-146.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 53, 3101–3113.

- Qureshi S., Adil M.E., AbdEl-Hack M., Alagawany., M.R. Farag. (2017). Beneficial uses of dandelion herb (*Taraxacum officinale*) in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 73 (3) ,591-602.
- Rasouli H., Farzaei MH., Khodarahmi R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties* , 20 (2),1700-41
- Renard C.M.G.C., Caris-Veyrat C., Dufour C, Le Bourvellec C. (2014) Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovation Agronomique* ,42 ,125-137
- Sadhukhan B., Mondal N.K., Chattoraj S. (2016). Optimisation using central composite design CCD and the desirability function for sorption of methylene blue from aqueous solution onto *Lemna major*. *Karbala Int. J. Mod. Sci*, 2(3), 145–155.
- Saidi I., Mahdjoub B. H., Benchaachoua A. (2018). Extraction des substances bioactives. / Assessment of Antioxidant Potential and phytochemical screening of Phenolic Compounds of *Gleditsia triacanthos* L Pods. *International Journal of Medical Science and Clinical Invention*, 5 (3) ,3648-55.
- Sandoval-Acuña C., Ferreira J., Speisky H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasing lyemerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559, 75–90
- Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S .H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Cont*, 18,800–805
- Sharifi-Rad M., Roberts T. H., Matthews K. R., Bezerra C. F., Morais-Braga M. F. B., Coutinho H. D., Sharifi-Rad J. (2018). Ethnobotany of the genus *Taraxacum*—Phytochemicals and antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2131-2145.
- Shih I., Van Y., Chang Y. (2002). Application of statistical experimental methods to optimize production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme Microb. Technol*, 31 ,213–220.
- Shishov A., Bulatov A., Locatelli M ., Corridor S ., Andruch, V. (2017). Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchem. J*, 135, 33–38
- Singh A., Malhotra S., Subban R. (2008). Dandelion (*Taraxacum officinale*)-hepato protective herb with therapeutic potential. *Pharmacognosy Reviews*, 2(3), 163-167.

- Singla R.K., Dubey A.K., Garg A., Sharma R.K., Fiorino M., Ameen S.M et *al.* (2019). Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and Structures. Oxford University Press.
- Spigno G., Tramelli L., De Faveri D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng*, 81, 200-208
- Tahtamouni L.H., Alqurna N.M., Al-Hudhud M.Y., Al-Hajj H.A. (2011). Dandelion (*Taraxacum officinale*) decreases male rat fertility in vivo. *Journal of ethno pharmacology*, 135(1), 102-109.
- Tailé J. (2021). Étude des altérations fonctionnelles des cellules endothéliales cérébrales en condition hyperglycémique associée au diabète: rôle protecteur des polyphénols de plantes médicinales, Thèse doctorat, Université de la Réunion).
- Terry P., Giovannucci E., Michels K.B., Bergkvist L., Hansen H., Holmberg L., Wolk A. (2001). Fruit, Vegetables, Dietary Fiber, and Risk of Colorectal Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst*, 93, 525–533.
- Wirngo F.E., Lambert M.N., Jeppesen P.B. (2016). The Physiological Effects of Dandelion (*Taraxacum Officinale*) in Type 2 Diabetes. *Rev Diabet Stud*, 13(2-3), 113-131.
- Xiang N.G. Z., Na See A. (2018). Effect of in vitro digestion on the total polyphenol and flavonoid, antioxidant activity and carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory potential of selected functional plant-based foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1-13.
- Xu K., Wang J.L., Chu M.P., Jia C. (2019). Activity of coumarin against *Candida albicans*, Biofilms. *Journal de Mycologie Medicale*, 29, 28–34.
- Yansong X., Shuming Z., Min Du b., Mei-Jun Zhu a. (2017). *Journal of Functional Foods*, 29, 10–18.
- Yousefi M., Rahimi-Nasrabadi M., Pourmortazavi S.M, Wysokowski, M et *al.* (2019). Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils. *TrAC*, 118, 182–193.
- Yousefi M., Rahimi-Nasrabadi M., Pourmortazavi S.M, Wysokowski, Zhou W., Huang Q., Wu X., Zhou Z., Ding M., Shi M., Huang F., Li S., Wang Y., Kai G. (2016). Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids. *Sci. Rep*, 7, 10554.