

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945-Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de
Master en Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Thème

**Optimisation des conditions d'extraction des
composés phénoliques des graines de pin
d'Alep**

Présenté par :

Allel Fatima Zahra

Bouras Zahra

Bouteghane Imene

Membre de jury :

Président : Mr. BOUCHELAGHEM E/H.

Promotrice : Mme YDJEDD S.

Examineur : Mr. MEZROUA E/Y.

Année Universitaire 2019/2020

REMERCIEMENTS

*Nous exprimons toute notre gratitude et sincère dévouement à Dieu
Le Tout puissant qui grâce à son aide nous avons terminé ce modeste
Travail.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement notre promotrice
Mme. YDJEDD*

*Pour son aide et son encadrement, ses encouragements et surtout sa
Compréhension durant toute la période de préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions également l'honorable jury qui a bien voulu
Examiner notre travail.*

*Je tiens également à remercier tous mes amis et tous les étudiants de
Biologie*

*Nos professeurs qui nous ont enrichis de connaissances et tout le
Département de biologie*

*Je saisis également cette opportunité pour remercier **Mme Ratiba** et
Mr. Chaalal qui nous a beaucoup aidés pour élaborer ce travail.*

*Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation
De ce projet de fin d'étude.*



Dédicaces

*Je dédie ce projet de fin d'étude en premier
lieu à mes parents qui m'ont
Aidé et soutenu durant toutes ces longues années
d'étude*

A mes belles sœurs

□ Asma, Meriem, chaïma □

A le mari de ma sœur djalel

*A mes amies proches □ bicho, doha, rayane, imy,
khadidja □*

et mes cousines

A toute la famille

*A toute la promotion LMD Biologie 2019-2020,
Surtout mon binôme et je la remercie pour tout ses
Efforts*

A tantes et oncles

Zaho

Je dédie ce mémoire à ...

*A ma très chère maman **Hbiba**,*

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices et la confiance que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, de par son amour, son soutien durant mes années d'étude. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, tu as joué le double rôle d'un papa et d'une maman, Que Dieu te bénisse et te donne longue vie et de santé et de bonheur afin reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

*A la mémoire de **mon Père***

Rien au monde ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi mon cher papa.

Que DIEU t'accueille dans son vaste paradis.

*A mon petit ange **Mayassine** que j'adore.*

*J'exprime mes profonds remerciements particuliers à **Radia** pour leurs support et témoigné son affection durant toute cette année, a toujours été comme ma grande sœur que je n'ai jamais eu.*

*Une spéciale dédicace à ma tante **Souad** et son marié **Ali**.*

*A mes cher cousin(e)s **Azize, Sawssen, Sara, Faïza et Yasmine**.*

*A toutes mes ami(e)s, **Ameur, Amel, Khawla et Salma**.*

****Zahra****

Dédicaces

*Je dédie ce projet de fin d'étude en premier
lieu à mes parents Khadidja et Zidan*

A mes Frères

□ Aymen, Mohamed, Walid et Imad □

A mon mari Houssam

A mes amies □ bouchra, meriem, sara et imene □

** Imene **

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Partie bibliographique

I. Généralités sur le Pin d'Alep	3
I. 1. Description botanique	3
I. 2. Classification	4
I. 3. Distribution du pin d'Alep	4
I.4. Composition chimique des graines de Pin d'Alep	6
I. 5. Intérêt et utilisations du genre <i>Pinus</i>	7
II. Composés phénoliques	7
1. Définition.....	7
2. Acides phénoliques.....	8
3. Flavonoïdes.....	8
4. Tanins	9
III. Méthodes d'extraction des polyphénols	10
1. Méthodes classiques d'extraction	10
1.1. Extraction par macération	10
2. Méthodes moderne d'extraction	10
2.1 Extraction par ultrasons (EAU).....	10
2.2 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)	11
2.3. Extraction par liquide pressurisé (ELP)	12
2.4. Extraction par fluides supercritiques (EFS)	12

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes	16
I. 1. Matériel végétal	16
II. Effet des conditions d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	16
II. 1. Type du solvant d'extraction.....	16
II. 2. Concentration du solvant.....	17
II. 3. Rapport échantillon/solvant.....	17
II. 4. Temps d'extraction.....	17

III. Dosage des composés phénoliques.....	18
III. 1. Composés phénoliques totaux.....	18
III. 2. Activité antioxydante.....	18
IV. Analyse statistique.....	20

Résultats et discussion

I. Effet de nature du solvant	21
I. 1. Polyphénols totaux	21
I. 2. Activité antioxydante.....	22
II. Effet de la concentration du solvant.....	23
II. 1. Polyphénols totaux	23
II. 2. Activité antioxydante	24
III. Effet du rapport échantillon / solvant	26
III. 1. Polyphénols totaux.....	26
III. 2. Activité antioxydante.....	27
IV. Effet du temps d'extraction	28
IV. 1. Polyphénols totaux	28
IV. 2. Activité antioxydante.....	30
V. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydante	31
V 1. Corrélation entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer.....	31
V. 2. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire.....	31
Conclusion et perspectives	22
Références bibliographiques	34
Annexe 41	
Résumé	

Liste des abréviations

DPPH : radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

EAA : Equivalent en acide ascorbique

EAG : Equivalent en acide gallique.

EAM : Extraction assistée par micro-ondes.

EAU : Extraction Assistée par Ultrasons.

EDAU : Extraction dynamique assistée par ultrasons

EFS : Extraction par fluides supercritiques.

ELP : Extraction par Liquide Pressurisé.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

OMS : organisation mondiale de la santé.

PRF : Pouvoir Réducteur de Fer.

TPC : Teneur en Composés Phénoliques.

Liste des figures

Figure 1. Photographies de <i>Pinus halepensis</i> Mill arbre, feuilles, cône (A) et les graines de <i>P. halepensis</i> (B).....	3
Figure 2. Répartition de pin d'Alep dans le bassin méditerranéen.....	5
Figure 3. Répartition du pin d'Alep en Algérie	5
Figure 4. Structures de base d'Acide hydroxybenzoïque (A) et Structures de base d'Acides hydroxyciannimiques (B).....	8
Figure 5. Structure de base des flavonoïdes	9
Figure 6. Structures de base des Tanins condensés	9
Figure 7. Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique.....	11
Figure 8. Photographies des différentes étapes de la préparation des extraits à partir de la poudre des graines de pin d'Alep : agitation (A), centrifugation (B) et (C) et filtration (D) (Photos prises au laboratoire).	17
Figure 9. Dosage des composés phénoliques totaux. (Photo prise au laboratoire)	18
Figure 10. Structure chimique du radical libre DPPH et sa forme réduite.....	19
Figure 11. Dosage du DPPH (Photo prise au laboratoire).....	20
Figure 12. Effet de la nature de solvant sur l'extraction des polyphénols totaux dans des graines de pin d'Alep.	21
Figure 13. Effet de la nature de solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.....	23
Figure 14. Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux des graines de pin d'Alep.	24
Figure 15. Effet de la concentration du solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.....	25
Figure 16. Effet du rapport échantillon/solvant sur l'extraction des polyphénols totaux des graines de pin d'Alep.	26
Figure 17. Effet du rapport échantillon/solvant sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.	27
Figure 18. Effet du temps sur l'extraction des composés phénoliques des graines de pin d'Alep.....	28
Figure 19. Effet du temps d'extraction sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.	30
Figure 20. Corrélation entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer.....	31
Figure 21. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire DPPH.	32

Liste des tableaux

Tableau 1. Position taxonomique de <i>Pinus halepensis</i>	4
Tableau 2. Composition chimique moyenne des graines de <i>P. halepensis</i>	6
Tableau 3. Avantages et inconvénients des méthodes d'extraction classiques et modernes. .	13

Introduction

Introduction

Pinus (nom commun : pin) est le plus grand genre de conifères poussant surtout dans le nord de la zone Méditerranéenne (**Minervini et al., 2020**), mais c'est en Afrique du Nord que semble actuellement avoir son centre de gravité, principalement en Algérie et en Tunisie où il constitue le massif le plus important en raison de sa résistance à la sécheresse (**Maestrea et al., 2003**). Le genre *Pinus* comprend environ 800 espèces dans le monde (**Nergiz et İclaldönmez, 2004**). Ce conifère est largement utilisé dans le monde et il a une importance économique grâce à la richesse de sa résine et de son huile essentielle en métabolites secondaires (térébenthine, terpènes, composés phénoliques, etc.).

Les graines de *Pinus halepensis* (pin d'Alep) sont également importantes, et sont traditionnellement utilisées pour préparer la crème sucrée, et comme ingrédients aromatiques dans la glace et des bonbons. Les débris de graines peuvent également être utilisés comme matière première pour l'extraction de l'huile essentielle (**Minervini et al., 2020**). Elles sont également utilisées en médecine traditionnelle et elles ont de nombreux effets à savoir la prévention des maladies coronariennes, maladies cardiaques (**Cheikh-Rouhou et al., 2006**), effets sur la fatigue et l'antivieillesse, activité anti-inflammatoire et antinéoplasique, activité antioxydante, et elles sont utilisées aussi dans les industries alimentaires et cosmétiques (**Kadri et al., 2015**), cela grâce à leur richesse en composés bioactifs tels que les composés phénoliques.

Par ailleurs, l'utilisation de composés bioactifs dans différents secteurs (pharmaceutique, alimentaire et chimique) nécessite une méthode plus appropriée pour extraire ces composants actifs des matières végétales. L'extraction consiste à séparer les parties bioactives de tissus végétaux des composants inactifs ou inertes en utilisant des solvants sélectifs dans les procédures d'extraction (**Handa, 2008**). Le choix d'une technique d'extraction appropriée est également important, car elle est utilisée pour éliminer les constituants solubles souhaitables, en éliminant ceux qui ne sont pas nécessaires à l'aide des solvants (**Handa, 2008; Dhanani et al., 2013**). Ainsi, plusieurs paramètres ont une influence directe sur la qualité de l'extrait et l'efficacité de la technique, y compris la nature chimique des composés, la méthode d'extraction utilisée, le type et la concentration de solvant, la granulométrie des particules de l'échantillon, le temps et la température d'extraction (**Nazck et Shahidi, 2004**).

L'objectif de présent travail consiste donc à déterminer les conditions d'extraction optimales des composés phénoliques à partir des graines de pin d'Alep, et ainsi montrer l'effet des paramètres suivants : le type de solvant, la concentration du solvant, le rapport échantillon

/ solvant, le temps d'extraction et la température d'extraction sur leur taux d'extraction et leur activité antioxydante.

Afin d'améliorer la lisibilité et la structure du manuscrit, ce dernier est organisé en trois grandes parties :

□ La première partie est une synthèse des données bibliographiques sur le pin d'Alep, les composés phénoliques et les techniques d'extraction des composés phénoliques.

□ La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées pour effectuer les dosages des polyphénols et évaluer l'activité antioxydante.

□ La troisième partie est consacrée aux résultats et discussion.

Partie bibliographique

I. Généralités sur le Pin d'Alep

I. 1. Description botanique

Le Pin d'Alep est un arbre de taille moyenne de hauteur totale allant de 25 à 27 m. Sa longévité ne dépasse généralement pas 150 ans, il se rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens ; arides supérieurs, semi-arides, sub-arides et humide. C'est une espèce héliophile et xérophile. Le Pin d'Alep a généralement un tronc tortueux, irrégulier et branchu. L'écorce des jeunes sujets est lisse et d'un gris argenté ; chez les adultes, elle forme un rhytidome plus ou moins gerçuré en écailles minces, larges et aplaties et de couleur rougeâtre. Les feuilles en aiguilles très fines, < 1 mm, molles, très finement serrulées sur les bords, 5 à 10 cm de long ; réunies par deux, rarement par trois dans une gaine ; groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux ; couleur verte jaunâtre (Nahal, 1962). Les cônes sont ligneux à écailles dures, pédonculés, isolés ou par paires, ovoïdes-coniques à écusson proéminent et toujours longuement persistants, Ils mûrissent au cours de la deuxième année et laissent le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année.

Le cône doit avoir subi de forte chaleur qui détruit les joints de résine entre les écailles pour pouvoir s'ouvrir. Ce dernier renferme des graines mates de 7 mm de taille (Bellahouel, 2012), à aile allongée et presque droite des deux côtés (Nahal, 1962).

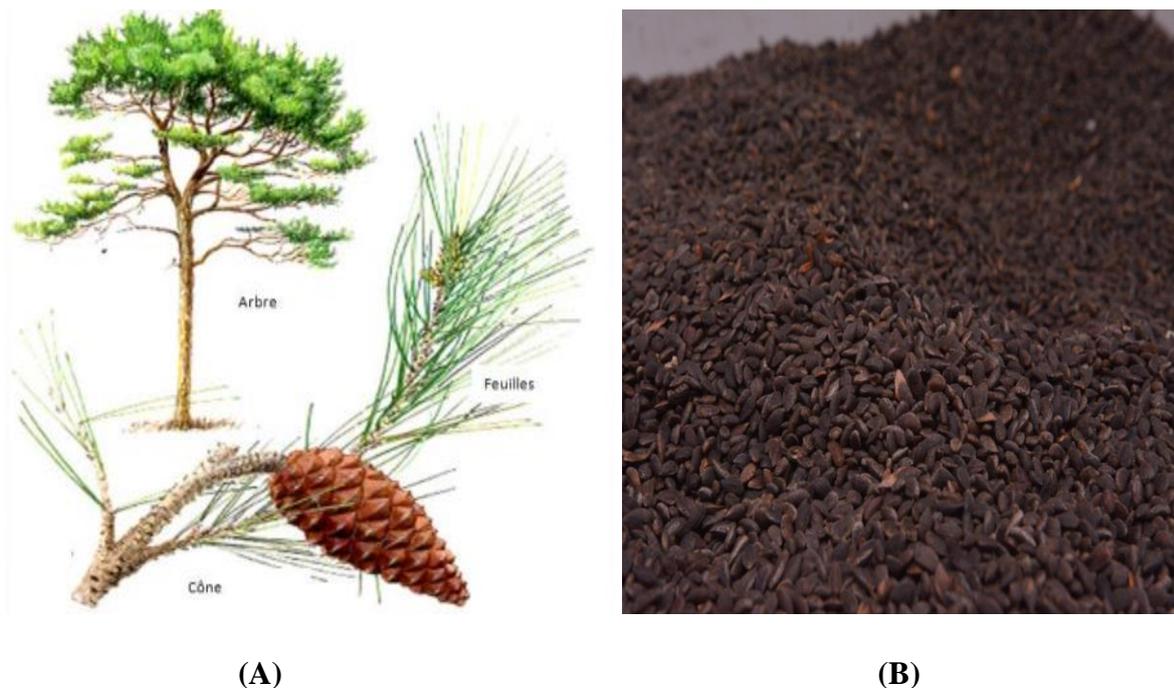


Figure 1. Photographies de *Pinus halepensis* Mill arbre, feuilles, cône (A) et les graines de *P. halepensis* (B) (Jacues brosse, 2003).

I. 2. Classification

Le genre *Pinus*, appartenant à la famille des Pinacées (Abiétacées), est divisé en trois sous-genres qui sont *Pinus*, *Ducampopinus* et *Cembrapinus*. L'espèce *Pinus halepensis* Mill. Fait partie de la section Halepensoïdes qui est divisée en trois groupes parmi lesquels le groupe halepensis.

La systématique du pin d'Alep établie par **Farjon (1996)** se résume comme suit :

Tableau 1. Position taxonomique de *Pinus halepensis*

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Spermaphytes (Phanérogames)
Sous-embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	<i>Pinale</i>
Famille	<i>Pinacée</i>
Sous-famille	<i>Pinoidée</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Sous-genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i>

I. 3. Distribution du pin d'Alep

➤ Dans le monde

L'aire de répartition du pin d'Alep est limitée au bassin méditerranéen (Figure 02) dont il occupe plus de 3,5 millions d'hectares (**Quezel, 1986**). Il s'étend de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) et du Moyen-Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestina et Turquie) jusqu'à l'Europe méridionale méditerranéenne (Grèce orientale, Croatie, Italie du Nord, Est de la France et Espagne orientale (**Djerrad et al., 2015**)).



Figure 2. Répartition de pin d'Alep dans le bassin méditerranéen (**Fady et al., 2003**).

➤ **En Algérie**

En Algérie, le pin d'Alep est l'espèce la plus abondante (**Derbal et al., 2015**), avec une superficie s'étendant à 881.000ha (**Derouche, 2015**). Le pin d'Alep couvre 35% des surfaces boisées de l'Algérie du Nord (**Lazrec, 2015**).

Selon **Boudy (1955)**, Le pin d'Alep présente de vastes peuplements en oranais (Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen, Tiaret) dans l'Algérois (médiâ, Boghar, Monts des Bibans) sur l'Atlas saharien (mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa).

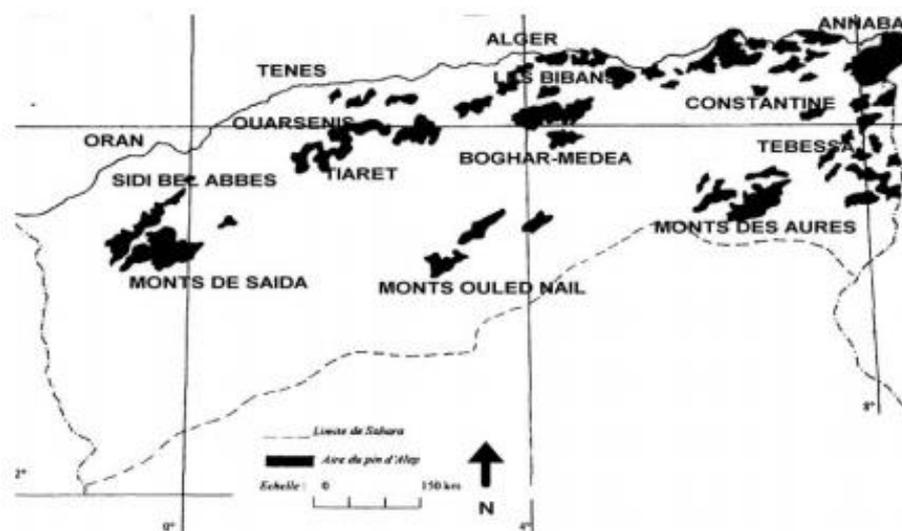


Figure 3. Répartition du pin d'Alep en Algérie (**Bentouati, 2006**).

I.4. Composition chimique des graines de Pin d'Alep

En raison de leur large domaine d'usage médicinal l'espèce *Pinus halepensis* Mill est riche en huiles végétales, en composés phénoliques et en acide gras insaturés, minéraux...

Les graines de pin ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. Les graines de *Pinus halepensis* Mill sont très riches en métabolites primaires (Sucres, protéines, lipides) et secondaires (Phénols totaux flavonoïdes, huiles essentielles...) comme elles présentent une importante concentration en oligo-éléments (Phosphore, potassium, magnésium, Zinc, fer, cuivre et manganèse) (**Cheikh-Rouhou *et al.*, 2006**). La composition des graines du pin d'Alep est représentées dans le tableau II suivant :

Tableau 2. Composition chimique moyenne des graines de *P. halepensis* (**Cheikh Rouhou *et al.*, 2006**)

Composition	Pourcentage %
Protéines	22,7%
Huiles	43,3%
Cendres	8,3%
Carbohydrates totaux	25,7%
Potassium, Magnésium et calcium	1%
Polyphénols totaux	3,71
Flavonoïdes	0,80
Acides gras insaturés :	
Acide oléique	27,3%
Acide linoléique	48,8%
Acides gras saturés :	
Acide palmitique	8,75%

I. 5. Intérêt et utilisations du genre *Pinus*

Le pin d'Alep occupe une place très importante dans les études récentes grâce à ses graines. Ces graines sont très utilisées dans le domaine agroalimentaire (la pâtisserie). Plusieurs études indiquent que leurs métabolites présentent diverses activités biologiques.

Les travaux qui ont été réalisés dans ce contexte montrent qu'elles présentent des activités antioxydante et anti inflammatoire qui sont en générales associé à la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Elles ont aussi montré qu'elles pouvaient être utilisées en médecine traditionnelle et la prévention des maladies liées à l'angiogenèse et pour la lutte contre le cancer (**Kadri et al., 2014**).

Ils sont le plus souvent utilisés comme :

- Antiseptique puissant à action dynamisante; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires.
- Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes, les infusions, les tisanes. Les jus de *Pinus halepensis* Mill sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire (**Wong et al., 2006**).

On utilise les bourgeons de cette espèce en parfumerie et en savonnerie. Mais, les principales utilisations de pin sont liées à la production de bois comme bois d'industrie ainsi que pour la charpente ou la menuiserie. Il est aussi utilisé pour la protection des sols et dans le domaine cosmétique expliqué par sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturels (**Boulaacheb, 2009**).

II. Composés phénoliques

1. Définition

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes, mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka et Sherma, 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Mumper, 2010**).

Ils sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés avec d'autres fonctions (éther, ester, hétéroside), avec un ou plusieurs résidu(s) sucré(s) lié(s) ou ils peuvent également être liés avec d'autres composés chimiques, tels que des acides carboxyliques, des amines ou des lipides ou avec d'autres phénols (**Ferguson, 2001 ; Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Stoclet et al., 2004**).

Ces différenciations structurales contribuent à l'extension de leurs spectres d'activité dans les différents domaines fondamentaux et appliqués liés aux plantes ou aux activités humaines à des fins diététiques et thérapeutiques mais aussi à l'échelle du laboratoire de recherche puis la production industrielle (**Petti et Scully, 2009**).

2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque comme l'acide vanillique. Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large (**Manach C., et al., 2004**).

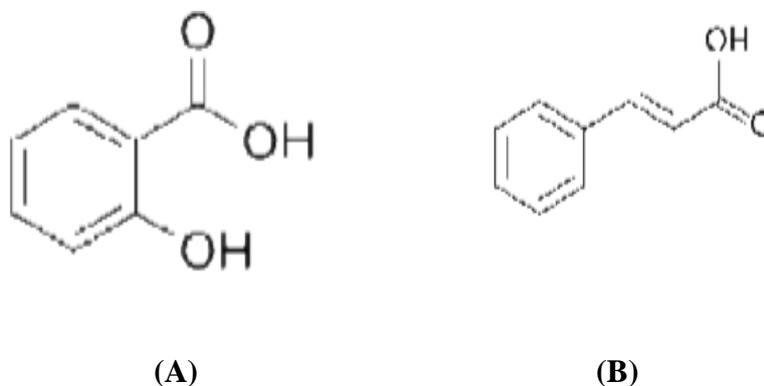


Figure 4. Structures de base d'Acide hydroxybenzoïque (A) et Structures de base d'Acides hydroxycinnamiques (B) (**Halmi, 2015**).

3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) est le groupe le plus répandu des composés phénoliques dans le règne végétal, plus de 5000 composés ont été décrits (**Ferguson, 2001**). Ils ont un squelette de base de quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6, constitués de 2 cycles aromatiques A et B reliés par une chaîne en C3 qui forme un hétérocycle oxygéné C (**Guignard, 1996**).

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes en tant que métabolites secondaires, étant impliqués dans les processus de défense contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies (**Chira et al., 2008**).

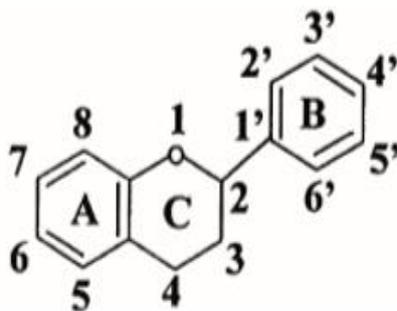


Figure 5. Structure de base des flavonoïdes (**Havsteen, 2002**).

4. Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Haslam, 1996 ; Cowan, 1999**). Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). Les tanins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs, qui sont les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Kabera et al., 2014**).

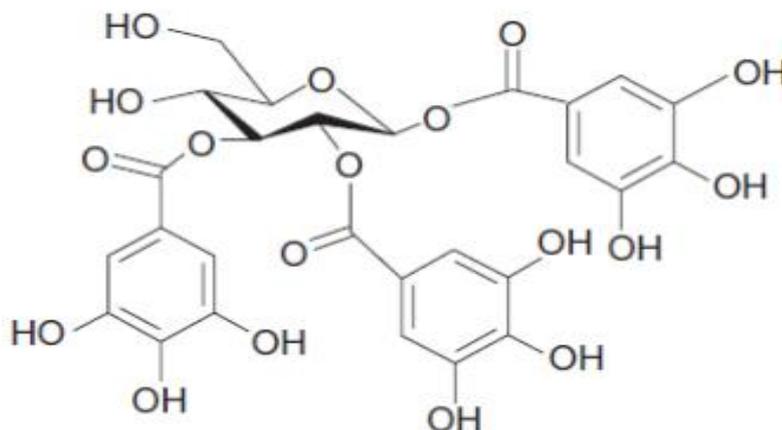


Figure 6. Structures de base des Tanins condensés (**Halmi, 2015**).

III. Méthodes d'extraction des polyphénols

1. Méthodes classiques d'extraction

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs. Les méthodes traditionnelles sont celles utilisant les procédés de base les plus simples pour extraire le principe actif (Sacchi, Bisson, et Adams, 2005).

1.1. Extraction par macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients. En termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur (Groubert, 1984 ; Leybros et Frémeaux, 1990).

2. Méthodes moderne d'extraction

2.1 Extraction par ultrasons (EAU)

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons est une technique simple, efficace et peu couteuse (Azmir *et al*, 2013) qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps soumise à l'action des ultrasons. Elle a été reconnue pour son application potentielle dans l'extraction des huiles essentielles (carvone, gingerols, huile d'amande...), des protéines (soja), des polyphénols, des anthocyanines, des saponines, des polysaccharides ainsi que dans la pasteurisation et la production de produits laitiers. (Azmir *et al.*, 2013).

Le principe de cette procédure est illustré dans la figure 07.

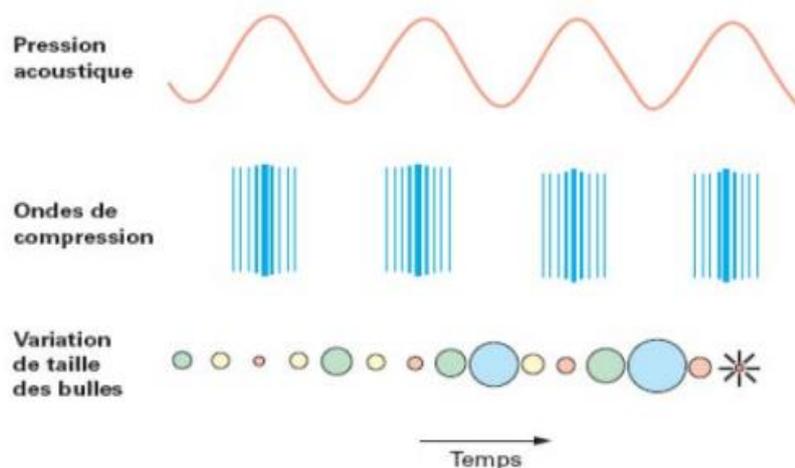


Figure 7. Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique (**Draye et al., 2009**).

L'ultrason fait référence aux ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse (**Benamor, 2008**). Ce phénomène est appelé la cavitation acoustique.

2.2 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'utilisation du EAM dans l'extraction de produits naturels a commencé à la fin des années 1980 et, grâce aux développements technologiques, il est devenu l'une des méthodes d'extraction les plus populaires et les plus rentables disponibles. Cette méthode permet d'effectuer plusieurs extractions quantitatives d'échantillons en quelques minutes, avec une reproductibilité améliorée et une consommation de solvant réduite. Une température élevée et un contrôle de la température peuvent également être obtenus en utilisant ce processus. (**Kashif et al., 2017**)

Les micro-ondes sont des radiations électromagnétiques d'une fréquence de 0,3 à 300 GHz (**Wang et Weller, 2006**). Les micro-ondes sont transmises sous forme d'ondes, qui peuvent pénétrer dans les biomatériaux et interagir avec des molécules polaires telles que l'eau dans les biomatériaux pour créer de la chaleur. Par conséquent, les micro-ondes peuvent chauffer un matériau entier à la profondeur de pénétration simultanément. L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) offre une livraison rapide d'énergie à un volume total de

solvant et de matrice végétale solide avec chauffage ultérieur du solvant et de la matrice solide, de manière efficace et homogène. Parce que l'eau dans la matrice végétale absorbe l'énergie micro-ondes, la perturbation cellulaire est favorisée par la surchauffe interne, ce qui facilite la désorption des produits chimiques de la matrice, améliorant la récupération des nutraceutiques (**Wang et Weller, 2006**).

2.3. Extraction par liquide pressurisé (ELP)

Cette technique alternative d'extraction est réalisée à pression élevée. Cela permet d'augmenter la température d'ébullition du solvant et de réaliser l'extraction à températures plus élevées qu'à pression ambiante. La haute pression appliquée, le plus souvent comprise entre 4 et 20 MPa, assure que le solvant se maintient à l'état liquide à la température appliquée (**Ramos et al., 2002**). Les températures élevées d'extraction favorisent le transfert de matière et augmentent les taux d'extraction, parce qu'elles impliquent généralement : une augmentation de la capacité des solvants pour la solubilisation de solutés, une augmentation des taux de diffusion, une meilleure rupture des liaisons soluté-matrice, une diminution de la viscosité du solvant et une diminution de la tension superficielle (**Ramos et al., 2002 ; Richter et al., 1996**).

L'extraction par liquide pressurisé est également connue comme extraction par solvant sous pression, extraction par solvant sous critique ou extraction accélérée par solvant. Lorsque l'eau est utilisée comme solvant, l'ELP est généralement appelée extraction à l'eau surchauffée, extraction avec de l'eau sous-critique, extraction avec de l'eau pressurisée ou extraction avec de l'eau chaude sous pression (**Pronyk et Mazza, 2009**).

L'ELP nécessite généralement moins de temps et une plus faible consommation de solvant organique par rapport aux techniques conventionnelles (**Mendiola et al., 2007**). L'utilisation de l'ELP pour l'extraction de polyphénols à partir de co-produits de fruits et légumes a été brevetée (**King et Grabiell, 2007**).

2.4. Extraction par fluides supercritiques (EFS)

L'extraction par fluide supercritique est une technique relativement récente qui présente divers avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle se fait à de basses températures favorables à l'extraction des composés thermosensibles. Elle permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction de ces composés (**Garcia-Salas et al., 2010**).

Le point critique d'une substance pure est le plus haut point de température et de pression auquel la substance est à l'état d'équilibre liquide-vapeur. Au-dessus de ce point, un fluide se forme et cet état est appelé état supercritique. Le fluide supercritique possède à la

fois les caractéristiques du gaz et du liquide. Ce fluide de faible viscosité, de faible tension de surface et de fort coefficient de diffusion peut pénétrer les micropores des cellules végétales afin d'extraire au mieux les biomolécules (**Michel, 2011**). Il peut ainsi permettre l'extraction d'une large variété de composés organiques.

Vu sa grande disponibilité, sa non-toxicité, son caractère non-inflammable et sa stabilité chimique, le CO₂ est le solvant le plus utilisé à l'état supercritique pour l'extraction des biomolécules: T = 31,1 °C et P = 73,3 MPa (**Garcia-Salas et al., 2010**). Cependant, les polyphénols ne sont pas totalement extraits par le CO₂ supercritique à cause de leur forte polarité. L'extraction des polyphénols par cette technique nécessite l'ajout des modificateurs organiques tels que le méthanol (**Stalikas, 2007**).

Tableau 3. Avantages et inconvénients des méthodes d'extraction classiques et modernes. (**Rajbhar et al, 2014 ; Kashif et al., 2017**)

Méthodes d'extraction		Avantages	Inconvénients
Classiques	Macération	<ul style="list-style-type: none"> -Elle permet d'éviter l'altération d'espèces chimiques organiques fragiles qui peuvent à température plus élevée réagir et se dégrader (par réaction avec d'autres espèces du milieu chimique, par hydrolyse, oxydation au contact de l'air etc.) -La macération est une extraction à froid et par conséquent elle limite la libération (et la perte) d'espèces chimiques dans l'air. -La macération ne nécessite pas de dispositif de chauffage, elle est donc plus simple et moins coûteuse. 	<ul style="list-style-type: none"> -La macération est souvent longue (plusieurs heures voire plusieurs jours) -En raison du temps qu'elle prend il y a risque de prolifération bactérienne -A froid la solubilité est moins bonne
		<ul style="list-style-type: none"> -Facilité d'utilisation grâce à la simplicité de la technique -Moins de consommation de temps par rapport aux techniques traditionnelles, comme extraction de Soxhlet) 	<ul style="list-style-type: none"> -La disponibilité du solvant est nécessaire pour effectuer une extraction optimale des composés bioactifs. -La dégradation des principes actifs des matrices végétales se

Suite de tableau 3

		<ul style="list-style-type: none"> - Utile en raison de la diminution des déchets de laboratoire. -Amélioration de l'extraction de la matrice végétale sans purification supplémentaire. 	<ul style="list-style-type: none"> produit en raison de la pyrolyse oxydative causée par les radicaux hydroxyle (OH-) pendant le phénomène de cavitation. - La dilution de l'extrait est l'un des inconvénients majeurs en cas d'extraction dynamique assistée par ultrasons (EDAU).
	EAM	<ul style="list-style-type: none"> - Elle utilise de plus petites quantités de solvant. - n'est pas couteuse et est considérablement rapide. -Des températures plus élevées peuvent être utilisées. -A un temps d'extraction plus court. -Une charge environnementale réduite grâce à moins de rejets de CO2 dans l'atmosphère. 	<ul style="list-style-type: none"> - Manipulation et traitement de volumes d'échantillons limités. - Exigence d'une étape de refroidissement après chaque traitement pour un traitement ultérieur. - Incapacité de traiter plusieurs échantillons simultanément en raison du faible débit de l'équipement
	ELP	<ul style="list-style-type: none"> - Extraction dès l'analyse cibles de manière efficace et plus rapide à partir de matrices végétales solides. - Augmente l'hydratation des particules de la matrice en pénétrant les solvants améliorés. - Réduire la viscosité du solvant utilisé à température et pression élevées, ce qui augmente la solubilité. - Réduction du temps et de l'utilisation des solvants avec l'avantage du couplage en ligne avec les techniques de séparation 	<ul style="list-style-type: none"> -Besoin d'équipements automatisés sophistiqués et spécialisés. - Considération économique due aux exigences de diverses colonnes (gel de silice) pour l'élimination des échantillons d'aliments de manière destructrice. - Taux de récupération plus faibles des polyphénols potentiellement thermosensibles à des températures élevées. - Extraction incomplète sous

		instrumentale et l'automatisation	position stable en raison d'un volume d'extraction limité.
	EFS	<p>Réduction de l'utilisation de solvants organiques et des risques potentiels de stockage</p> <p>-Réduction du temps d'extraction pour permettre l'achèvement du processus en environ 20 min en raison de la rétrodiffusion de l'analyse d'intérêt dans le processus SFE</p> <p>-Possède une excellente aptitude à l'extraction de composés solides / liquides à faible volatilité</p> <p>-Les exigences des conditions opératoires sont relativement plus faibles</p> <p>-Permet un degré maximal de séparation du solvant de l'extrait cible</p> <p>-Processus continu sans interruption</p> <p>-Traitement rentable.</p>	<p>- Une modélisation imprécise peut affecter l'efficacité d'EFS.</p> <p>-Des variations peuvent être apportées en termes de cohérence et de reproductibilité du processus continu d'extraction</p> <p>-Cette technologie exige une consommation</p>

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est constitué des graines de pin d'Alep achetées chez un herboriste dans la Rue d'Annona, (Guelma, Algérie).

Les graines qui ne présentent pas de blessure ou d'infection ont été bien lavées, séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine (0,5 mm). La poudre obtenue a été conservée dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière, pour une utilisation ultérieure.

II. Effet des conditions d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante

L'extraction des composés phénoliques est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction utilisée, le ratio échantillon/solvant, le temps et la température d'extraction.

II. 1. Type du solvant d'extraction

Pour déterminer le type du solvant d'extraction des composés phénoliques totaux à partir de la poudre des graines du pin d'Alep, ces derniers ont été extraits en utilisant différents solvants à savoir : l'acétone 60%, l'éthanol 60%, le méthanol 60% et l'eau distillée, avec fixation du ratio échantillon/solvant, du temps et de la température d'extraction.

Une quantité de 0,5g de poudre des graines de pin d'Alep a été homogénéisée avec 20 ml du solvant d'extraction. Le mélange a été agité sur une plaque agitatrice pendant 60 minutes à 25°C. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, l'extrait a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Les extraits finals obtenus ont été utilisés pour le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante.

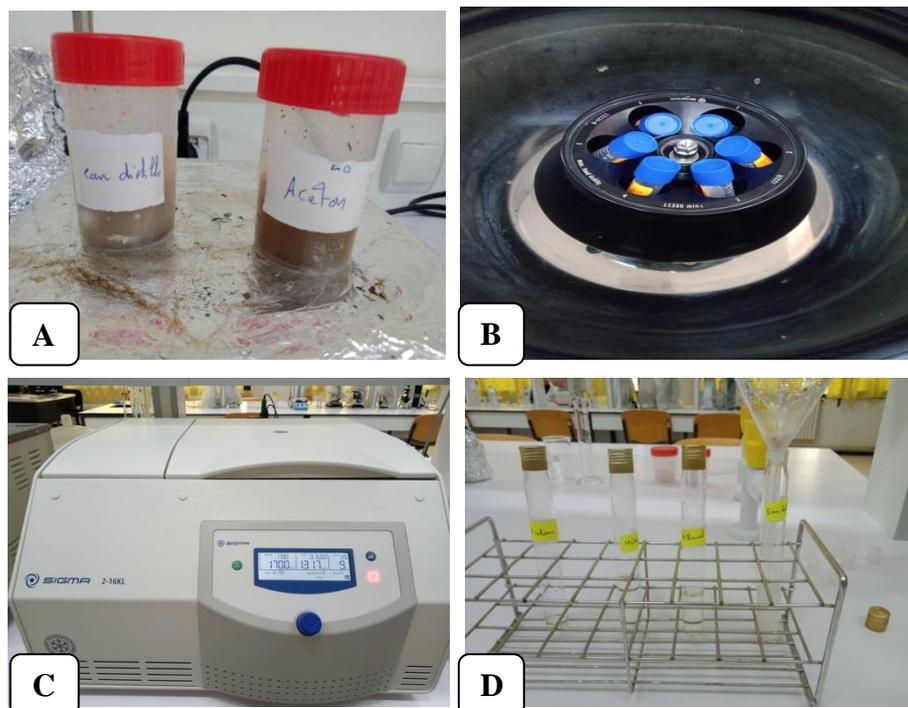


Figure 8. Photographies des différentes étapes de la préparation des extraits à partir de la poudre des graines de pin d'Alep : agitation (A), centrifugation (B) et (C) et filtration (D) (Photos prises au laboratoire).

II. 2. Concentration du solvant

Les composés phénoliques ont été extraits avec le meilleur solvant, préalablement sélectionné, à différentes concentrations : 20%, 40%, 60%, 80% et 100% (v/v). Le rapport échantillon/solvant, la durée et la température d'extraction ont été fixés à 0,5 g/20 ml, 60 min et 25°C, respectivement. La meilleure concentration du solvant a été choisie en fonction de la valeur la plus élevée de l'activité antioxydante et la teneur maximale en composés phénoliques totaux.

II. 3. Rapport échantillon/solvant

L'extraction des composés phénoliques totaux a été effectuée en utilisant la meilleure concentration du solvant d'extraction déterminée précédemment, en faisant varier le ratio échantillon/solvant de 0.2/20 ; 0,5/20 ; 1/20 ; 1,5/20 ; 2g/20 ml. La procédure d'extraction a été répétée comme décrit précédemment, en fixant le temps et la température d'extraction à 60 min et 25°C, respectivement.

II. 4. Temps d'extraction

Ce facteur joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. Ces composés sont extraits en utilisant la meilleure concentration du solvant et le meilleur rapport

échantillon/solvant préalablement déterminés. L'extrait a été obtenu en faisant varier le temps d'extraction (30, 60, 90, 120 et 150 min) tout en fixant la température d'extraction à 25°C.

III. Dosage des composés phénoliques

III. 1. Composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) a été déterminée selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Ces acides peuvent être réduits par les composés phénoliques, en milieu alcalin, en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques totaux (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Un volume de 300 µl d'extrait a été mélangé avec 1500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) et 1200 µl de carbonate de sodium (7,5%). Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 750 nm.

La teneur en composés phénoliques est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de poudre (mg EAG/100 g).



Figure 9. Dosage des composés phénoliques totaux. (Photo prise au laboratoire)

III. 2. Activité antioxydante

III. 2.1. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur du fer est estimé par la méthode **d'Oyaizu, (1986)**. Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le (Fe^{3+}) participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de fenton qui est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Une

augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits.

Un volume de 0,5 ml d'extrait est additionné à 0,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 0,5 ml de ferricyanure de potassium (1 %). Après incubation à 50 °C pendant 20 min, 0,5 ml d'acide trichloracétique (10 %) sont ajoutés au mélange suivi d'une centrifugation à 1700 rpm pendant 15 min. Une aliquote de 1 ml du surnageant est transférée dans un tube à essai est additionnée de 1 ml d'eau distillée et de 0,2 ml de chlorure ferrique (0,1%). Après une incubation à l'obscurité pendant 10 min, l'absorbance est mesurée à 700 nm.

Les résultats du pouvoir réducteur sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par 100g de poudre (mg EAA/100g MS), en se référant à une courbe d'étalonnage (**figure 02, annexe I**).

III. 2.2. Activité anti radicalaire DPPH

La méthode du DPPH• (diphényl picryl-hydrayl) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPHH (diphényl picryl-hydrazine). La réduction du DPPH• en DPPH-H induit un changement de sa couleur violette en jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort. (**Mansouri, et al., 2005**).

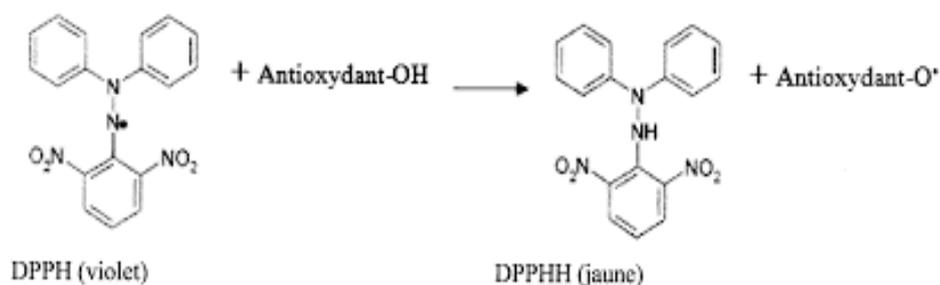


Figure 10. Structure chimique du radical libre DPPH et sa forme réduite (**Congo, 2012**).

Un volume de 100 μ l d'extrait est additionné à 1000 μ l de la solution de DPPH (60 μ M). Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité ; l'absorbance est mesurée à 517 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de piégeage du radical de DPPH selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH} = \frac{(Abs_0 - Abs)}{Abs_0} \times 100$$

Où :

Abs₀ : l'absorbance de la solution de DPPH seule (témoin).

Abs : l'absorbance de DPPH en présence de l'extrait.



Figure 11. Dosage du DPPH (Photo prise au laboratoire)

IV. Analyse statistique

L'analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2013, pour déterminer les moyennes et les écarts-types. Le logiciel « STATISTICA 5.5 » est utilisé pour réaliser l'analyse de la variance ANOVA et le degré de signification des données est pris à la probabilité $p < 0,05$.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois répétitions ($n=3$)

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; $a > b > c > d > e$.

Résultats et discussion

I. Effet de nature du solvant

I. 1. Polyphénols totaux

Les résultats de dosage des polyphénols totaux des extraits des différents solvants d'extraction (l'acétone 60%, le méthanol 60%, l'éthanol 60% et l'eau) sont présentés dans la **figure 12**.

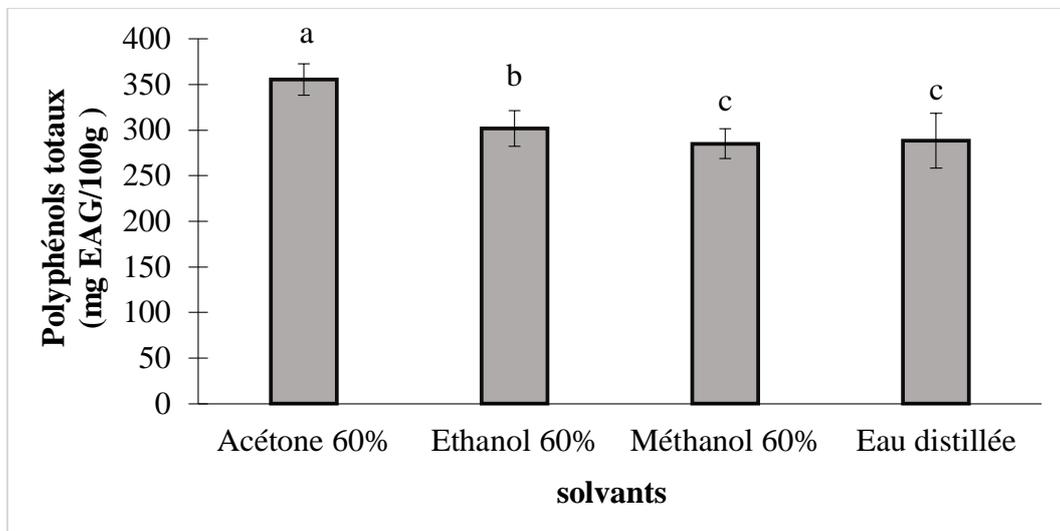


Figure 12. Effet de la nature de solvant sur l'extraction des polyphénols totaux dans des graines de pin d'Alep.

Les résultats obtenus montrent que la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux est obtenue dans l'extrait acétonique à 60% avec une teneur de $355,67 \pm 17,33$ mg EAG/100g, suivie par l'extrait éthanolique à 60% avec une teneur de $302,02 \pm 19,54$ mg EAG/100g. Tandis que, les teneurs en polyphénols totaux obtenus dans l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique à 60% ne présentent pas de différence significative, qui sont de $288,52 \pm 29,92$ mg EAG/100g et de $284,97 \pm 16,34$ mg EAG/100g, respectivement.

L'étude statistique montre que la teneur en polyphénols totaux des différents extraits des graines de pin d'Alep est significativement affectée par la nature du solvant utilisé.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont similaires à ceux obtenus par **Mahmoudi et al., (2013)**, montrant que l'acétone est le meilleur solvant d'extraction avec un rendement de 19,29 % suivi par l'eau et le méthanol avec les valeurs (16,75 %) et (14 %) respectivement.

D'après **Chaalal et al., (2012)**, l'acétone est le solvant le plus adéquat pour extraire les composés phénoliques à partir de la figue de Barbarie, ce qui concorde avec les résultats de

ce travail. Par ailleurs, les composés phénoliques totaux et les activités antioxydantes les plus élevés ont été obtenus avec l'acétone 75%.

Cependant, les valeurs les plus basses ont été obtenues avec 100% d'acétone, ce qui indique que la combinaison d'acétone avec de l'eau était meilleure pour l'extraction des polyphénols que l'acétone pure.

La solubilité des composés phénoliques est gouvernée par le type du solvant utilisé (polarité), le degré de polymérisation des polyphénols, ainsi que les interactions des composés phénoliques avec d'autres composés de la plante et la formation des complexes insolubles. Cependant il n'y a pas une procédure d'extraction uniforme ou complémentaire satisfaisante qui extrait tous les composés phénoliques ou une classe spécifique des substances phénoliques dans le matériel végétal (Falleh *et al.*, 2008).

Dans la présente étude, l'acétone 60% est sélectionnée comme meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des graines de pin d'Alep.

I. 2. Activité antioxydante

Les résultats du pouvoir réducteur du fer (PRF) et l'activité antiradicalaire (DPPH) en fonction de différents solvants d'extraction : l'acétone 60%, le méthanol 60%, l'éthanol 60 % et l'eau sont présentés dans la **figure 13**.

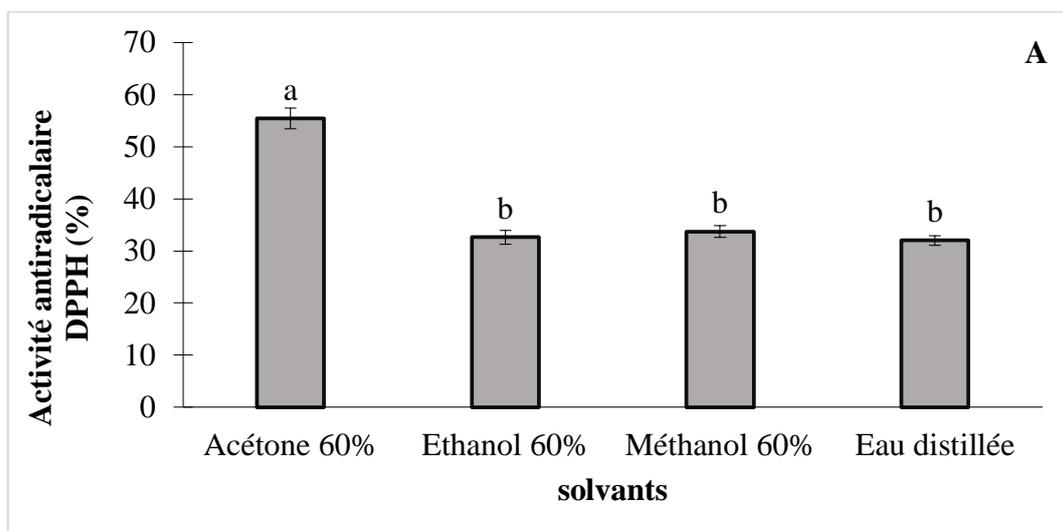


Figure 13. A. Effet de la nature de solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire des graines de pin d'Alep

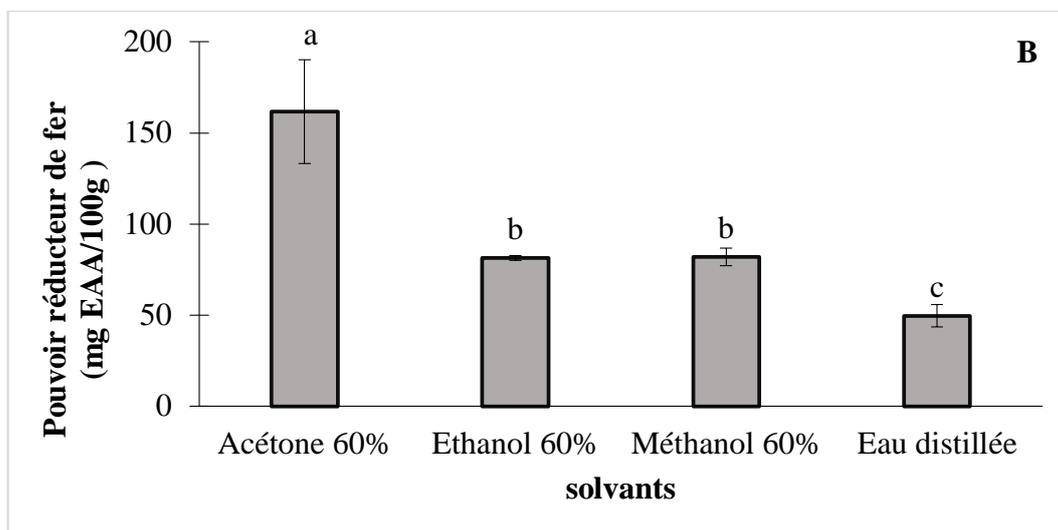


Figure 13. B. Effet de la nature de solvant d'extraction sur le pouvoir réducteur du fer des graines de pin d'Alep.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétonique à 60 % a une grande activité antioxydante avec $161,60 \pm 28,51$ mg EAA/100g pour le pouvoir réducteur du fer et $55,46 \pm 2,01$ % pour l'activité antiradicalaire DPPH. Tandis que, les extraits méthanolique à 60 % et éthanolique à 60 % ne présentent pas de différence significative pour les deux activités antioxydantes.

Néanmoins, l'extrait aqueux enregistre l'activité antioxydante la plus faible. Les résultats obtenus dans la présente étude sont en concordance avec ceux de **Duong et al., (2015)**, où l'activité antioxydante (test DPPH) des composés phénoliques des graines de soja obtenue par l'acétone, le méthanol et l'éthanol, montre que le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été observé pour l'extrait acétonique (76,4%).

Selon **Chaalal et al., (2012)**, la meilleure activité antioxydante des polyphénols à partir de la figue de Barbarie est obtenue avec l'acétone 50 % suivie par l'éthanol 50 %, le méthanol 50 % et enfin l'eau.

II. Effet de la concentration du solvant

II. 1. Polyphénols totaux

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux en fonction de différentes concentrations du solvant sélectionné dans l'étape précédente qui est l'acétone sont présentés dans la **figure 14**.

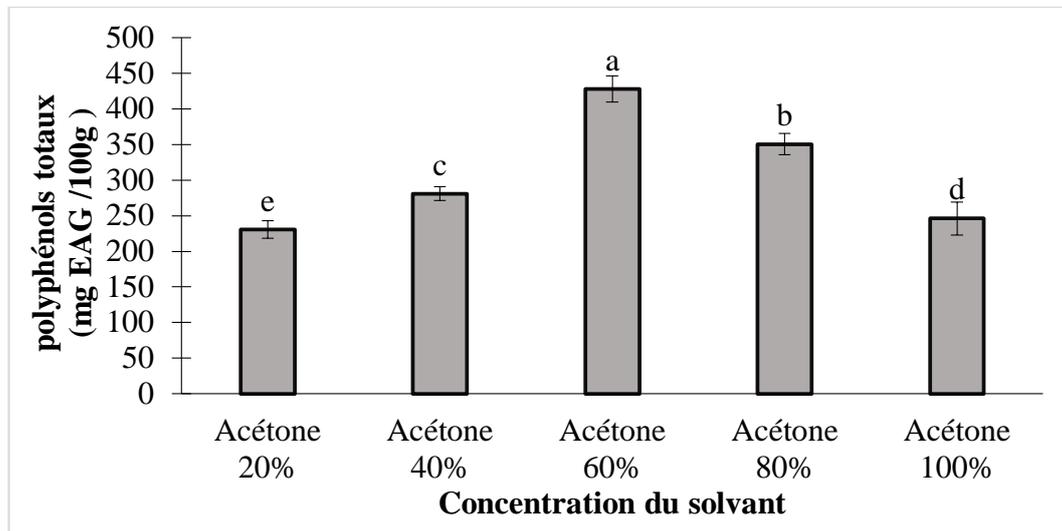


Figure 14. Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux des graines de pin d'Alep.

La teneur la plus élevée en polyphénols totaux est obtenue avec l'acétone 60 % avec une teneur de $427,80 \pm 18,29$ mg EAG/100g suivi par l'acétone 80 %, 40 %, 100 % et 20 % avec des valeurs de $350,52 \pm 14,98$; $281,06 \pm 10,00$; $246,24 \pm 23,23$ et $230,42 \pm 12,34$ mg EAG/100g de poudre, respectivement.

Les résultats obtenus montrent donc que l'acétone à 60 % est la meilleure concentration du solvant pour l'extraction des polyphénols totaux à partir des graines de pin d'Alep. Ces résultats concordent avec ceux de **Turkmen *et al.* (2006)** qui ont montré que la teneur en composés phénoliques d'extraits du thé noir augmente avec la polarité du solvant utilisé.

La faible solubilité des polyphénols totaux dans les solvants purs est due à l'incapacité de ces solvants à rompre les fortes liaisons hydrogènes formées entre les protéines et les polyphénols ; l'addition de l'eau rend ces liaisons plus sensibles, donc les polyphénols totaux plus extractibles (**Sripad *et al.*, 1982**).

II. 2. Activité antioxydante

L'effet de différentes concentrations du solvant (20, 40, 60, 80 et 100) sur l'activité antioxydante des extraits des graines de pin d'Alep est présenté dans la **figure 15**.

L'analyse statistique montre que la concentration d'acétone a un effet significatif ($p < 0,05$) sur les deux activités antioxydantes testées.

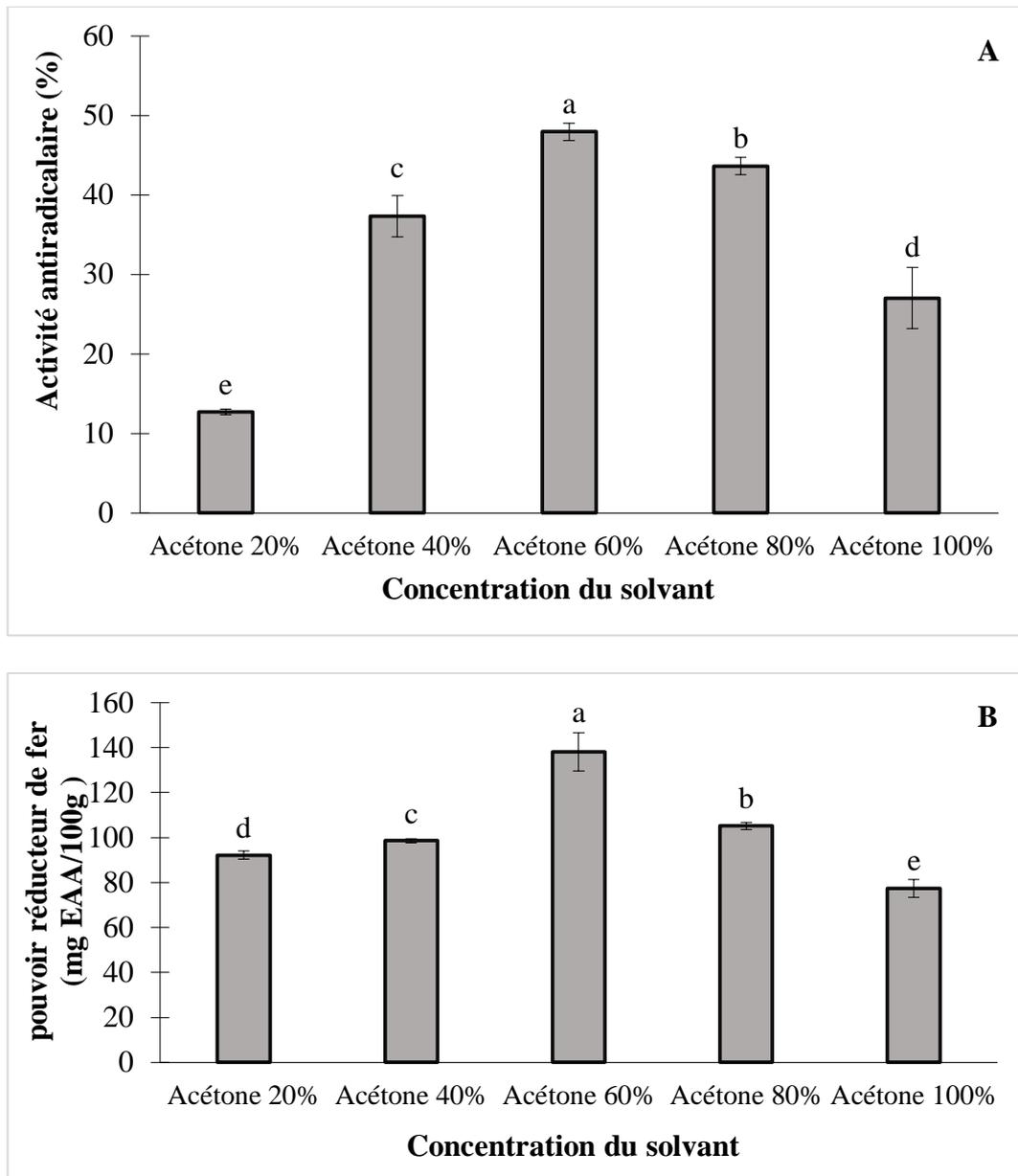


Figure 15. Effet de la concentration du solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.

Pour l'activité antiradicalaire les activités les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait d'acétone 60 % avec $47,96 \pm 1,06\%$, suivie par les concentrations d'acétone suivantes : 80, 40, 100 et 20 % avec les valeurs de $43,65 \pm 1,10$; $37,36 \pm 2,60$; $27,04 \pm 3,86$ et $12,69 \pm 0,34$ %, respectivement.

Pour le pouvoir réducteur du fer les activités les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait d'acétone 60 % avec $138,08 \pm 8,54$ mg EAA/100g suivie par les concentrations d'acétone suivantes : 80, 40, 20 et 100% avec les valeurs de $105,18 \pm 1,66$; $98,58 \pm 0,92$; $92,18 \pm 1,75$ et $77,36 \pm 3,92$ mg EAA/100g, respectivement.

Bachir bey *et al.*, (2013a,b) ont révélé une activité antioxydante élevée à 63,48% et à 60% d'acétone à partir de la figue frais et sèche, respectivement.

Turkmen *et al.* (2006) ont montré que la concentration du solvant utilisée a un effet significatif sur l'activité antioxydante d'extraits du thé noir.

L'augmentation de la polarité du solvant modifie son habilité d'extraction des composés phénoliques et influence par conséquent l'activité antioxydante des extraits (**Zhou et Yu, 2004**).

III. Effet du rapport échantillon / solvant

III. 1. Polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux en fonction des différents ratios échantillon/solvant est présentée dans la **figure 16**.

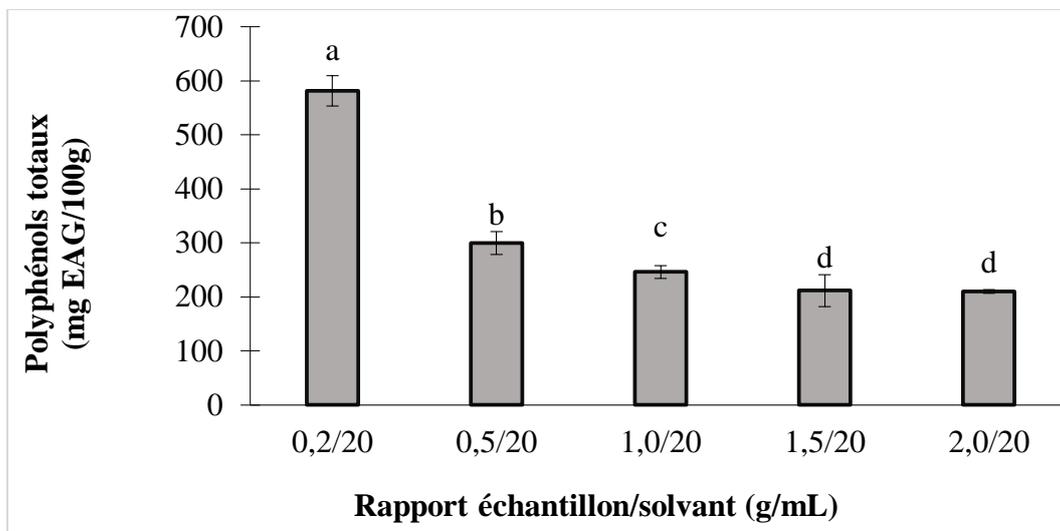


Figure 16. Effet du rapport échantillon/solvant sur l'extraction des polyphénols totaux des graines de pin d'Alep.

Les résultats obtenus montrent que la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux est obtenue avec le ratio 0,2g/20 ml avec une valeur de 581,39 ± 28,02 mg EAG/100g de poudre, suivi par les ratios 0,5g/20 ml (299,71 ± 21,03 mg EAG/100 g), 1,0g/20 ml (246,24 ± 11,53 mg EAG/100 g), 1,5g/20 ml (211,59 ± 29,54 mg EAG/100 g), 2,0g/20 ml (210,35 ± 3,28 mg EAG/100g).

L'étude statistique montre que le rapport échantillon/solvant a un effet significatif sur la teneur en polyphénols totaux des extraits.

D'après **Chaalal et al., (2012)**, le meilleur rapport échantillon/solvant pour l'extraction des polyphénols totaux à partir des graines de la figue de Barbarie est obtenu avec un ratio de 0,2g/10 ml.

Benchikh et Louailèche (2014), ont montré que le ratio échantillon/solvant de 25mg/10ml est le meilleur pour extraire une quantité optimale des polyphénols totaux à partir de la pulpe de caroube. Selon **Jerez et al., (2006)** le meilleur ratio échantillon/solvant pour l'extraire des composés phénoliques est de 1g/5ml.

III. 2. Activité antioxydante

Les résultats de l'effet de Ratio échantillon/ solvant sur l'activité antioxydante des extraits des graines du pin d'Alep sont présentés dans **la figure 17**.

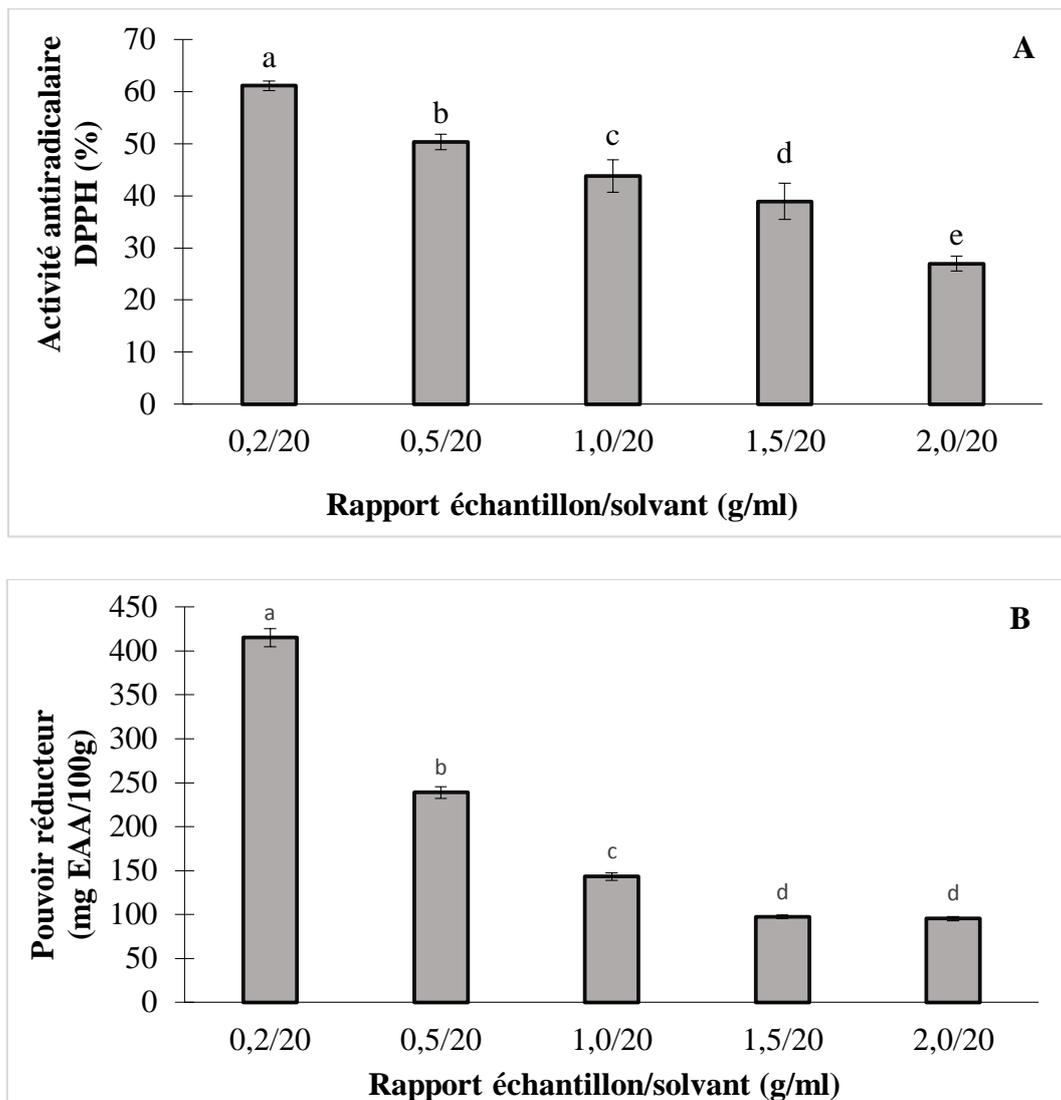


Figure 17. Effet du rapport échantillon/solvant sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.

Une forte activité antioxydante est obtenue avec le ratio 0,2g/20 ml avec $415,23 \pm 10,34$ mg EAA/100g pour le pouvoir réducteur du fer et $61,15 \pm 0,91\%$ pour l'activité antiradicalaire, suivie par les ratios : 0,5g/20 ml, 1,0g/20 ml 1,5g/20 ml et 2,0g/20 ml.

L'étude statistique montre que le rapport échantillon/solvant a un effet significatif sur l'activité antioxydante des extraits.

Jerez et al., (2006) ont rapporté que la meilleure activité antiradicalaire des extraits d'écorce de pin est obtenue avec un ratio de 1g/5 ml. Par ailleurs, la meilleure activité antioxydante est révélée avec un ratio de 0,2g/10 ml pour les graines de figue de barbarie (**Chaalal et al., 2012**). Cependant, **Bachir Bey et al., (2013)** ont trouvé que le ratio échantillon/solvant, de 1g/75 ml est le ratio qui montre une meilleure activité antiradicalaire des extraits des figes sèches (sombre et claire). Tandis que, les résultats obtenus par **Benchikh et Louailèche (2014)** ont indiqué que 25 mg /10 ml est le ratio échantillon/solvant ayant une forte activité antioxydante de la pulpe de caroube.

IV. Effet du temps d'extraction

IV. 1. Polyphénols totaux

Effet du temps d'extraction sur la teneur en polyphénols totaux des graines de pin d'Alep est présenté dans **la figure 18**.

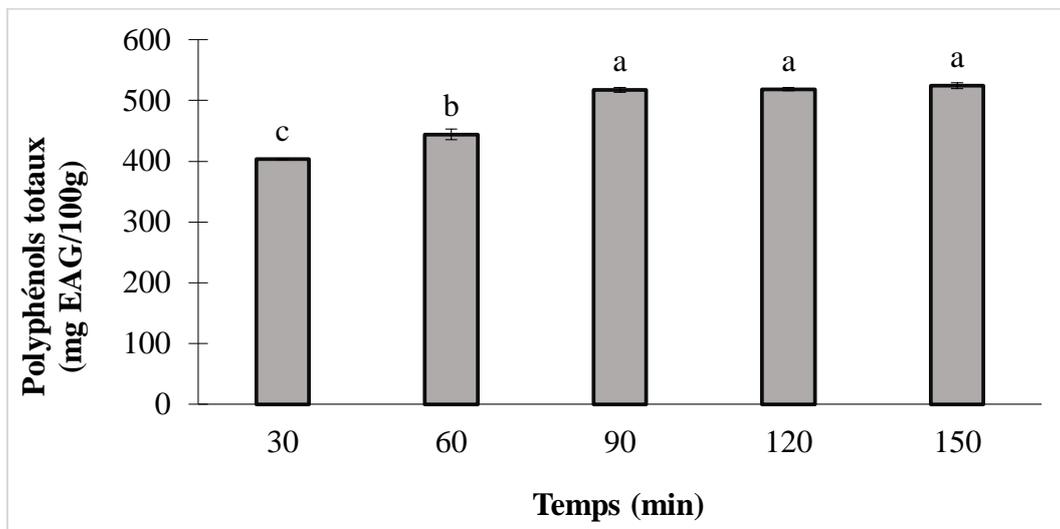


Figure 18. Effet du temps sur l'extraction des composés phénoliques des graines de pin d'Alep.

Selon les résultats obtenus, la teneur en composés phénoliques totaux des graines de pin d'Alep augmente avec l'augmentation du temps d'extraction jusqu'à 90 min puis se stabilise entre 90 min et 150 min. Les valeurs obtenues varient entre $403,73 \pm 1,33$ à $524,54 \pm 4,68$ mg EAG/100g. L'analyse statistique montre que la teneur en composés phénoliques ne présente pas de différence significative ($p < 0,05$) le temps d'extraction de 90 à 150 min. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par **Chaalal et al., (2012)**, qui ont trouvé que 90 min est le meilleur temps d'extraction des polyphénols totaux à partir des graines de la figue de barbarie.

Cependant, **Telli et al., (2010)** ont trouvé que l'évolution de la teneur en composés phénoliques totaux d'extrait hydroéthanolique (80%) à partir de dattes variété Ghars est rapide entre 30 min et 5 h, alors qu'elle est lente entre 5 h à 9 h. Tandis que, **Hammoudi (2015)**, ont rapporté que les teneurs en CPT des extraits éthanoliques de partie aérienne de *Salvia chudaei* par ultrason augmentent en fonction de la durée, et que la valeur maximale est obtenue à 40 min, tandis que une diminution est observée à 60 min.

Ces résultats montrent que la structure de la matrice des graines de pin d'Alep libère le contenu de ses polyphénols totaux rapidement, durant les premiers temps de contact avec le solvant d'extraction. Ce qui signifie qu'un temps de contact prolongé n'est pas utile pour extraire plus de polyphénols totaux des graines de pin d'Alep. Cette observation est expliquée par la deuxième loi de diffusion (loi de Fick) qui prédit un équilibre final entre les concentrations de soluté dans la matrice solide (matrice végétale) et dans le volume de solution (solvant) après un certain temps.

Néanmoins, plusieurs chercheurs ont attiré l'attention à la possibilité de l'oxydation des composés phénoliques si le temps d'extraction est long, ce qui peut mener à l'inverse des résultats escomptés (teneurs très basses). (**Nazck et Shahidi, 2004 ; Nazck et Shahidi, 2006 ; Chirinos et al., 2007 ; Druzynska et al., 2007 ; Yap et al., 2009**)

Les résultats montrent que 90 min est le meilleur temps d'extraction des composés phénoliques des graines de pin d'Alep.

IV. 2. Activité antioxydante

L'effet du temps d'extraction sur l'activité antioxydante est présenté dans la **figure 19**.

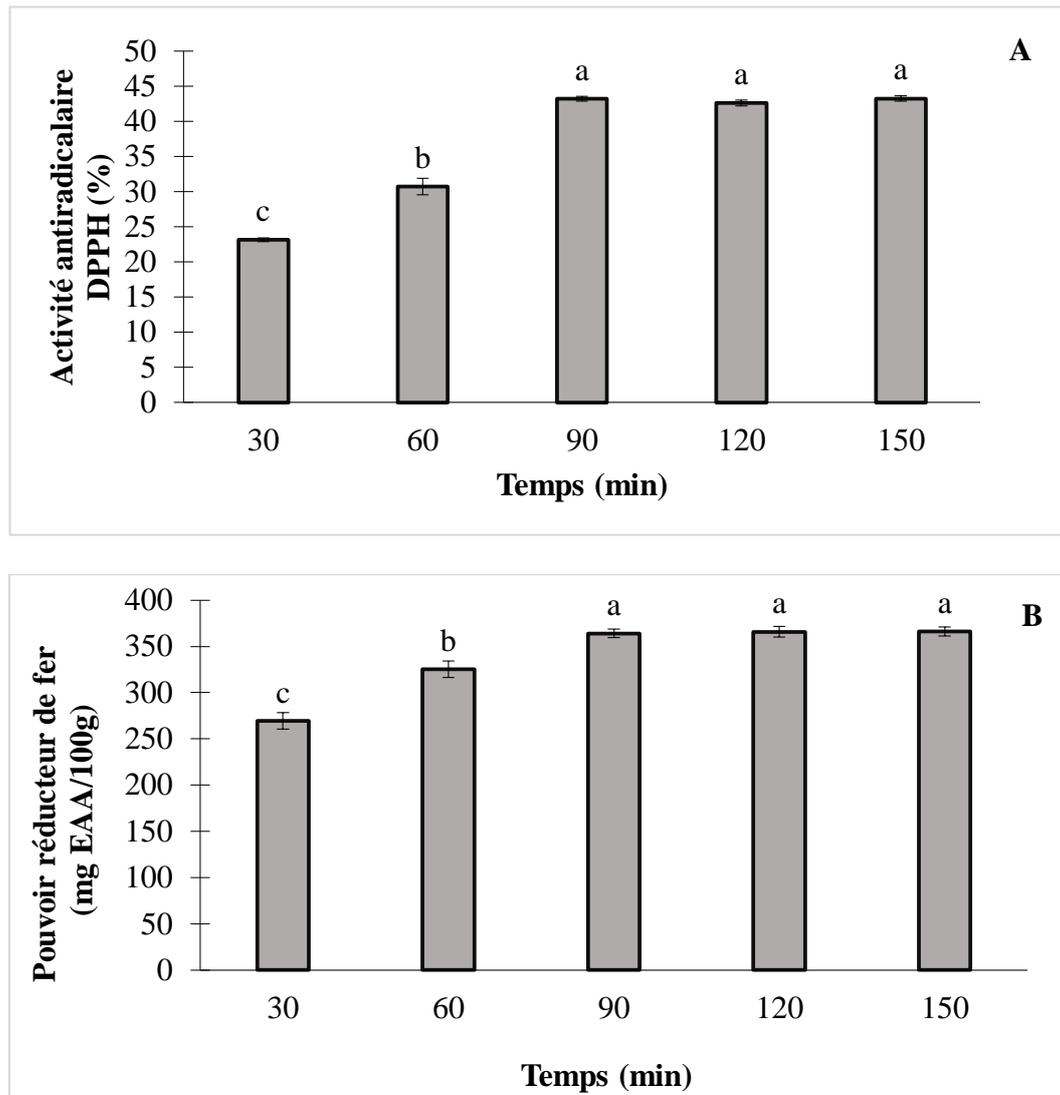


Figure 19. Effet du temps d'extraction sur l'activité antiradicalaire (A) et le pouvoir réducteur du fer (B) des graines de pin d'Alep.

Le pouvoir réducteur du fer et l'activité antiradicalaire augmentent significativement ($p < 0,05$) de $269,41 \pm 9,08$ à $364,07 \pm 4,67$ mg EAG/100g et de $23,18 \pm 0,29$ à $43,21 \pm 0,33\%$ respectivement, avec le temps d'extraction de 30 à 90 min.

Selon **Bachir bey et al. (2013)**, un temps de 120 minutes est le temps qui montre une forte activité antioxydante des extraits de la figue sèche (sombre et claire).

Cependant, **Mussatto et al. (2011)** ; **Chaalal et al. (2012)** ; **Benchikh et Louailèche (2014)**, ont trouvé que 90 min est le temps qui montre une forte activité antioxydante pour les extraits des graines de café, des graines de la figue de barbarie et de la pulpe de caroube, respectivement.

V. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydante

V.1. Corrélation entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer

La corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer des extraits de la poudre des graines de pin d'Alep sous l'effet des paramètres étudiés précédemment est présentée dans la **figure 20**.

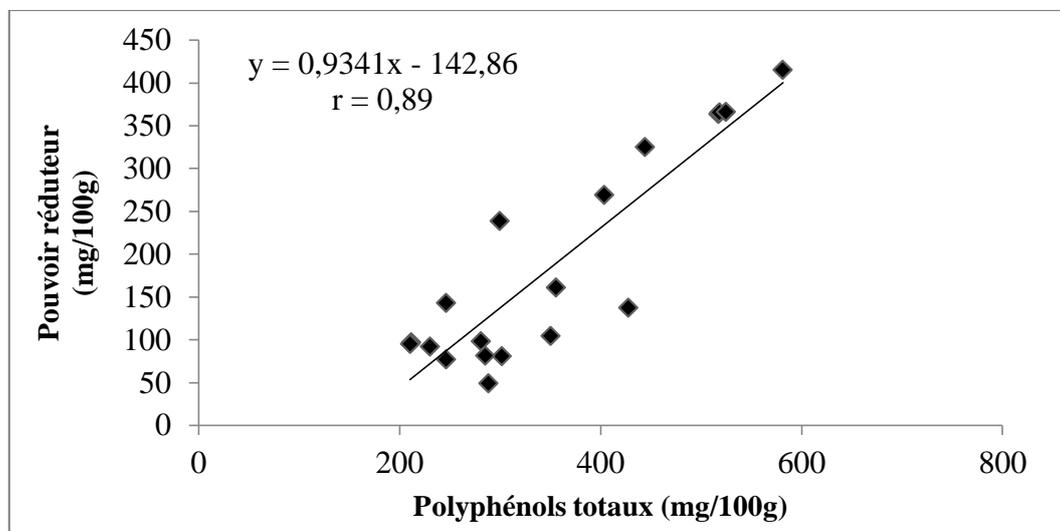


Figure 20. Corrélation entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer.

Sous l'effet de différents paramètres d'extraction (nature de solvant, la concentration du solvant, le ratio échantillon/ solvant, le temps d'extraction), la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer des extraits de la poudre des graines de pin d'Alep est positive ($r = 0,89$). Les résultats obtenus peuvent être expliqués par la contribution des polyphénols totaux dans l'activité antioxydante. Ceci indique que les extraits phénoliques de la poudre des graines de pin d'Alep ont une bonne capacité à réduire les oxydants.

Chaalal et al., (2012), ont trouvée également une corrélation positive entre les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur du fer des extraits des graines de la figue de barbarie, sous différents paramètres d'extraction.

En outre, **Makris et al., (2007)**, ont indiqué une bonne corrélation entre les polyphénols totaux extraits de la caroube et leur pouvoir réducteur du fer.

V.2. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire

La corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire (DPPH) des extraits de la poudre des graines de pin d'Alep sous l'effet des paramètres étudiés précédemment est présentée dans la **figure 21**.

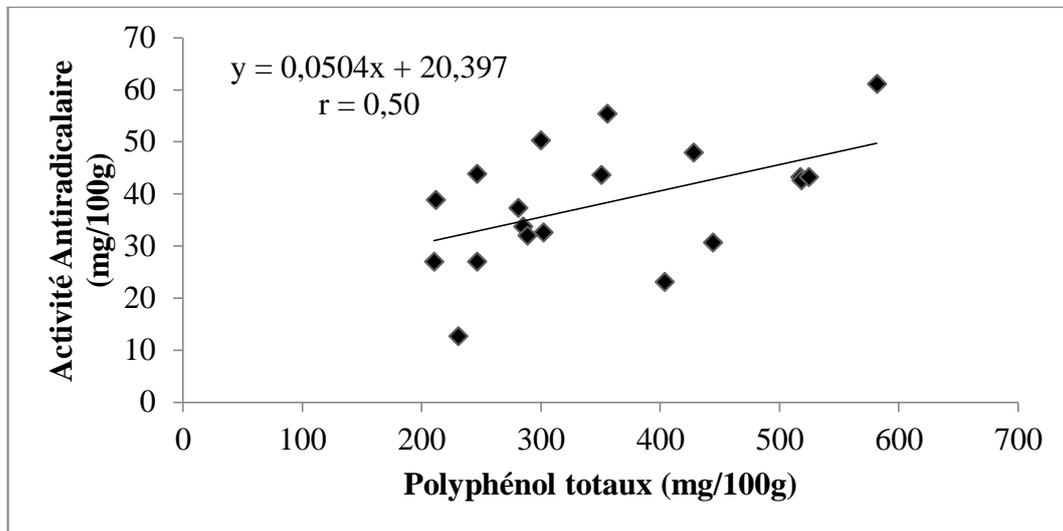


Figure 21. Corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire DPPH.

Les résultats obtenus révèlent une corrélation positive entre les polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire ($r=0,50$) des extraits de la poudre des graines de pin d'Alep. Ceci indique que les polyphénols totaux de la poudre des graines de pin d'alep ont une capacité à piéger les radicaux libres.

Rocha-Guzman et al., (2007), ont rapporté que l'activité antiradicalaire des extraits acétonique des graines d'haricot présente une grande corrélation avec la teneur en polyphénols totaux. Selon **Fernández López et al., (2010)**, l'activité antioxydante de la figue de Barbarie cultivée en Espagne est positivement corrélée avec les teneurs en composés phénoliques des extraits. **Zam et al., (2012)**, ont rapporté que l'activité de piégeage des radicaux(DPPH) d'extraits de l'écorce de grenade montre une relation linéaire avec les polyphénols ($r = 0,946$). Cependant, **Bourgou et al., (2006)**, ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante d'extraits de *nigelle sativa L.*

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'optimisation des conditions d'extraction est essentielle dans le but d'augmenter la teneur en composés phénoliques. Les effets de la concentration du solvant, du rapport échantillon/solvant sur l'extraction des composés phénoliques des graines de pin d'Alep ont été déterminés. Les résultats montrent que tous les paramètres expérimentaux étudiés ont des effets significatifs ($p < 0,05$) sur l'extraction de ces composés, ainsi que sur l'activité antioxydante (DPPH et pouvoir réducteur de fer) des extraits.

Les meilleures conditions d'extraction des polyphénols à partir des graines du pin d'Alep sont : l'acétone 60%, le rapport échantillon/solvant à 0,2 g/20 ml et temps d'extraction 90 min, avec des valeurs de 524,54 mg EAG/100g pour les polyphénols totaux, 366,23 mg EAA/100g pour le pouvoir réducteur du fer et 43,27% pour l'activité antiradicalaire (DPPH).

Les résultats obtenus révèlent également une corrélation positive entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antioxydante des extraits de la poudre des graines de pin d'Alep, avec des coefficients de corrélation $r = 0,89$ et $r = 0,50$ entre les teneurs en composés phénoliques totaux et le pouvoir réducteur de fer et les teneurs en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire DPPH, respectivement.

À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, on peut conclure que les graines de pin d'Alep peuvent être considérées comme une source naturelle de polyphénols qui présente une bonne capacité antioxydante.

Dans le but de compléter cette étude, Il serait vraiment intéressant :

- D'étudier l'effet d'autres paramètres influençant l'extraction des polyphénols tels que l'effet de température, l'effet de l'agitation, la taille des particules de l'échantillon et le pH de solvant,
- D'utiliser des modèles mathématiques pour l'optimisation des conditions d'extractions des polyphénols totaux tels que le plan d'expérience ;
- De déterminer les profils phénoliques des graines de pin d'Alep en utilisant HPLC-MS/MS.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N. et Omar, A. K. M. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117: 4, p 427-428.
- Bachirbey M., Louaileche H. et Zemouri S. (2013b).** Optimization of Phenolic Compound Recovery and Antioxidant Activity of Light and Dark Dried Fig (*Ficus carica* L.) Varieties. *Food Science and Biotechnology*, 6: 1613-1619.
- Bachirbey M., Meziant L., Benchikh Y. et Louaileche H. (2013a).** Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. *Azenjar*) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 162, 277-282.
- Bellahouel S. (2012).** Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèces de Terfez : *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon et *Terfezia le ptoderma* Tul. *Thèse de doctorat* : en Biologie. Université Ahmed Ben Bella, Oran.
- Benamor B. (2008).** Maîtrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans les Opérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC. *Thèse de Doctorat*, Université de La Rochelle.
- Benchikh Y. et Louailèche H. (2014).** Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 161 : 175-181.
- Bentouati A. (2006).** Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill) du massif de de Ouled Yagoub (Khenchla – Aurès). *Thèse de doctorat* : d'Etat en sciences agronomiques. Université El Hadj Lakhdar-Batna, p 5.
- Boizot N. et Charpentier J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
- Boudy P. (1955).** Economie forestière nord-africaine. Tome 4 : Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Lrose, Paris, 483 p.
- Boulaacheb N. (2009).** La résine de *pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la population de la petite kabylie (algerie, nord afrique). *Acta Horticulturae*, 853 : 435-438 .
- Bourgou S., Ksouri R., Kchouk M. E., Chedly A. et Mazouk B. (2006).** Effet du solvant d'extraction sur l'estimation de l'activité antioxydant chez *Nigella sativa* L. *Revue des Régions Arides*, 1: 93-97.

- Chaalal M., Touati N. et Louaileche H. (2012).** Extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Botanica Gallic*, 159: 467–475.
- Cheikh-Rouhou S., Hentati B., Besbes S., Blecker C., Deroanne. et Attia H. (2006).** "Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia". *Food Science and Technology International*, 12 : 407-415.
- Chira K., Suh J. H., Saucier C. et Teissèdre P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 : 75-82.
- Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. et Larondelle Y. (2007).** Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Journal of Separation and Purification Technology*, 55: 217-225.
- Congo M. (2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae). Thèse de doctorat : pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso, 42 p.
- Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12:564-582.
- Derbal W., Zerizer A., Gérard J. et Guibal D. (2015).** Caractérisation d'aboutages à entures multiples pour trois essences d'Algérie. *Bois et forêts des tropiques*, 325: 59-70.
- Derouche H. (2015).** Télédétection et analyse des dépérissements des forêts Naturelles en zone semi-aride (Djelfa). Thèse de doctorat : en Sciences Agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach-Alger, p 198.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouma D., Stocker P. et Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- Djerrad., Kadik L. et Djouahri A. (2015).** Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. Essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 74:440–449.
- Dhanani T., Sonal T., Gajbhiye N. A. et Satyanshu K. (2013).** Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10: 1193-1199.
- Draye M., Estager J., Malacria M., Goddard J. P. et Ollivier C. (2009).** Sonochimie Organique (K1250). Editions Techniques de l'Ingénieur, France.

- Druzynska B., Stepniewska A., Wolosiak R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6: 27-36.
- Duong T., Phan T., Ha T. (2015).** Effects of extraction process on phenolic content and antioxidant activity of soybean. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3(1-2): 33-38.
- Fady B., Semerci H., et Vendramin G. G. (2003).** EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and Brutia pine (*Pinus brutia*). *Biodiversity International*, p 6.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karry-Bouraoui N., Trablsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2007).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol*, 331: 372-379.
- Feikh N. (2014).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algérie. Thèse de Doctorat : Chimie Organique Appliquée. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, p 47-48.
- Fernández-López J. A., Almela L., Obón J. M. et Castellar R. (2010).** Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Human and Nutrition*, 65: 253-259.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A, Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15(12): 8813-8826.
- Groubert A. (1984).** Techniques d'extraction végétale: Montpellier, pharmacie
- Guignard J. (1996).** Biochimie végétale. Ed. Lavoisier, Paris. P 175-192.
- Gülçin İ., Oktay M., Kirreççi E. et Küfrevioğlu I. (2003).** Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83 : 371-382.
- Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G. et Rakesh D. D. (2008).** Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, 357.
- Hammoudi R. (2015).** Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 166 p.
- Haslam E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59:67-202.

- Jacues et Brosse. (2003).** Larousse des arbres dictionnaire des arbres et des arbustes. Edition Rustica/ FLER, Paris p 325. N° de l'éditeur, 48396N1 (F12062).
- Jerez M., Pinelo M., Sineiro J. et Nunez M. J. (2006).** Influence of extraction conditions on phenolics yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, 94: 406-414.
- Kabera J. N., Semana E., Mussa A. R., et He X. (2014).** Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392.
- Kadri N., Khettal B., Adjebli A., Cresteil T., Yahiaoui-Zaidi R., Barragan-Montero V. et Montero J. L. (2014).** Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. Seeds. *Industrial Crops and Products*, 54: 6-12.
- Karağozler A., Erdag B. et Çalmaz Emek Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Kashif A., Shahbaz H. M. et Kwon J. (2017).** Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 295-315.
- King J. W. et Grabiell R. D. (2007).** Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing subcritical water. Espacenet, US7208181. United States.
- Lazrec F. (2015).** Importance de la fonte de semis du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans le Nord-Ouest Algérien: Identification morphologique et moléculaire des espèces du genre *Fusarium* et *Globosporangium*, pouvoir pathogène et moyens de lutte. Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Université Abou Bekre Belkaid-Tlemcen, p 187.
- Leybros J. et Frémeaux P. (1990).** Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, génie des procédés.
- Macleod J. I. et Troconis N. G. (1982).** Volatile flavour components of mango fruit. *Phytochemistry*, 21: 2523-2526.
- Maestrea F. T., Cortina J., Bautista S. et Bellota J. (2003).** Does *Pinus halepensis* facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations?. *Forest Ecology and Management*, 176:147-160.
- Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature et Technologie*, 2: 35-40.

- Makris D. P., Boskou G. et Andrikopoulos N. K. (2007).** Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and otheragri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 125-132.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. et Jiménez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5): 727-747.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89 (3) : p 411-420.
- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie*, 51 : 304 – 315.
- Michel T. (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Doctorat. Université d'Orléans, Orléans, France. p 257.
- Minervini F., Missaoui J., Celano G., Calasso M., Achour L., Saidane D., Gobbetti M. et Angelis M. (2020).** Use of Autochthonous Lactobacilli to Increase the Safety of Zgougou. *Microorganisms*, 8: 29.
- Mumper R. J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2011).** Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83: 173-179.
- Nacz M. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- Nahal I. (1962).** Etude taxonomique, phytogéographique écologique et sylvicole. in école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences.
- Nazck M. et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Nergiz C. et Dönmez İ. (2004).** Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food chemistry*, 86: 365-368.
- Nicola E. D., Owen J. C., J. G., Rosemary F. W., Kevin A. M., Yeap F. et Nigel B. P. (2007).** Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 101: 1417-1424.

- Petti S. et Sculy C. (2009).** Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37: 413-423.
- PHE Q., LV Y. et Yao K. (2007).** Effects of tea polyphenols on the activities of α - amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101: 1178-1182. **Pronyk C. et Mazza G. (2009).** Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of food engineering*, 95 : 215-226.
- Quezel P. (1986).** Les pins du groupe Halepensis| Ecologie,Végétation, Ecolphysiologie. CIHEAM, Options Méditerranéennes, p 11 -23.
- Rajbhar K., Dawda H. et Mukundan U. (2014).** Polyphenols: Methods of Extraction. *Scientific reviews and Chemical Communications*, 5(1): p 1-6.
- Ramos L., Kristenson E. M. et Brinkman U. A. T. (2002).** Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of chromatography.A*, 975: 3-29.
- Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L., Avdalovic N. et Pohl C. (1996).** Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation analytical chemistry, 68: 1033-1039.
- Rocha-Guzman N. E., Herzog A., Gonzalez-Laredo R. F., Ibarra-Pérez F. J., Zambrano-Galvan G. et Galegos-Infante J. A. (2007).** Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups on common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, 103: 521-527.
- Sadou N., Seridi R., Djahoudi A. et Hadeff Y. (2015).** Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 30(1): 33-39.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*,30: 3875-3883.
- Silva E. M., Rogez H. et Pompeu D. R. (2009).** Optimisation of extraction of phenolics from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, 100: 6076-6082.
- Singleton V. L. et Rossi J. A. j. (1965).** Colorunetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*,16 : 85-144.
- Sripad G., Rrakash V., Narasinga Rao M. S. (1982).** Extractability of polyphenols of Sunflower seed in various solvents. *Journal of Biosciences*, 4: 145-152.

- Stalikas C. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18): 3268-3295.
- Stoclet J., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M., El Bedoui J., Chataigneau M. et Schini-Kerth B. (2004).** Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500: 299-313.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. et Polissiou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*, 90: 333-340.
- Turkmen N., Sari F. et Velioglu Y. S. (2006).** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99: 835-841.
- Waksmundzka-Hajnos M. et Sherma J. (Eds.). (2011).** High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. CRC Press p 478.
- Wang L. et Weller C. L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech*, 17(6) : 300–312.
- Wong C. C., Li H. B., Cheng K. W. et Chen F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705-711.
- Yap C. F., Chun Wai H., Wan mustapha W. A., Chan S. W., Lee C. Y. et Leong Y. S. (2009).** Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (*Averrhoa carambola* L.) Residues. *Sains Malaysiana*, 38(4): 511-520.
- Yilmaz Y. et Toledo R. T. (2006).** Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by product and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 41-44.
- Zam W., Bashour G., Abdelwahed W. et Khayata W. (2012).** Effective extraction of polyphénols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 675-682.
- Zhou K. et Yu L. (2004).** Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 37: 717-721.

Annexe

Annexe

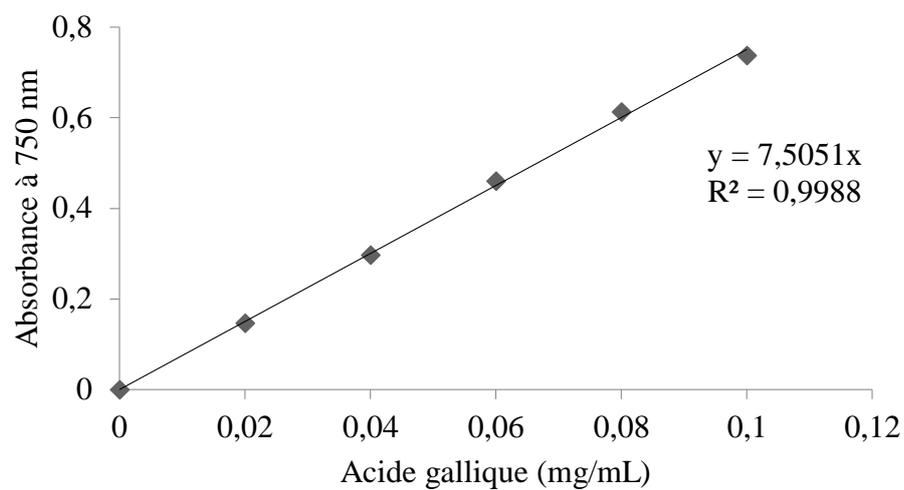


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols

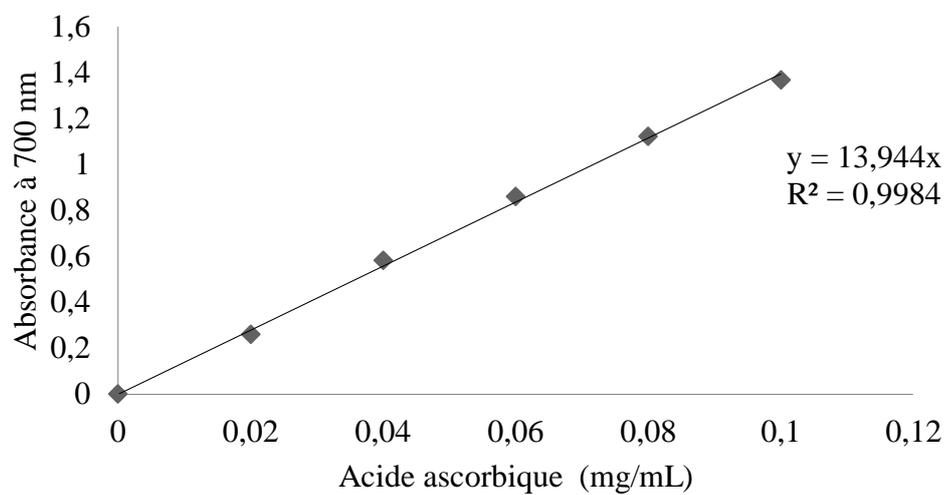


Figure 2 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur.

Résumé

Le pin d'Alep est une espèce appartenant exclusivement au bassin méditerranéen, il est considéré comme une source importante de composés bioactifs qui possède plusieurs vertus grâce à sa richesse en composés phénoliques. Le processus d'extraction des polyphénols est également affecté par plusieurs facteurs, notamment : nature et concentration de solvant, temps et la température. Le présent travail a pour objectif de déterminer les conditions d'extraction optimales des composés phénoliques à partir des graines de pin d'Alep et d'évaluer leur activité antioxydante sous l'effet des paramètres suivants : le type de solvant (acétone 60, méthanol 60%, éthanol 60% et l'eau distillée), la concentration du solvant (20%, 40%, 60%, 80%, 100%), le rapport échantillon / solvant (0,2g/20 ml, 0,5g/20 ml, 1g/20 ml, 1,5g/20 ml, 2g/20 ml). Les résultats obtenus montrent que les conditions d'extraction ont un effet significatif ($p < 0,05$) sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits et que les meilleures conditions d'extraction sont les suivantes : acétone 60%, 0,2g/20 ml, 90 min. Les résultats montrent également que le pouvoir réducteur et l'activité antiradicalaire sont positivement corrélés avec les teneurs en polyphénols totaux avec $r=0,89$ pour le PRF et $r= 0,50$ pour AAR (DPPH).

Mots-clés : Conditions d'extraction ; composés phénoliques, activité antioxydante ; graines de pin d'Alep.

Abstract

The Aleppo pine is a species belonging exclusively to the Mediterranean basin, it is considered an important source of bioactive compounds which has several virtues thanks to its richness in phenolic compounds. The process of polyphenol extraction is also affected by several factors, including: nature and concentration of solvent, time and temperature. The objective of this work is to determine the optimal conditions for the extraction of phenolic compounds from the seeds of Aleppo pine and to evaluate their antioxidant activity under the effect of the following parameters: the type of solvent (acetone 60, methanol 60%, 60% ethanol and distilled water), solvent concentration (20%, 40%, 60%, 80%, 100%), sample / solvent ratio (0.2g / 20ml, 0.5g / 20ml, 1g / 20ml, 1.5g / 20ml, 2g / 20ml). The results obtained show that the extraction conditions have a significant effect ($p < 0.05$) on the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of the extracts and that the best extraction conditions are as follows: acetone 60%, 0.2g / 20ml, 90 min. The results also show that the reducing power and anti-free radical activity are positively correlated with the total polyphenol contents with $r = 0.89$ for PRF and $r = 0.50$ for AAR (DPPH).

Keywords: Extraction conditions; phenolic compounds, antioxidant activity; Aleppo pine seeds.

ملخص

يعتبر صنوبر حلب من الأنواع التي تنتمي حصرياً إلى حوض البحر الأبيض المتوسط ، ويعتبر مصدراً مهماً للمركبات النشطة بيولوجياً التي لها العديد من المزايا بفضل ثرائها بالمركبات الفينولية. تتأثر عملية استخلاص البوليفينول أيضاً بعدة عوامل ، منها: طبيعة وتركيز المذيب والوقت ودرجة الحرارة. الهدف من هذا العمل هو تحديد الظروف المثلى لاستخراج المركبات الفينولية من بذور الصنوبر الحلبي وتقييم نشاطها المضاد للأكسدة تحت تأثير العوامل التالية: نوع المذيب (أسيتون 60% ، ميثانول 60% ، 60% إيثانول وماء مقطر) ، تركيز مذيب (20% ، 40% ، 60% ، 80% ، 100%) ، عينة / نسبة مذيب (0.2 غ / 20 مل ، 0.5 غ / 20 مل ، 1 غ / 20 مل ، 1.5 غ / 20 مل ، 2 غ / 20 مل). بينت النتائج التي تم الحصول عليها أن شروط الاستخلاص لها تأثير معنوي ($p < 0.05$) على محتوى المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات وأن أفضل شروط الاستخراج هي كما يلي: الأسيتون 60% ، 0.2 غ / 20 مل ، 90 دقيقة. أظهرت النتائج أيضاً أن قوة الاختزال والنشاط المضاد للجذور الحرة يرتبطان ارتباطاً إيجابياً بمحتويات البوليفينول الإجمالية مع $r = 0.89$ لـ PRF و $r = 0.50$ لـ AAR (DPPH).

الكلمات المفتاحية: شروط الاستخراج. مركبات الفينول ونشاط مضادات الأكسدة. بذور الصنوبر الحلبي.