



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR ENVIRONNEMENT

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE ACADEMIQUE :

2019-2020

N° D'ORDRE : 0349/2021

N° CARTE D'ETUDIANT :

CI01414003548

MASTER

Physique chimie appliquée

Option : Environnement

THEME :

**Optimisation par un plan d'expérience des
conditions d'extraction des flavonoïdes et des
antioxydants des feuilles d'*Alchornea cordifolia***

LABORATOIRE :
Laboratoire des sciences et
Technologies de
l'Environnement

Présenté par :

N'DRIN Amenan Ruth

JURY

Président : M. BARIMA Yao Sadaïou Sabas, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Directeur : M. KONAN Kouakou Séraphin, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Encadreur : M. KOFFI N'Dri Emmanuel, Maître-Assistant,
Ecole Normale Supérieure (ENS)

Examineur : M. KOUADIO David Léonce, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Soutenu publiquement

le : 27/02/2021

DEDICACES

Je dédie ce document :

- *A la mémoire de ma mère que je ne saurai oublier,*
- *A mon père, pour tous les sacrifices qu'il fait pour moi,*
- *A mes frères et sœurs,*
- *A mes amis(es).*

REMERCIEMENTS

La présente étude n'aurait pu se réaliser sans la contribution de certaines personnes que je remercie.

J'exprime ma considération distinguée aux autorités de l'Université Jean Lorougnon Guédé, avec à leur tête le Professeur **TIDOU Abiba Sanogo Epouse KONE**, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, pour leur dévouement dans la formation des étudiants.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur **KOUASSI Kouakou Lazare**, Directeur de l'UFR Environnement à l'Université Jean Lorougnon GUEDE de Daloa pour sa gratitude, sa disponibilité et pour tout ce qu'il fait pour notre UFR.

J'adresse mes remerciements au Docteur **KONAN Kouakou Séraphin**, Maître de Conférences pour avoir accepté la direction scientifique de ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

J'exprime ma reconnaissance au Docteur **ADIMA Augustin**, Maître de Conférences à l'INP-HB de Yamoussoukro, Directeur de l'Unité de Recherche de Chimie de l'Eau et des Substances Naturelles (UCESNA), qui nous a ouvert les portes du Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles.

Mes remerciements à l'endroit du Docteur **KOFFI N'Dri Emmanuel**, Maître-Assistant à l'Ecole Normale Supérieure d'Abidjan (ENS), pour avoir accepté l'encadrement de ce travail de Master. Sa disponibilité, ses critiques constructives, sa patience, ses conseils, ses suggestions, sa rigueur ainsi que son sens du travail bien fait m'ont permis de bien mener ce travail. Je tiens à lui exprimer mes vifs remerciements et une reconnaissance inconditionnelle pour l'élaboration de ce mémoire de fin de cycle de Master.

Je remercie également Monsieur **N'DA Philippe**, Ingénieur de recherche au laboratoire des substances naturelles de l'INPHB pour ses précieux conseils ainsi que pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont il a fait preuve durant notre stage.

Toute ma reconnaissance aux techniciens de LAPISEN qui ont été présents toutefois les où je les ai sollicités. Ce sont Monsieur **OBLE Jean** et Monsieur **YAO Koffi Aimé**.

Mes remerciements vont également à l'endroit des membres du Jury qui ont bien voulu apporter leur contribution pour l'amélioration de ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à tout le corps enseignant de l'Université Jean Lorougnon GUEDE de Daloa précisément aux enseignants du Département Physique Chimie Mathématique Informatique (MPCI) pour leur rigueur dans le travail.

Mes remerciements les plus vifs vont particulièrement à l'endroit de mes parents ainsi qu'à mes frères et sœurs. Leur soutien moral, financier et spirituel tout le long de ces années académiques m'ont été indispensables. J'espère que ce travail leur apportera une satisfaction.

Je ne saurais oublier les bienfaits de mon tuteur Monsieur **LADJI Moussa** et son épouse **SISSOKO Maïmouna** pour leur hospitalité, leur accueil chaleureux et leur soutien durant toutes ces années universitaires. Je vous suis infiniment reconnaissante.

Mes remerciements à l'endroit de **M^{lle} KOUAKOU Marie-France** qui m'a hébergée pendant toute la période de mon stage à Yamoussoukro. Les simples mots ne sauraient totalement rendre témoignage de ma reconnaissance envers toi.

Mes pensées vont aussi à l'endroit de tous mes amis de Master II Physique-Chimie pour leur collaboration et en particulier à **TIE Bi Ange** et **GOULEDEHI Gilles** pour leur soutien tout le long de ce travail.

J'adresse mes remerciements à mon ami **EHOUMAN Wilfred** pour son aide, ses conseils et son apport sans faille dans l'élaboration de ce travail.

Enfin, que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouvent, ici, l'expression de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

Page

LISTE DES ABREVIATIONS-----	iv
LISTE DES TABLEAUX-----	v
LISTE DES FIGURES-----	vi
LISTE DES ANNEXES-----	vii
INTRODUCTION-----	1
PARTIE I : GENERALITES-----	3
I.1. <i>Alchornea cordifolia</i> -----	3
I.1.1. Taxonomie-----	3
I.1.2. Noms vernaculaires-----	3
I.1.3. Description botanique-----	3
I.1.4. Répartition géographique-----	4
I.1.5. Usages traditionnels-----	5
I.1.6. Propriétés pharmacologiques-----	5
I.1.7. Composition phytochimique-----	6
I.2. Antioxydants naturels-----	6
I.2.1. Antioxydants enzymatiques-----	6
I.2.2. Antioxydants non enzymatiques-----	7
I.2.2.1. Glutathion réduit-----	7
I.2.2.2. Oligoéléments-----	7
I.2.2.3. Vitamines-----	8
I.2.2.4. Caroténoïdes-----	8
I.2.2.5. Polyphénols-----	8
I.3. Flavonoïdes-----	9
I.3.1. Activité biologique des flavonoïdes-----	10
I.3.2. Activité antioxydante des flavonoïdes-----	10
I.4. Méthodes d'extraction des molécules bioactives-----	10
I.5. Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes à l'aide de plans d'expérience-----	11
I.5.1. Notion de plans d'expériences-----	11
I.5.1.1. Notion d'espace expérimental-----	12
I.5.1.2. Notion de modélisation mathématique-----	12

I.5.2. Différents types de plans d'expériences	13
I.5.3. Travaux antérieurs	15
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	16
II.1. Matériel	16
II.1.1. Matériel végétal	16
II.1.2. Matériel de laboratoire	16
II.1.3. Produits chimiques	17
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Préparation des extraits	17
II.2.2. Criblage phytochimique	18
II.2.2.1. Mise en évidence des polyphénols	18
II.2.2.2. Mise en évidence des flavonoïdes	18
II.2.2.3. Mise en évidence des tanins	18
II.2.2.4. Mise en évidence des saponosides	18
II.2.2.5. Mise évidence des quinones	19
II.2.2.6. Mise en évidence des alcaloïdes	19
II.2.2.7. Mise en évidence des polyterpènes et stérols	19
II.2.3. Optimisation des conditions d'extraction des composés bioactifs	19
II.2.3.1. Etude préliminaire des paramètres technologiques	19
II.2.3.2. Application du plan central composite	21
II.2.4. Analyse quantitative des extraits	22
II.2.4.1. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux	22
II.2.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test TEAC	23
II.2.5. Détermination des caractéristiques physico-chimiques de l'extrait optimisé	23
II.2.5.1. Détermination du pH	23
II.2.5.2. Détermination de la conductivité	24
II.2.5.3. Détermination du taux de matières sèches	24
II.2.5.4. Détermination du degré Brix (°Brix)	24
II.2.5.5. Dosage des éléments minéraux présents dans l'extrait optimisé	24
II.3. Analyses statistiques	25
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	26

III.1. Détermination de la composition phytochimique et les conditions optimales d'extrait de feuilles d' <i>Alchornea cordifolia</i> -----	26
III.1.1. Composition phytochimique d'extrait de feuilles d' <i>Alchornea cordifolia</i> -----	26
III.1.2. Détermination des conditions optimales -----	27
III.1.2.1. Effet de la taille des feuilles sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits -----	27
III.1.2.2. Effet du solvant d'extraction sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits -----	28
III.1.2.3. Effet du mode d'extraction sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits -----	29
III.1.2.4. Effet du ratio sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits ---	30
III.1.2.5. Cinétique de diffusion des flavonoïdes totaux dans le milieu d'extraction -----	31
III.2. Optimisation des conditions d'extraction par un plan central composite -----	32
III.3. Validation expérimentale des conditions optimales d'extraction -----	36
III.4. Caractéristiques physico-chimiques et composition minérale de l'extrait optimisé -----	36
III.4.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait optimisé -----	36
III.4.2. Composition minérale de l'extrait optimisé -----	37
CONCLUSION -----	39
REFERENCES -----	40
ANNEXES -----	49

LISTE DES ABREVIATIONS

AAO : Activité Antioxydante

ABTS : Acide 2,2' azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

LAPISEN : Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles

MS : Matière sèche

OMS : Organisation mondiale de santé

PCC : Plan Central Composite

RMS : Méthodologie de surface de réponse

ROS : substances d'oxygène réactives

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Capacité Antioxydante en Equivalent Trolox).

LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau I : Différents types de plans d'expériences -----	14
Tableau II : Niveaux des paramètres expérimentaux du plan central composite -----	21
Tableau III : Plan d'exécution du plan central composite -----	22
Tableau IV : Métabolites secondaires identifiés dans les extraits d' <i>A. cordifolia</i> -----	26
Tableau V : Matrice expérimentale et résultats expérimentaux du plan central composite ----	33
Tableau VI : Valeurs des coefficients affectés aux variables des réponses Y 1 et Y2 -----	34
Tableau VII : Valeur prédite et expérimentale des réponses -----	36
Tableau VIII : Paramètres Physico- chimiques de l'extrait optimisé -----	36
Tableau IX : Teneur en minéraux de l'extrait optimisé -----	37

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Feuilles d' <i>Alchornea cordifolia</i>	4
Figure 2 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives	7
Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes	9
Figure 4 : Structures de base des principaux flavonoïdes	9
Figure 5 : Domaine de variation du facteur.....	12
Figure 6 : Matériel végétal (les feuilles d' <i>A cordifolia</i>)	16
Figure 7 : Effet de la taille des feuilles sur l'extraction des flavonoïdes totaux.....	28
Figure 8 : Effet du solvant sur l'extraction des flavonoïdes totaux	28
Figure 9 : Effet du mode sur l'extraction des flavonoïdes totaux.....	30
Figure 10 : Effet du ratio sur l'extraction des flavonoïdes totaux	31
Figure 11 : Cinétique de la diffusion des flavonoïdes totaux.....	32
Figure 12 : Influence des différents paramètres sur l'extraction des flavonoïdes totaux	35
Figure 13 : Influence des différents paramètres sur l'extractions des antioxydants	35

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (Flavonoïdes totaux)

Annexe 2 : Matériel utilisé

INTRODUCTION

L'usage des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique ancestrale. Selon l'OMS (2004), 80% de la population africaine ont recours aux plantes médicinales pour leurs besoins en santé primaire. Cet engouement autour des plantes s'explique par le fait de leur accessibilité, leur faible coût et par habitudes socio-culturelles. Dans la liste de ces plantes, figure *Alchornea cordifolia* dont les feuilles sont très utilisées pour le traitement de diverses maladies telles que le paludisme, le diabète, l'hémorroïde (Tra Bi *et al.*, 2008 ; Ngene *et al.*, 2015). En effet, les extraits de feuilles de cette plante possèdent des propriétés antimicrobiens, antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes (Nagha *et al.*, 2016).

Le pouvoir thérapeutique de ces extraits de feuilles serait dû aux molécules bioactives notamment les flavonoïdes qu'elles contiennent (Noundou, 2012 ; Agyare *et al.*, 2014). En effet, les flavonoïdes sont dotés d'un fort pouvoir antioxydant bénéfique pour la prévention et le traitement de certaines maladies dégénératives telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et certaines affections chroniques (Nibir *et al.*, 2017). Ces flavonoïdes sont également doués de propriétés antibactériennes, antivirales, antiagrégants plaquettaires, antiallergiques, anti-inflammatoires et anti-tumorales (Ghedira, 2005).

L'extraction de ces molécules bioactives des organes de plantes se font généralement dans les ménages par les procédés classiques tels que la macération, l'infusion et la décoction (Bohui *et al.*, 2018). Cela se fait en méconnaissance de certains paramètres technologiques d'extraction tels que la température d'extraction, le temps d'extraction, le ratio matériel végétal/solvant, la taille du matériel végétal et le mode d'extraction (Koffi, 2014). Or, la non maîtrise des conditions d'extraction de ces molécules pourrait influencer sur la composition chimique et par ricochet, impacter l'effet thérapeutique de l'extrait obtenu. C'est ainsi que les plans d'expérience ont été utilisés pour l'optimisation des conditions d'extraction de certaines molécules bioactives afin de les proposer aux populations (Koffi *et al.*, 2015 ; Nyamien *et al.*, 2015 ; Yao *et al.*, 2016).

La présente étude s'inscrit dans le cadre de l'optimisation des conditions d'extraction des molécules bioactives des feuilles d'*A cordifolia.*, en l'occurrence les flavonoïdes totaux et les antioxydants afin de les proposer aux ménages. Pour y parvenir, la démarche suivie a consisté à :

- déterminer la composition phytochimique et les conditions d'extraction des flavonoïdes totaux des feuilles d'*A cordifolia* ;
- optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante de ces feuilles par un plan central composite ;
- déterminer les caractéristiques physico-chimiques et la composition minérale de l'extrait optimisé.

Le présent mémoire s'articule autour de trois grandes parties. La première partie rapporte la synthèse bibliographique sur la plante étudiée et d'autres aspects clé du sujet traité que sont : les flavonoïdes, les antioxydants naturels et les plans d'expériences. La seconde partie décrit le matériel et les méthodes utilisés. Enfin, la troisième partie présente l'analyse et la discussion de l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus, suivie d'une conclusion et des perspectives.

PARTIE I : GENERALITES

I.1. *Alchornea cordifolia*

Alchornea cordifolia est une espèce de plante de la famille des Euphorbiaceae. On la rencontre dans des forêts ombrophiles ou dans des galeries forestières de l'Afrique tropicale, souvent aussi le long de rivières. La plante est riche en métabolites secondaires qui font d'elle une plante à large spectre d'utilisation.

I.1.1. Taxonomie

Les données taxonomiques de plante ont été fournies par Ngaha *et al.* (2016). Ces données sont indiquées comme suit :

Règne : Plantae

Super-division : Embryophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Euphorbiales

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Alchornea*

Espèce : *Alchornea cordifolia*

I.1.2. Noms vernaculaires

Alchornea cordifolia est connu, en Côte d'Ivoire, sous différents noms à savoir : *vidjo* (chez les Abbey), *djeca* (Chez les Agni et Baoulé), *n'dzé* (chez les Attié), *féllémé* (chez les Gouro), *bourounei* (chez les Bété) (M'bra, 2017).

I.1.3. Description botanique

Alchornea Cordifolia, est un arbuste à feuilles persistantes grimpant parfois avec une taille variante entre 5 et 10 m de haut. Ses branches dressées, avec des orifices évasés et

tombants selon l'emplacement, partent de la base pour devenir horizontales selon l'endroit où pousse la plante (Mavar-Manga *et al.*, 2007).

Son écorce est lisse, grise avec un bord brun rougeâtre. Ses branches sont pubescentes à glabres, allant du gris au brun (Mavar-Manga *et al.*, 2007 ; Friis & Harris, 2013).

Ses feuilles sont alternes, simples avec des bords parfois entiers, glabres ou à pubescence étoilée. Elles sont largement ovées, cordées à la base et acuminées au sommet (Friis & Harris, 2013).

A. cordifolia, est une plante dioïque à fleurs unisexuées. Les inflorescences femelles en grappes pendantes sur les branches ou le tronc sont constitués de petites fleurs verdâtres. Les inflorescences mâles sont constituées de fleurs avec deux sépales en sections et huit étamines. (Arbonnier, 2002). Les fruits sont capsulaires à deux ou trois loges plus ou moins aplatis d'environ 1 cm de diamètre, plus ou moins rougeâtre à maturité, très caractéristique à cause des deux très longs stylets persistants à l'extrémité, laissant apparaître des graines rouges (Arbonnier, 2002). La figure1 présente l'aspect des feuilles d'*A. cordifolia*.



Figure 1 : Feuilles d'*Alchornea cordifolia*

I.1.4. Répartition géographique

A. cordifolia est retrouvé dans certains pays africains tels que la Côte d'Ivoire, la République de Guinée, le Nigéria, le Soudan, la Gambie, le Mali et la République démocratique du Congo (Miller & Gosling, 2014). Elle est répandue le plus souvent dans les forêts

secondaires et les ripisylves. On la trouve également dans les zones marécageuses mais parfois dans des endroits plus secs (Mavar-Manga *et al.*, 2007).

I.1.5. Usages traditionnels

A. cordifolia est utilisé à différentes fins traditionnelles. L'infusion des feuilles est utilisée dans le traitement des maladies telles que les maux de gorge, la toux et les bronchites. Elle est également utilisée pour soigner d'autres maladies telles que l'ulcère gastrique, la diarrhée et la dysenterie amibienne (Nagha *et al.*, 2016). Par ailleurs, le cataplasme des feuilles est utilisé pour soigner les blessures. Les feuilles ainsi que l'écorce de racine de cette plante sont utilisées pour le traitement de la lèpre. Elles servent également d'antidote contre les morsures de serpent (Agyare *et al.*, 2014). Le broyat des feuilles séchées peut être mélangé à de la nourriture ou macéré dans du vin de palme comme indiqué par Philip *et al.* (2014). L'extrait des feuilles est utilisé pour traiter diverses affections telles que les maladies vénériennes, la conjonctivite, les dermatoses et les ulcères d'estomac. Elle est également utilisée pour la prise en charge des douleurs inflammatoires, pour le traitement des pathologies génito-urinaires, ainsi que pour l'amélioration de la fécondité (Adeshina *et al.*, 2014).

I.1.6. Propriétés pharmacologiques

Les travaux réalisés par Ishola *et al.* (2014) sur des souris, ont montré que l'extrait hydroalcoolique des feuilles d'*A. cordifolia* a un effet antidépresseur. De plus, Agbor *et al.* (2004) ainsi que Eliakim-Ikechukwu & Obri (2009) ont mis en évidence l'effet anti-diarrhéique de ces extraits.

Ces extraits sont également dotés de pouvoirs anti-inflammatoires, anxiolytiques et analgésiques (Ismaila *et al.*, 2012 ; Kamenan *et al.*, 2013). Par ailleurs, les propriétés antibactériennes, antimicrobiennes et antiinflammatoires de ces feuilles ont été mises en exergue par Adeshina *et al.* (2012). Ces feuilles ont aussi un effet antipaludéen (Banzouzi *et al.*, 2002).

De même, les études menées par Eliakim-Ikechukwu & Obri (2009) ont montré que les feuilles d'*A. cordifolia* possèdent une activité antidiabétique. Ces feuilles ont aussi un effet antipaludéen (Banzouzi *et al.*, 2002).

I.1.7. Composition phytochimique

Des études phytochimiques antérieures de la plante ont révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires dans les extraits d'*A. cordifolia*, à savoir les terpénoïdes, les glycosides stéroïdiens, les flavonoïdes, les tanins, les saponines et les alcaloïdes (Adeshina *et al.*, 2012 ; Nagha *et al.*, 2016 ; Noundou *et al.*, 2016).

Les travaux de Mavar-Manga *et al.* (2008) ainsi que ceux de Noundou *et al.* (2016) ont permis d'identifier, dans les extraits de feuilles d'*A. cordifolia*, les composés tels que l'imidazopyrimidine, l'alchornéine, alchornidine et plusieurs alcaloïdes de guanidine tel que la N1, N2-diisopentényl gaunidine, la N1, N2, N3-triisopentényl guanidine. Par ailleurs, Agyare *et al.* (2014) ont relevé la présence d'une gamme d'acide hydroxybenzoïque dans les feuilles d'*A. cordifolia*, à savoir : l'acide gallique et son ester, l'acide anthralinique, l'acide protocatéchique et l'acide ellagique. Plusieurs composés tels que le stigmastérol, le stigmasta-4,22-dien-3-one, la friedelin, friedelane, l'acide 3-*O*-acétylaleuritolique, 3-*O*-acétylérythrodiol et le gallate de méthyle ont été dans l'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* (Noundou *et al.*, 2016).

I.2. Antioxydants naturels

Un antioxydant est une substance chimique capable de ralentir ou d'inhiber de manière significative l'oxydation d'un substrat (au niveau des macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques et les protéines).

Les molécules ayant cette propriété ont la capacité d'agir directement ou indirectement sur les radicaux libres en empêchant leurs actions (Kirschweg *et al.*, 2017). Pour faire face à ces radicaux libres, le système de défense humain utilise deux principaux groupes d'antioxydants que sont : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

I.2.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques qui sont principalement constitués de trois enzymes (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO (espèces réactives de l'oxygène). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Lubrano & Balzan, 2015). La figure 2 présente les principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives.

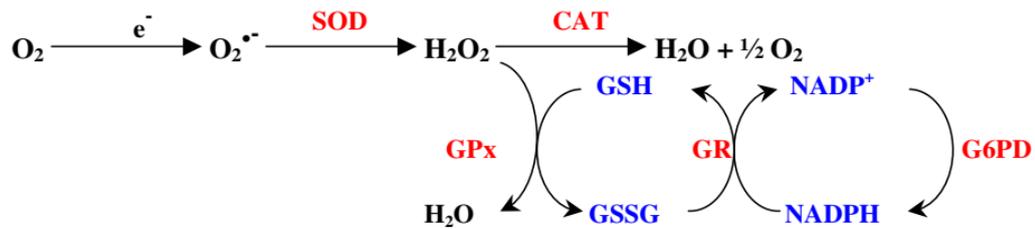


Figure 2 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives

I.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Il s'agit d'un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense enzymatiques. Il fait intervenir les espèces chimiques endogènes ou exogènes. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons la glutathion réduit (GSH), les oligoéléments, les vitamines E et C, les caroténoïdes et les polyphénols. Ces derniers suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des chercheurs (Kirschweg *et al.*, 2017).

I.2.2.1. Glutathion réduit

La glutathion réduit (GSH) est un antioxydant protéique abondant dans l'organisme où il joue un rôle de protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine et l'albumine. Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. C'est également un détoxifiant au niveau hépatique (Pisoschi & Pop, 2015).

I.2.2.2. Oligoéléments

Les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Fe etc.) ne sont pas des antioxydants en tant que tels ; ils agissent dans l'organisme comme des cofacteurs enzymatiques. Leur apport par l'alimentation permet de maintenir le bon fonctionnement du système d'antioxydants cellulaires. Il favorise donc l'équilibre oxydatif. Par ailleurs, certains oligo-éléments, selon leur état et leur concentration, peuvent être à l'origine d'une production des substances d'oxygène réactives (ROS). La supplémentation en ces oligo-éléments en cas de carence nécessite donc un certain contrôle (Pisoschi & Pop, 2015). Ce sont : le cuivre, le zinc, et le sélénium.

I.2.2.3. Vitamines

Les vitamines E et C représentent les composés antioxydants les plus étudiés depuis très longtemps (Hamid *et al.*, 2018). Ces vitamines, occupent des sites cellulaires distincts en relation avec leur solubilité respective dans les milieux lipidiques et aqueux. Cependant, elles interagissent de manière synergique.

La vitamine E connue aussi sous le nom d' α -tocophérol, est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Kryscio *et al.*, 2017). Elle agit directement sur une grande variété de ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite, la vitamine E oxydée pourra être reconvertie par la vitamine C mais également par d'autres composés comme la vitamine A, le GSH et l'ubiquinol. La vitamine E peut aussi activer les SOD et les catalases (Hamid *et al.*, 2018).

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, l'on la retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire. L'intérêt majeur de la vitamine C réside en sa capacité de régénérer la vitamine E au sein de la membrane plasmique (Marik *et al.*, 2017).

I.2.2.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes. Ils sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux libres (ROO^\bullet , HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, R^\bullet) par simple addition électrophile et par transfert d'électrons. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Kryscio *et al.*, 2017).

I.2.2.5. Polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe important de substances naturelles largement répandues dans le règne végétal. Ces molécules agissent sur les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et/ou de protons. Ce sont également de bons chélateurs d'ions métalliques de transition qui permettent de catalyser la peroxydation lipidique. D'une façon générale, l'activité biologique des polyphénols, notamment des flavonoïdes sont connus pour leur potentiel antioxydant élevé. Ce potentiel antioxydant est fortement dépendant de la nature et de la position de leurs substituants, en particulier du nombre de groupes hydroxyles (Nibir *et al.*, 2017).

I.3. Flavonoïdes

Avec plus de 6000 molécules déjà isolées, les flavonoïdes constituent les composés phénoliques largement répandus dans le règne végétal. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes. Ils sont impliqués dans divers processus de la plante à savoir la défense contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies. La figure 3 présente la structure de base des flavonoïdes. Ils sont constitués de deux unités aromatiques en C₆ (cycles A et B) reliés par un cycle pyranique central C (Crozier, 2003).

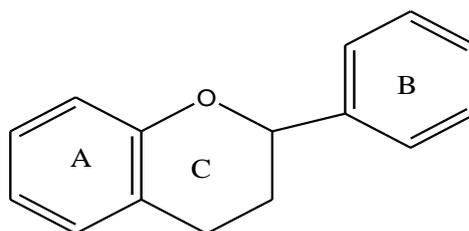


Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être différenciés en plusieurs classes grâce à la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation. La figure 4 présente les différentes classes de flavonoïdes. Ce sont : les flavones, les flavonols, les isoflavones, les anthocyanines, les catéchines, les dihydroflavonols et les chalcones (Chira *et al.*, 2008).

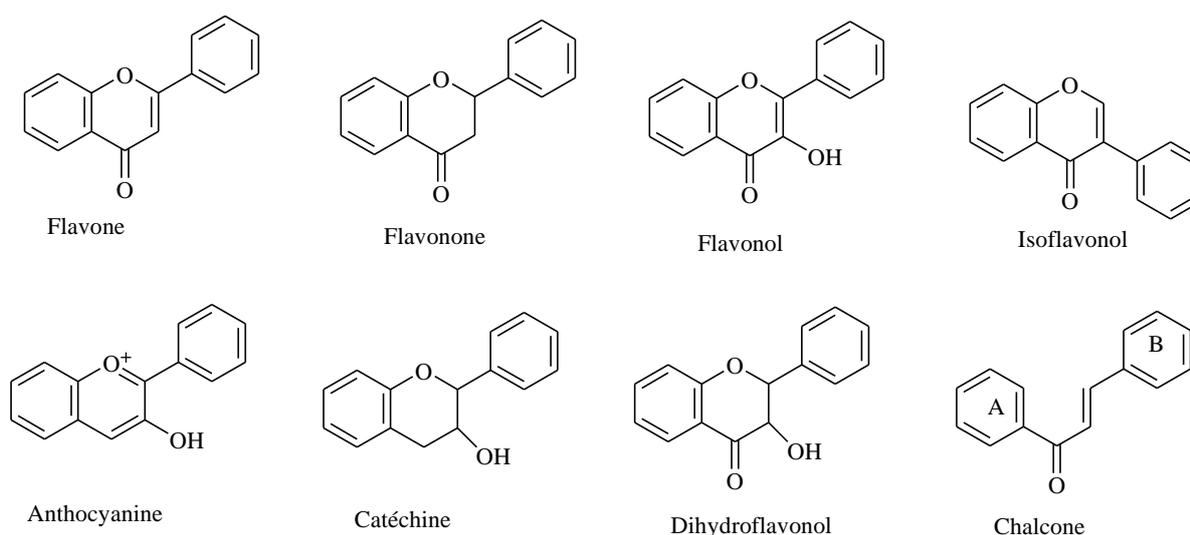


Figure 4 : Structures de base des principaux flavonoïdes

I.3.1. Activité biologique des flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en exergue les propriétés biologiques des flavonoïdes. Selon leur structure chimique, ils peuvent se comporter comme des antioxydants, des anti-allergènes, des antiviraux, des anti-inflammatoires et comme des vasodilatants (Ghedira, 2005). Parmi ces propriétés biologiques, l'intérêt principal a été consacré à leur activité antioxydante, en raison de leur grande capacité à réduire la formation de radicaux libres (Terao, 2009 ; Cushnie & Lamb, 2011 ; Catarino *et al.*, 2016).

I.3.2. Activité antioxydante des flavonoïdes

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont en partie responsables de leurs nombreuses activités biologiques, y compris leur activité antitumorale. Ces composés naturels ont la capacité de réagir avec la majorité des espèces réactives de l'oxygène (Pietta, 2000). Leur action antioxydante ne s'exerce pas seulement par le piégeage et la désactivation des radicaux libres, mais aussi par l'inhibition des enzymes oxydantes et la chélation des ions métalliques responsables de la production des ROS (Pietta, 2000). En effet, les flavonoïdes possèdent un faible potentiel redox leur permettant de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le pyroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène. Le radical flavonoïde phenoxy ($FI-O^*$) qui en résulte peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Procházková *et al.*, 2011). De plus, les flavonoïdes sont capables d'inhiber l'action d'enzymes responsables de la production des radicaux libres telles que la xanthine oxydase, la NADPH-oxydase via la PKC (Terao, 2009). Par ailleurs, ils agissent comme de bons chélateurs d'ions métalliques, à savoir les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques (Cuyckens & Claeys, 2004). Cependant, leur excès est responsable de la production du radical hydroxyde par la réduction du peroxyde d'hydrogène (Procházková *et al.*, 2011).

I.4. Méthodes d'extraction des molécules bioactives

L'extraction consiste spécifiquement en une dissolution des molécules d'intérêt contenues dans la matière végétale dans un solvant. Il s'agit généralement d'une opération de séparation solide/liquide qui peut se réaliser à partir de plusieurs procédés tels que la macération, l'infusion, la décoction, la percolation, la digestion, la lixiviation ou l'élution

(Wajsman *et al*, 2011). Parmi ces techniques d'extraction suscitées, les plus utilisées dans les ménages sont : la macération, l'infusion et la décoction.

Macération : c'est une méthode d'extraction à froid qui se fait par pénétration du solvant dans les cellules végétales. Ce phénomène provoque leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de faible énergie. Les extractibles alors dissous diffusent progressivement des cellules végétales vers le solvant.

Infusion : c'est une méthode de préparation d'extraits nécessitant l'apport de chaleur. Le solvant le plus utilisé dans les ménages est l'eau bouillante. Le principe consiste à laisser diffuser les composés extractibles du matériel végétal vers l'eau chaude suite à la pénétration de celle-ci dans les cellules végétales. La température du milieu d'extraction diminue dans le temps sous l'effet de l'air ambiant.

Décoction : cette méthode de préparation d'extraits végétaux obéit au même principe que l'infusion. Ici la température du milieu d'extraction est maintenue supérieure à 100 °C par une source de chaleur (le feu). En milieu industriel, cette méthode est appliquée pour l'extraction des composés peu sensibles à la chaleur (cas de l'extraction au soxhlet).

I.5. Optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes à l'aide de plans d'expérience

I.5.1. Notion de plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique. Ils permettent d'obtenir le maximum de renseignements avec un minimum d'expériences. Ces plans d'expériences sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt et des variables. Dans ce cas, l'expérimentateur s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur est appelée la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur peut dépendre d'une ou de plusieurs variables appelées facteurs (Goupy, 2006).

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées (Goupy, 2006).

I.5.1.1. Notion d'espace expérimental

Toute expérience a pour but d'aboutir à une grandeur d'intérêt appelée réponse. Celle-ci est fonction de plusieurs facteurs. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes : la borne inférieure qui correspond au niveau bas et la borne supérieure correspond au niveau haut. L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, est t'appelé domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur (figure 5).

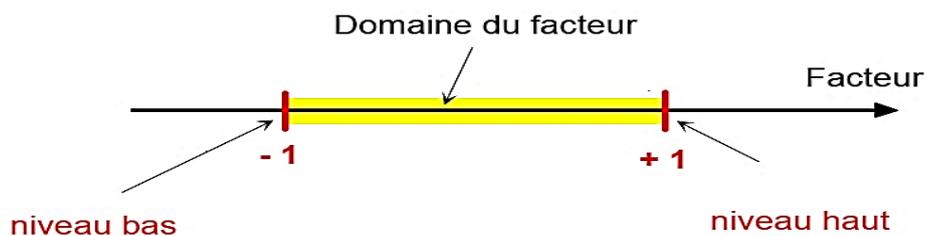


Figure 5 : Domaine de variation du facteur (Goupy, 2006)

I.5.1.2. Notion de modélisation mathématique

On choisit, a priori, une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin (Goupy, 2006). Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.

- x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences.

I.5.2. Différents types de plans d'expériences

Il existe plusieurs types de plans d'expériences. Chacun, par ses propriétés, est spécifique à la résolution d'un problème particulier. Mais on peut les regrouper en deux grandes catégories : les plans de criblages ou screening et les plans pour surfaces de réponses (RSM) ou les plans d'optimisation (Goupy, 2005).

Les plans d'expériences pour criblage de facteurs (technique de screening) permettent d'étudier l'effet des paramètres sur la réponse. Par contre, les plans de surface de réponses visent à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative. Elle vient ainsi s'appliquer à la suite de l'étude de criblage puisque, logiquement elle n'utilise que les facteurs précédemment jugés influents.

Le tableau I présente les informations concernant les plans d'expérience les plus utilisés (Yoon, 2007).

Tableau I : Différents types de plans d'expériences (Koffi, 2014)

Plans d'expérience	Nombres de facteurs	Avantages	Inconvénients
Plan de criblage :			
Plan factoriel complet	2-4	Meilleure couverture possible des essais.	Grand nombre d'essais
Plan factoriel fractionné	2-4 ou 5	Solution de compromis avec un plus petit nombre d'essais.	Limitation des interactions à observer
Plan d'Hadamard	5-7	Nombre minimal d'essais requis ; bon outil de criblage.	Pas d'observation des interactions
Plan pour surfaces de réponse :			
Plan central composite	2-4	Estimation des effets de courbure avec une prédiction de haute qualité.	Nombre modéré d'essais ; requiert des paramètres des facteurs hors de la gamme dans la partie factorielle
Plan Box-Behnken	2-4	Estimation des courbures avec un petit nombre d'essais ; requiert 3 niveaux pour chaque facteur.	Moins de courbure par rapport au plan central composite ; mauvaise qualité de prédiction

Dans cette étude, seul le plan central composite sera utilisé pour l'optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante des feuilles *d'A. cordifolia*. Ce plan d'expérience présente l'avantage de se prêter au déroulement séquentiel

d'une étude et d'exiger un nombre d'expériences relativement peu élevé. Il permet une estimation de l'interaction et même des effets quadratiques de chaque variable indépendante avant la validation du test. Le nombre d'expériences dans un plan composite centré est donné par la relation suivante :

$$N = 2^k + 2k + N_0$$

Où k est le nombre de facteurs d'entrée. Un plan composite centré se compose en somme de trois quantités :

- Un plan factoriel à deux niveaux (-1, +1), à partir de k facteurs, ce qui conduit à $2k$ essais.
- $2k$ essais en étoiles, avec des niveaux $(-\alpha)$ et $(+\alpha)$, La valeur du α est fonction du nombre de facteurs k .
- N_0 essais au centre du domaine expérimental (niveau 0). La valeur de N est fonction du nombre de facteurs k .

I.5.3. Travaux antérieurs

Les plans d'expériences ont déjà été utilisés par plusieurs chercheurs pour l'optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes et de l'activité antioxydante d'organes végétaux. Dans ce contexte, Wang *et al.* (2012) ont utilisé la méthodologie de surface de réponse pour optimiser les conditions d'extraction assistée par ultrasons des flavonoïdes et des antioxydants du rhizome de *Sparganii*. De même, les conditions d'extraction assistée par ultrasons des flavonoïdes des graines d'*aubépine* ont été déterminées à l'aide d'un plan central composite (Pan *et al.*, 2012). Les travaux de Munhoz *et al.* (2014) ont également permis d'optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes des fleurs de *Tagetes patula* grâce à un plan de mélanges. En outre, la méthodologie des plans d'expérience a été utilisée par Yao *et al.* (2016) lors de l'optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes totaux et des antioxydants totaux des feuilles de *Dacryodes edulis*. Wang *et al.* (2018) ont également utilisé la méthodologie des plans d'expériences pour optimiser l'extraction des flavonoïdes des feuilles d'oliviers. Yusof *et al.* (2019) ont utilisés la méthodologie de surface de réponse pour optimiser des flavonoïdes des coques de cacao.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal de cette étude est constitué de feuilles « mortes » d'*Alchornea cordifolia*. Ces feuilles « mortes » ont été collectées au pied d'un arbre d'*A. cordifolia* présent sur le site nord de l'INP-HB de Yamoussoukro (6°53'04.7'' Nord et 5°13'54.9'' Ouest), pendant le mois d'octobre 2020. Les feuilles ainsi collectées ont été ensuite acheminées au Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèses et de l'Environnement (LAPISEN) de l'INPHB de Yamoussoukro pour y être séchées à l'étuve pendant 24 heures. Les feuilles séchées ont été réparties en deux lots. Un des lots de feuilles a été découpé à la main en petits morceaux. Par contre, l'autre lot a été broyé en fine poudre à l'aide d'un mortier en bois.

La figure 6 présente les deux formes sous lesquelles les feuilles ont été utilisées pour la préparation des différents extraits.

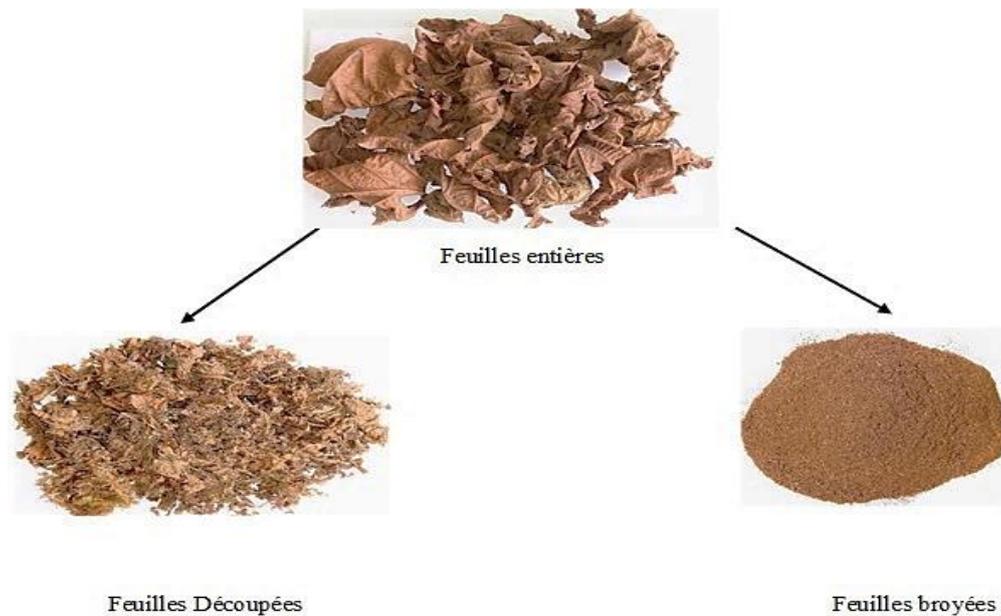


Figure 6 : Matériel végétal (les feuilles d'*A cordifolia*)

II.1.2. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour cette étude est constitué de la verrerie courante de laboratoire et d'appareils de laboratoire. Ce sont :

- ❖ un spectrophotomètre Jasco V-530 (JASCO, Japon),
- ❖ une étuve (memmert, Allemagne)
- ❖ une balance de précision (Sartorius, France)
- ❖ un conductivimètre (JENWAY, France)
- ❖ un pH-mètre (HANNA, France),
- ❖ un spectrophotomètre Absorption Atomique (Varian AA 20 Spectrometer, Australia),
- ❖ un vortex (RS Lab, France),
- ❖ un agitateur magnétique (Stuart, France),
- ❖ un réfractomètre (Leica AR200, USA).
- ❖ un bain marie (Mettler GmbH, Allemagne)

II.1.3. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour les différentes analyses sont de qualités analytiques. Il s'agit du nitrite de sodium (NaNO_2), du chlorure d'aluminium (AlCl_3), de la soude (NaOH), du peroxosulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), du méthanol (MeOH), de l'éthanol (EtOH), de l'ABTS (2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate de diammonium), du chlorure de potassium (KCl), copeaux de magnésium, du réactif de Dragendorff, du chlorure de fer (FeCl_3), du réactif de Liebermann, de l'acide sulfurique (H_2SO_4) et de l'alcool isoamylique ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits

La préparation des extraits s'est faite par décoction. Elle a consisté à faire bouillir dans un ballon de 500mL, 15g du matériel végétal dans 300mL de solvant hydroéthanolique (150mL d'eau et 150 mL d'éthanol). Le ballon a été surmonté d'un réfrigérant afin d'éviter l'évaporation de l'eau pendant la durée de l'ébullition. L'ébullition est maintenue pendant toute la durée de l'extraction 30min.

Les extraits obtenus sont par la suite filtrés à l'aide d'un dispositif (entonnoir + Coton hydrophile). Les filtrats sont ensuite utilisés pour le criblage phytochimique.

II.2.2. Criblage phytochimique

La mise en évidence de la présence (ou non) des différentes familles de métabolites secondaires (alcaloïdes, polyphénols (tanins, flavonoïdes), saponosides, polyterpènes et stérols, quinones), dans l'extrait hydro-des feuilles d'*Alchornea cordifolia*, a été faite selon la méthode décrite par Bagre (2007).

II.2.2.1. Mise en évidence des polyphénols

A 2 mL d'extrait végétal est ajoutée une goutte de solution aqueuse de FeCl_3 (2% ; m/V). L'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence de composés phénoliques.

II.2.2.2. Mise en évidence des flavonoïdes

Un volume de 2 mL d'extrait végétal est mis à sécher sur un bain de sable. Après refroidissement, le résidu sec est repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique (mélange de 10 mL d'éthanol à 96°, 10 mL d'eau distillée et de 10 mL d'acide chlorhydrique concentré). On y ajoute 2 à 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose-orangée ou violacée, après ajout de 3 gouttes d'alcool isoamylique indique la présence de flavonoïdes.

II.2.2.3. Mise en évidence des tanins

Un volume de 5 mL d'extrait est mis à sécher sur un bain de sable. Après cela, 15 mL de réactif de STIASNY sont ajoutés au résidu sec. La solution obtenue est incubée au bain-marie à 80 °C pendant 30 min. L'apparition de flocons, précipitant lentement indique la présence de tanins catéchiques. Cette solution contenant les flocons est ensuite filtrée ; et le filtrat recueilli est saturé de CH_3COONa . L'apparition d'une coloration bleu-noire intense après ajout de 3 gouttes de FeCl_3 à 2 % (m/V) indique la présence de tanins galliques.

II.2.2.4. Mise en évidence des saponosides

Un volume de 10 mL d'extrait végétal est mis dans un tube à essai. Après avoir agité pendant quelques minutes, la hauteur de mousse persistante est mesurée. Une hauteur de mousse supérieure à 1 cm, indique la présence de saponines.

II.2.2.5. Mise évidence des quinones

Le réactif de BORNTRAEGER (ammoniaque diluée 2 fois) est utilisé pour la mise en évidence des composés quinoniques. Pour ce faire, 2 mL d'extrait végétal a été vaporisé à sec. Après cela, 5 mL de HCl diluée au 1/5^e sont ajoutés au résidu obtenu. La solution obtenue, mise dans un tube à essai, est portée au bain-marie bouillant pendant 30 min. Le tube à essai est ensuite refroidi sous un courant d'eau froide. Ensuite, 20 mL de chloroforme sont ajoutés dans un tube à essai et la phase chloroformique est recueillie dans un tube à essai et on y ajoute 0,5 mL d'ammoniaque diluée 2 fois. L'apparition d'une coloration allant du rouge au violet indique la présence de quinones.

II.2.2.6. Mise en évidence des alcaloïdes

Un volume de 6 mL d'extrait végétal est mis à sécher sur un bain de sable. Le résidu sec est repris dans 6 mL d'alcool à 60° (degré alcoolique). La solution alcoolique ainsi obtenue est répartie dans deux tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 à 3 gouttes de réactif de DRAGENDORFF (solution aqueuse d'iodo-bismuth de potassium). L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orangée à rouge vermillon indique la présence d'alcaloïdes. Dans le deuxième tube, une coloration blanc-jaunâtre après ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de MAYER marque la présence d'alcaloïdes.

II.2.2.7. Mise en évidence des polyterpènes et stéroïdes

Le réactif de LIEBERMANN est utilisé pour cette mise en évidence. Pour ce faire, 5 mL d'extrait végétal sont séchés à l'étuve. Le résidu de l'extrait végétal est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique et recueilli dans un tube à essai. Le long du tube, on fait couler 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une présence de polyterpènes ou stéroïdes.

II.2.3. Optimisation des conditions d'extraction des composés bioactifs

II.2.3.1. Etude préliminaire des paramètres technologiques

L'étude préliminaire des paramètres technologiques (facteurs) a consisté à préparer différents extraits de feuilles en faisant varier les modalités d'un des paramètres technologiques (mode d'extraction, taille du végétal, solvant, ratio (m/V) et le temps d'extraction) et en

maintenant les autres paramètres constants, afin de déterminer les niveaux inférieurs et supérieurs des variables ainsi que la modalité des constantes.

Les différentes modalités des paramètres technologiques susceptibles d'influencer l'extraction des flavonoïdes totaux étudiées sont :

- la taille du végétal (feuilles découpées ou broyat) ;
- le solvant d'extraction (eau à 100% ; eau/éthanol (70/30, V/V) ; eau/éthanol (50/50, V/V) ; eau/éthanol (30/70, V/V) ou éthanol à 100%) ;
- le mode d'extraction (macération, infusion ou décoction) ;
- le ratio variant de 1/100 (m/V) à 10/100 (m/V) ;
- le temps d'extraction ; allant de 5 min à 120 min.

Pour le choix de la taille du végétal (feuilles découpées ou broyat), 1g du matériel végétal a été mis à macérer, pendant 30 minutes, dans 100 mL d'eau. Par la suite, la taille du végétal choisie a été celle dont le filtrat contenait la quantité la plus élevée en flavonoïdes totaux

Concernant le choix du meilleur solvant d'extraction, dans 100 mL de chaque solvant (eau à 100% ; eau/éthanol (70/30, V/V) ; eau/éthanol (50/50, V/V) ; eau/éthanol (30/70, V/V) et éthanol à 100%) est mis à macérer 1 g du matériel végétal (la forme sous laquelle la teneur en flavonoïdes totaux extraits est la plus élevée). Après macération, le solvant choisi est celui dont la quantité en flavonoïdes totaux extraits est la plus élevée.

A propos du choix du mode d'extraction, 1 g de matériel végétal a été utilisé pour chaque mode d'extraction (macération, à décoction, ou à infusion). Le temps d'extraction a été fixé à 30 min dans chaque cas. Et, la taille du végétal et le solvant utilisés sont ceux déterminés précédemment. Après cela, le mode d'extraction choisi est celui pour lequel la quantité en flavonoïdes totaux extraits est la plus élevée.

En ce qui concerne le choix du ratio, une gamme de ratio allant de 1/100 (m/V) à 10/100 (m/V) a été utilisée pour faire une extraction pendant 30 min. La taille du végétal, le solvant d'extraction et le mode d'extraction sont ceux qui ont été retenus précédemment. C'est ainsi que le meilleur ratio a été déterminé comme étant celui avec lequel la quantité en flavonoïdes totaux extraits est la plus élevée.

Pour le choix du meilleur temps d'extraction, la cinétique d'extraction des flavonoïdes totaux a été suivi pendant 120 min. Pour ce faire, un prélèvement a été fait par intervalle de

temps. La taille du végétal, le solvant d'extraction, le mode d'extraction et le ratio (m/V) pris en compte sont ceux déterminés précédemment.

II.2.3.2. Application du plan central composite

Un plan central composite a été utilisé pour la réalisation des essais d'optimisation des conditions d'extraction des flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante des feuilles d'*A. cordifolia*. Dans cette étude, 5 paramètres ont été pris en compte. Parmi ces paramètres, deux ont été pris comme des variables (le temps d'extraction et le ratio matériel végétal/ volume du solvant). Par contre, les trois autres (le mode d'extraction, le solvant et la taille des feuilles) ont été considérés comme des constantes. Le tableau II présente le codage des niveaux ainsi que la valeur de leur étendu.

Tableau II : Niveaux des paramètres expérimentaux du plan central composite

Paramètres technologiques	Codage des niveaux/ Etendu					
	Symbole	-1,41	-1	0	1	1,41
Temps d'extraction	X1	1,00	1,44	2,50	3,56	4,00
Ratio (g/mL)	X2	10	23	55	87	100

Treize (13) essais comportant 4 essais factoriels, 4 essais en étoile et 5 essais au centre du domaine expérimental (Tableau III), ont été réalisés en accord avec le principe d'utilisation du plan central composite, pour 2 facteurs, décrit par Feinberg (1996).

Tableau III : Plan d'exécution du plan central composite

Groupes d'essais	Essai randomisé	Variables		Constantes		
		X1	X2	Mode d'extraction	Solvant	Taille du végétal
Factoriels	1	+1	+1	Décoction	Eau/ETOH (70/30 ; V/V)	Broyat
	2	+1	-1			
	3	-1	-1			
	4	-1	+1			
Centré	5	0	0			
	6	0	0			
	7	0	0			
	8	0	0			
	9	0	0			
Etoilé	10	0	1,41			
	8	-1,41	0			
	9	0	-1,41			
	13	+1,41	0			

Pour chaque essai, la quantité de flavonoïdes totaux (Y_1) et la capacité antioxydante (Y_2) des différents extraits obtenus ont été déterminées.

II.2.4. Analyse quantitative des extraits

II.2.4.1. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode décrite par Marinova *et al.* (2005). Dans une fiole de 25 mL, 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5% (m/V) a été ajouté à 2,5 mL d'extrait. Le mélange a été additionné de 0,75 mL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% (m/V), puis incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. Après incubation, 5 mL de soude (NaOH 1N) y ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 25 mL. Après une agitation vigoureuse du mélange, l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre UV visible à $\lambda_{\text{max}}=510$ nm. Les essais ont été réalisés en triple. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de végétal sec extrait (mg/g QE).

II.2.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test TEAC

Le test TEAC utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisé selon la méthode décrite par Teow *et al.* (2007) avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS^{•+} (acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Pour ce faire, le radical-cation ABTS^{•+} a été produit suite à un mélange équivolumique de 8 mM ABTS (87,7 mg dans 20 mL d'eau distillée) et 3 mM de persulfate de potassium (0,0162 g dans 20 mL eau distillée). Le mélange ainsi obtenu a été ensuite incubé pendant 16 heures à l'obscurité, à température ambiante (30 ± 2°C). Une solution fille a été préparée extemporanément avant chaque série de dosages, en diluant la solution mère d'ABTS^{•+} avec du méthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 ± 0,02 à la longueur d'onde de 734 nm. Ensuite, un volume de 0,1 mL d'échantillon (standard ou extrait) dissous dans du méthanol a été mis en présence de 3,9 mL de la solution diluée d'ABTS^{•+}. Ensuite, l'ensemble a été vigoureusement agité puis incubé pendant 6 min à l'obscurité, à température ambiante (30 ± 2°C). Enfin, l'absorbance du mélange a été lue au spectrophotomètre UV-visible à 734 nm. Les résultats ont été exprimés en micromole par litre équivalent trolox (µmole.L⁻¹ TE), en comparant le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} par le trolox à celui de l'échantillon. Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} (A) a été exprimé comme suit :

$$A(\%) = \frac{A_{734}^{\text{Blanc}} - A_{734}^{\text{Extrait}}}{A_{734}^{\text{Blanc}}} \times 100$$

Avec :

A_{734}^{Blanc} = absorbance du blanc

A_{734}^{Extrait} = absorbance de l'extrait

Les analyses ont été réalisées en triple.

II.2.5. Détermination des caractéristiques physico-chimiques de l'extrait optimisé

II.2.5.1. Détermination du pH

Le pH de l'extrait optimisé des feuilles d'*A. cordifolia* a été mesuré en plongeant l'électrode du pH-mètre de type HANNA dans 50 mL d'extrait. Pour ce faire, le pH-mètre a été préalablement étalonné avec deux solutions tampon : pH= 4,0 et pH= 7,0. La valeur du pH de l'extrait est directement lue sur l'écran du pH-mètre.

II.2.5.2. Détermination de la conductivité

La conductivité des extraits des feuilles broyées d'*A. cordifolia* a été déterminée à l'aide d'un conductimètre (Hanna HI 9835). Pour ce faire, l'électrode du conductimètre a été plongée dans une prise d'essai de 50 mL d'extrait. La valeur de conductivité de l'extrait a été directement lue sur l'écran du conductimètre. La lecture a été réalisée en triple.

II.2.5.3. Détermination du taux de matières sèches

Le taux de matières sèches a été déterminé selon la méthode AOAC (1975). Pour ce faire, un prélèvement de 2 mL d'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* a été effectué et mis dans un creuset. Le creuset contenant la prise d'essai a été ensuite placé à l'étuve à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Après cela, le creuset a été refroidi au dessiccateur puis pesé. Les essais ont été réalisés en triple. Le taux de matières sèches a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{MS}(\%) = \frac{m' - m_{\text{cr}}}{m_e} \times 100$$

m' : masse du creuset et de l'échantillon séchée (g)

m_{cr} : masse du creuset vide (g)

m_e : masse de l'échantillon prélevée (g)

II.2.5.4. Détermination du degré Brix (°Brix)

Le °Brix qui correspond au taux de matières solubles dans l'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre à infrarouge de type Leica AR 200. Pour ce faire, 3 gouttes d'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* ont été directement déposées sur le prisme de l'appareil. L'appareil est tourné ensuite vers une source de lumière et la lecture est faite sur l'échelle l'oculaire, à l'intersection des zones claire et sombre graduée. Les lectures ont été réalisées en triple.

II.2.5.5. Dosage des éléments minéraux présents dans l'extrait optimisé

Les minéraux tels que le potassium, le calcium, le magnésium ; le sodium, le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc, dans l'extrait optimisé de feuilles d'*A. cordifolia*, ont été dosés au spectrophotomètre à flamme d'absorption atomique (Varian AA 20 Spectrometer,

Australia). Les teneurs en ces minéraux ont été déterminées à l'aide de la droite d'étalonnage de chaque minéral recherché.

II.3. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée en faisant une analyse de variances à un facteur (ANOVA à 1 facteur) pour toutes les données (moyenne de chaque paramètre dosé). Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel *Statistica 7.1* (StatSoft, Inc, USA). Les comparaisons des moyennes ont été effectuées par le test de Newman-Keuls au niveau de significativité de 5%.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Détermination de la composition phytochimique et les conditions optimales d'extrait de feuilles d'*Alchornea cordifolia*

Cette étude a été réalisée afin de déterminer la composition chimique et l'effet de chaque paramètre technologique sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits des feuilles d'*A. cordifolia*.

III.1.1. Composition phytochimique d'extrait de feuilles d'*Alchornea cordifolia*

Le criblage phytochimique d'extrait hydro-alcoolique de feuilles d'*Alchornea cordifolia* a révélé la présence des alcaloïdes, des saponines, des polyphénols (tanins et flavonoïdes), et de terpènes/stéroïdes. Nous notons cependant l'absence des quinones (Tableau IV)

Tableau IV : Métabolites secondaires identifiés dans les extraits d'*A. cordifolia*

Métabolisme secondaire	Résultats du test
Alcaloïdes	+
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	+
Saponines	+
Flavonoïdes	+
Polyphénols	+
Polyterpènes/stéroïdes	+
Quinones	-

Présence (+) ; absence (-)

Le criblage phytochimique d'extrait hydroalcoolique des feuilles d'*Alchornea cordifolia* a révélé la présence de tous les composés recherchés, à l'exception des quinones (Tableau IV). Ce résultat est similaire à celui de Saraka *et al.* (2018) qui confirme la présence des mêmes métabolites dans les extraits aqueux et éthanolique des feuilles d'*Alchornea cordifolia*. La présence de tous ces métabolites secondaires dans l'extrait hydroalcoolique pourrait justifier son utilisation en médecine traditionnelle. En effet, il a été démontré que la présence d'alcaloïdes dans la plante favorise son utilisation dans le traitement éventuel du paludisme, l'hypertension et le cancer (Achi *et al.*, 2017). Les polyphénols ont des propriétés antioxydantes très importantes, permettant de lutter contre la formation de radicaux libres en excès dans l'organisme (substances qui vont favoriser le vieillissement cellulaire). Les tanins

issus des polyphénols possèdent des propriétés astringentes et sont donc remarquables dans le traitement des ulcères d'estomac et la diarrhée. Elles forment également une couche protectrice sur les plaies et les empêchent ainsi de s'infecter (Ashok & Upadhyaya, 2012). En raison de leurs activités de piégeage des radicaux libres, les flavonoïdes ont été associées à la prévention des maladies qui impliquent un stress oxydatif (Huang *et al.*, 2010). Les saponines sont par nature des antibiotiques qui combattent les infections et les invasions microbiennes. Ils ont également des propriétés hypocholestérolémiques, qui pourraient offrir aux consommateurs une certaine chimioprotection contre les maladies cardiaques (Okwu & Emenike, 2006). Les stérols et polyterpènes, quant à eux, possèdent plusieurs propriétés médicinales. Ce sont des anticancérigènes, antipaludéens, anti-ulcéreux, antimicrobiens ou des agents diurétiques (Achi *et al.*, 2017).

III.1.2. Détermination des conditions optimales

III.1.2.1. Effet de la taille des feuilles sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits

L'effet de la taille des feuilles sur l'extraction des flavonoïdes totaux a été étudié sur le broyat de feuilles d'*A. cordifolia* de même que sur les feuilles découpées (figure 7). Après dosage, il en ressort que la teneur en flavonoïdes totaux des feuilles broyées ($5,57 \pm 0,11$ mg/g EQ) est largement supérieure à celle des feuilles découpées ($2,43 \pm 0,13$ mg/g EQ). Donc, les flavonoïdes totaux du broyât de feuilles diffusent mieux dans le milieu d'extraction comparativement à ceux des feuilles découpées. Cela peut être dû à l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) lorsque les cellules des feuilles sont détruites par le broyage. En effet l'augmentation de la surface spécifique réduit les chemins de diffusion dans la matrice végétale, permettant ainsi un meilleur contact entre la matrice végétale et le solvant (Amor, 2007). Ce résultat corrobore ceux de Zhu *et al.* (2011) qui ont également montré que le broyat des feuilles de *Ginkgo biloba* permettait de mieux extraire les flavonoïdes de ces feuilles comparativement aux feuilles entières ou découpées.

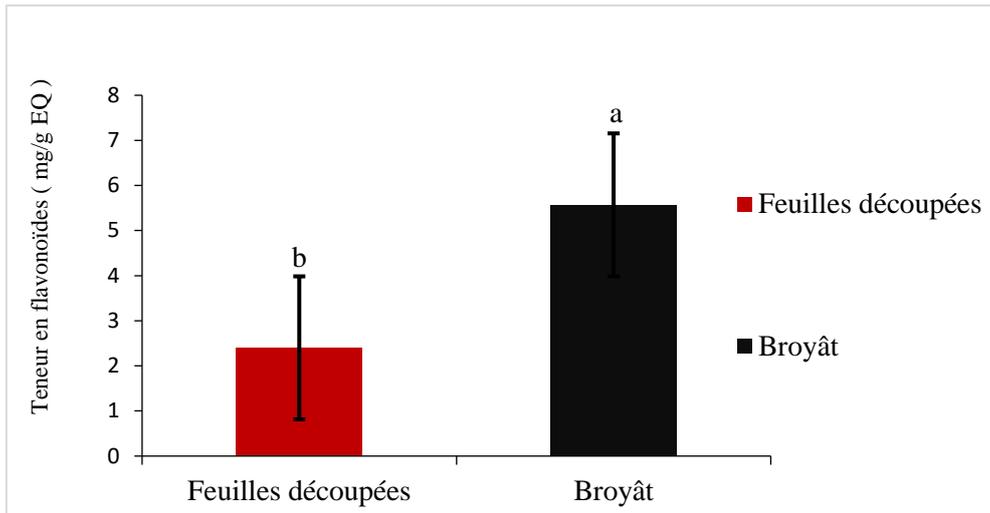


Figure 7 : Effet de la taille des feuilles sur l'extraction des flavonoïdes totaux

Les diagrammes ayant les mêmes lettres minuscules ne sont pas statistiquement différents.

III.1.2.2. Effet du solvant d'extraction sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits

L'effet du solvant d'extraction sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits a été observé, en utilisant durant l'extraction, différentes proportions d'eau et d'éthanol (Eau à 100%, Eau/ETOH (70/30, V/V), Eau/ETOH (50/50, V/V), Eau/ETOH (30/70, V/V) et ETOH à 100%). Les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits préparés à partir des solvants susmentionnés sont indiquées par la figure 8.

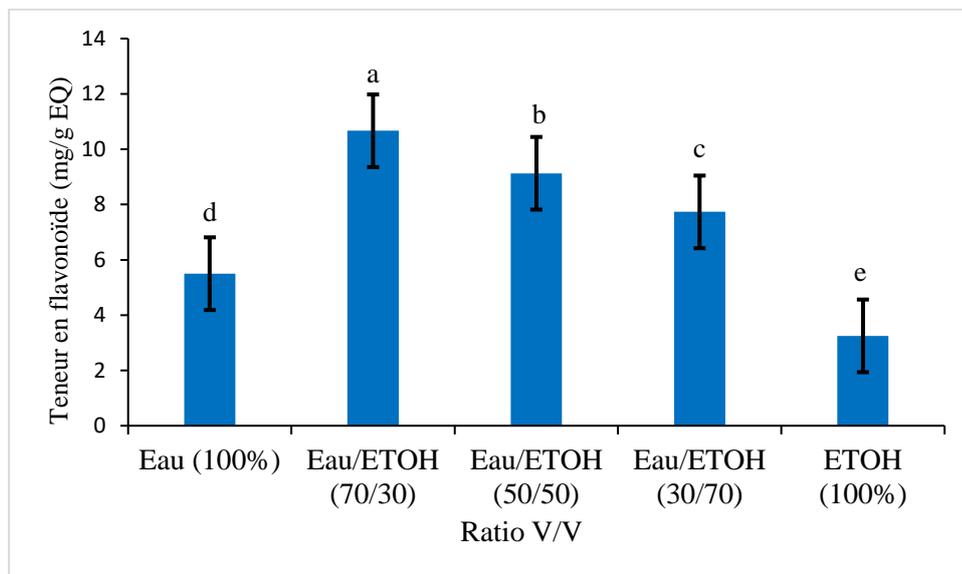


Figure 8 : Effet du solvant sur l'extraction des flavonoïdes totaux

Les diagrammes ayant les mêmes lettres minuscules ne sont pas statistiquement différents.

Les différentes teneurs varient entre 3,2 mg/g EQ et 10,67mg/g EQ. La plus forte teneur en flavonoïdes totaux (10,67 mg/g EQ) est obtenue en faisant l'extraction avec un mélange d'eau/éthanol (70/30, V/V). Par contre, nous avons la plus faible teneur en flavonoïdes totaux (3,2 mg/g EQ) avec l'extrait éthanolique à 100%. Nous remarquons également que la quantité de flavonoïdes totaux extraits diminue lorsque la proportion en eau du mélange diminue. Ce résultat est différent de ceux obtenus par Al-Farsi & Lee (2007) ainsi que Tabart *et al.* (2007) qui ont observé que la quantité de flavonoïdes totaux extraits augmente lorsque la proportion en eau dans le solvant d'extraction diminue. Cette différence observée pourrait être due à la matrice végétale utilisée. Dans le cas de cette étude, le mélange d'eau/éthanol (70/30, V/V) serait indiqué pour extraire au mieux les flavonoïdes totaux.

III.1.2.3. Effet du mode d'extraction sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits

La figure 9 présente les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de feuilles obtenus à partir des méthodes classiques d'extraction telles que la macération, la décoction et l'infusion. Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits obtenus à partir de ces trois méthodes sont de $10,67 \pm 0,13$ mg/g EQ pour la macération, $15,23 \pm 0,15$ mg/g EQ pour la décoction et $12,93 \pm 0,04$ mg/g EQ pour l'infusion. L'analyse statistique des données indique qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre toutes ces valeurs. De ce fait, nous pouvons conclure que la décoction permet d'extraire au mieux les flavonoïdes totaux des feuilles d'*A. cordifolia* comparativement à l'infusion et à la macération. En effet, une température élevée du solvant d'extraction favorise la pénétration du solvant dans la matrice végétale par diminution de la viscosité de ce solvant. Cela conduit à une plus grande solubilisation et diffusion des molécules solubles (Amor, 2008). Ces résultats concordent avec ceux de Bohui *et al.* (2018) qui ont également montré que la décoction permet d'extraire au mieux les flavonoïdes des feuilles d'*Azadirachta indica* et de *Psidium guajava*. Cependant Mahmoudi *et al.* (2013) a montré sur l'étude d'*Artichaut* que l'extraction par macération serait préférable pour extraire les flavonoïdes par rapport à la décoction. Cette différence observée pourrait être due à la différence de matériel végétal utilisé et du temps d'extraction.

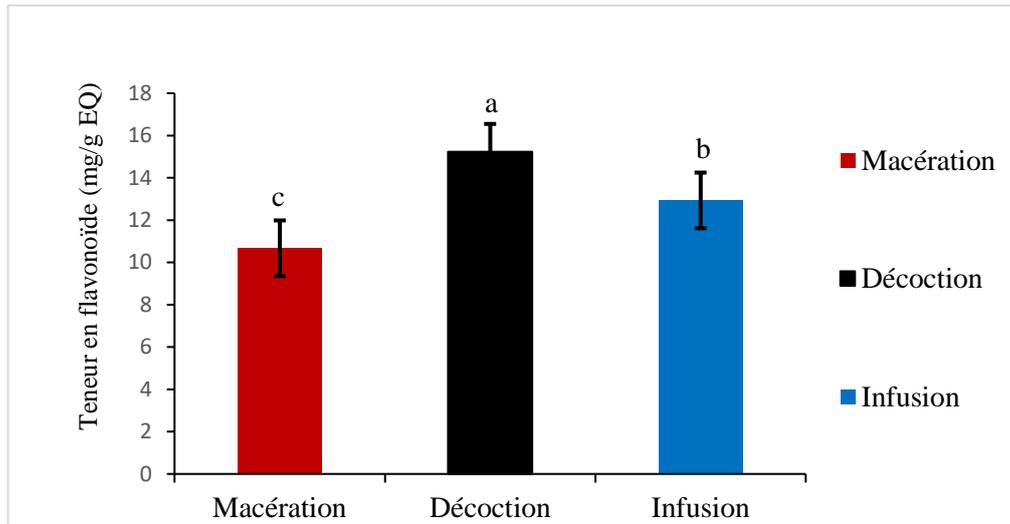


Figure 9 : Effet du mode sur l'extraction des flavonoïdes totaux

Les diagrammes ayant les mêmes lettres minuscules ne sont pas statistiquement différents

III.1.2.4. Effet du ratio sur la quantité totale de flavonoïdes totaux extraits

La figure 10 présente l'effet de la variation du ratio (m/V) sur la quantité de flavonoïdes totaux extraits par décoction des feuilles d'*A. cordifolia*. Nous remarquons que la plus petite teneur en flavonoïdes totaux est obtenue avec le ratio 1/100 (m/V). Cette quantité croît progressivement lorsqu'on part du ratio 1/100 (m/V) pour atteindre le ratio 4/100 (m/V). A partir du ratio 4/100 (m/V), nous observons une légère diminution de la teneur en flavonoïdes en partant du ratio 5/100 (m/V) au ratio 8/100 (m/V) où elle se stabilise jusqu'au ratio 10/100 (m/V). Donc, le niveau inférieur et le niveau supérieur du ratio pourront être fixés respectivement à 1/100 (m/V) et 4/100 (m/V). Ces résultats sont compatibles avec les principes de transfert de masse où la force motrice pour le transfert de masse est considérée comme étant le gradient de concentration entre le solide et le solvant (Al-Dhabi *et al.*, 2017). En effet, cette force devient importante lorsque le ratio (matière végétale/solvant) utilisé est plus élevé (Al-Dhabi *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018). Cependant la diminution de la quantité de flavonoïdes extraits suggère que la saturation du solvant se produit à 4/100 (m/V) et l'équilibre final a été atteint (Nyamien *et al.*, 2015). Ces résultats sont similaires à ceux de N'da (2016) dans l'étude sur l'extraction des flavonoïdes totaux des feuilles d'*Hibiscus Sabdariffa*.

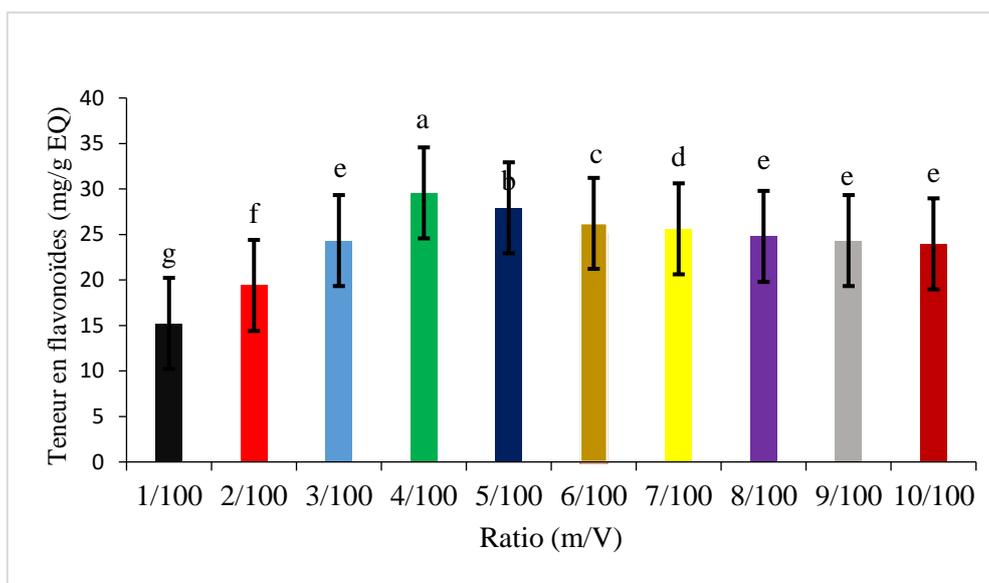


Figure 10 : Effet du ratio sur l'extraction des flavonoïdes totaux

Les diagrammes ayant les mêmes lettres minuscules ne sont pas statistiquement différents.

III.1.2.5. Cinétique de diffusion des flavonoïdes totaux dans le milieu d'extraction

La figure 11 présente la cinétique de diffusion des flavonoïdes totaux, dans le milieu d'extraction. Cette cinétique a été suivie pendant 120 min de décoction avec un ratio de 4/100 (m/V). Nous remarquons que la teneur en flavonoïdes totaux extraits augmente progressivement et cela de façon exponentielle jusqu'au 60 min. Au-delà de ce temps d'extraction, la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait diminue jusqu'à 120 min. Donc le temps optimal d'extraction par décoction des flavonoïdes totaux des feuilles d'*A. cordifolia* est de 60 min. La diminution de la teneur en flavonoïdes totaux extraits pourrait être due à la dégradation des flavonoïdes suite à un temps d'extraction assez prolongé. Cette observation a été faite par plusieurs auteurs (Spigno *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2011 ; Wang *et al.* 2018). Selon ces auteurs, un temps d'extraction prolongé peut entraîner une exposition accrue à la lumière et à l'oxygène, ce qui entraînera à terme l'oxydation des flavonoïdes. Chew *et al.* (2011) dans leurs travaux sur l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *Centella asiatica* ont montré que les enzymes endogènes des tissus végétaux ont la capacité de détruire les composés phénoliques lorsque le temps d'extraction est prolongé.

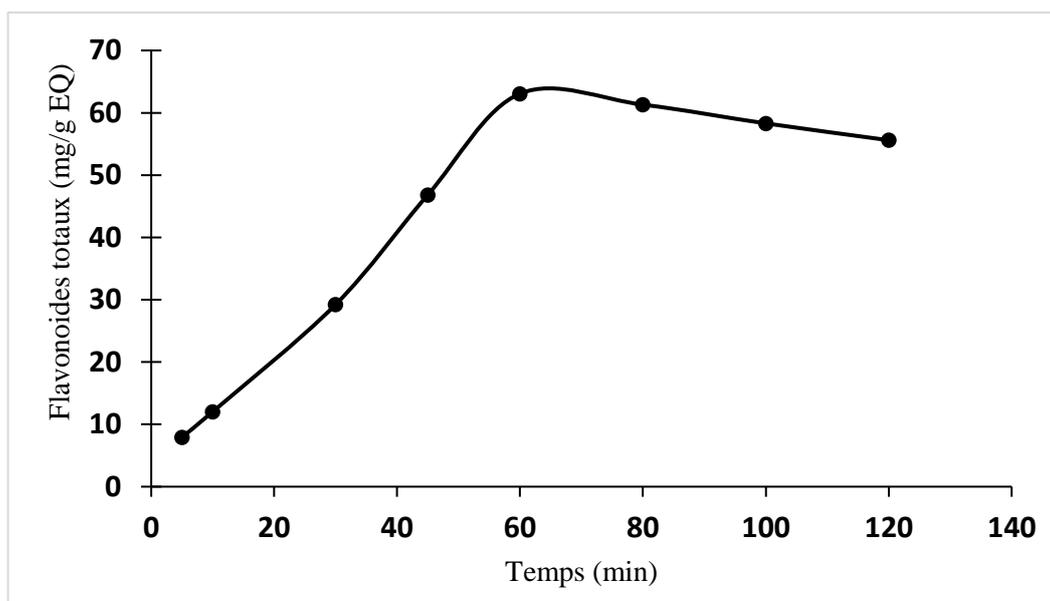


Figure 11 : Cinétique de la diffusion des flavonoïdes totaux

Pour extraire au mieux les flavonoïdes totaux des feuilles d'*A. cordifolia*, il faudrait que l'extraction se fasse dans les conditions suivantes :

- Mode d'extraction = décoction ;
- Temps d'extraction = 60 min ;
- Ratio = 4/100 (m/V) ;
- Solvant d'extraction = Eau/ETOH (70/30, V/V) ;
- Taille du végétal = broyât (feuilles découpées).

III.2. Optimisation des conditions d'extraction par un plan central composite

Le tableau V présente les résultats du plan central composite en considérant le temps d'extraction et le ratio (matériel végétal/ volume du solvant) comme des variables. Les différents essais réalisés, en maintenant constant le mode d'extraction, le solvant d'extraction et la taille du végétal, ont permis d'obtenir en 55 min avec un ratio de 4/100 (m/V), la quantité maximale de flavonoïdes totaux (63,17 mg/g EQ). Dans ces mêmes conditions, la capacité antioxydante de l'extrait obtenu est de 207, 85 $\mu\text{mol. L}^{-1}\text{TE}$.

Tableau V : Matrice expérimentale et résultats expérimentaux du plan central composite

N° Essai	Facteurs		Réponses	
	X1	X2	Y1	Y2
1	2,5/100	55	42,00	140,93
2	3,56/100	87	63,03	185,21
3	2,5/100	55	40,67	143,74
4	3,56/100	55	53,67	185,30
5	2,5/100	100	51,67	148,73
6	2,5/100	55	43,33	141,17
7	2,5/100	55	44,67	143,63
8	1/100	55	20,67	61,79
9	2,5/100	10	32,67	135,22
10	1,44/100	23	21,67	84,52
11	2,5/100	55	40,67	140,7
12	1,44/100	87	26,50	106,97
13	4/100	55	63,17	207,85

X₁ : Ratio exprimé en g/100 mL ; X₂ : Temps d'extraction (min) ; Y₁ : teneur en flavonoïdes totaux (mg/g EQ) et Y₂ : capacité antioxydante des extraits (μmole. L⁻¹ TE)

Les données du tableau V ont permis d'établir les relations entre les facteurs et les réponses étudiées. Ces relations sont de la forme :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Le tableau VI présente les valeurs des coefficients affectés aux variables de ces équations ainsi que leur significativité.

Tableau VI : Valeurs des coefficients affectés aux variables des réponses Y1 et Y2

Coefficients	Valeurs	
	Y1	Y2
b₀	42,27***	142,03***
Linéaire		
b ₁	31,97***	96,37***
b ₂	10,11***	10,40**
Quadratique		
b ₁₁	-0,85 ^{ns}	-6,16 ^{ns}
b ₂₂	-0,61 ^{ns}	1,01 ^{ns}
Interaction		
b ₁₂	1,91 ^{ns}	-11,27*
R²	0,98	0,99

ns : non significatif ; * : significatif à 5% ; ** : significatif à 1% ; *** : significatif à 0,1%

L'analyse du tableau VI indique que le temps d'extraction et le ratio (m/V) influencent positivement l'extraction des flavonoïdes totaux des feuilles d'*A. cordifolia*. Les effets quadratiques de ces paramètres ainsi que leur interaction ne sont cependant pas statistiquement significatifs ($p > 0,05$). Tout cela se traduit par l'équation suivante :

$$Y_1 = 42,27 + 31,97 X_1 + 10,11 X_2$$

La figure 13 présente la représentation en mode surface-réponse de l'équation Y₁. Nous observons qu'en augmentant le ratio (m/V) et en prolongeant le temps d'extraction jusqu'à un seuil, la quantité de flavonoïdes totaux extraits augmente également. Nous notons cependant un effet quadratique moins prononcé.

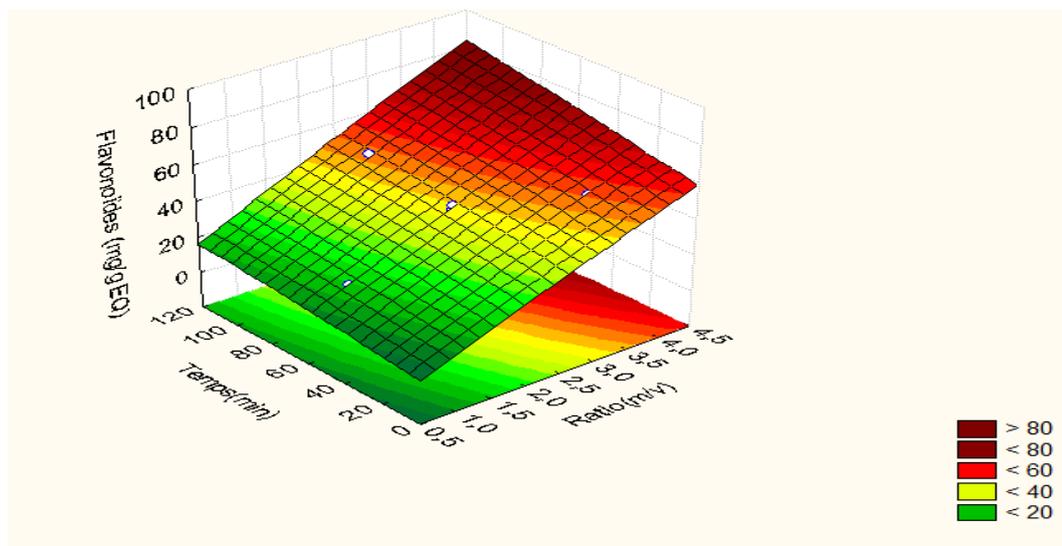


Figure 12 : Influence des différents paramètres sur l'extraction des flavonoïdes totaux

Une influence positive du temps d'extraction et du ratio (m/V) est également noté sur l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'*A. cordifolia*. Par ailleurs, un effet d'interaction négatif entre ces deux paramètres est observé. L'équation mathématique qui en résulte est la suivante :

$$Y_2 = 142,03 + 96,37 X_1 + 10,40 X_2 - 11,27 X_1X_2$$

Nous remarquons, comme dans le cas des flavonoïdes totaux, qu'en augmentant le ratio et prolongeant le temps d'extraction jusqu'à un certain seuil, l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'*A. cordifolia* augmente également (Figure 13). Dans ce cas, l'effet quadratique observé est également insignifiant ($p > 0,05$).

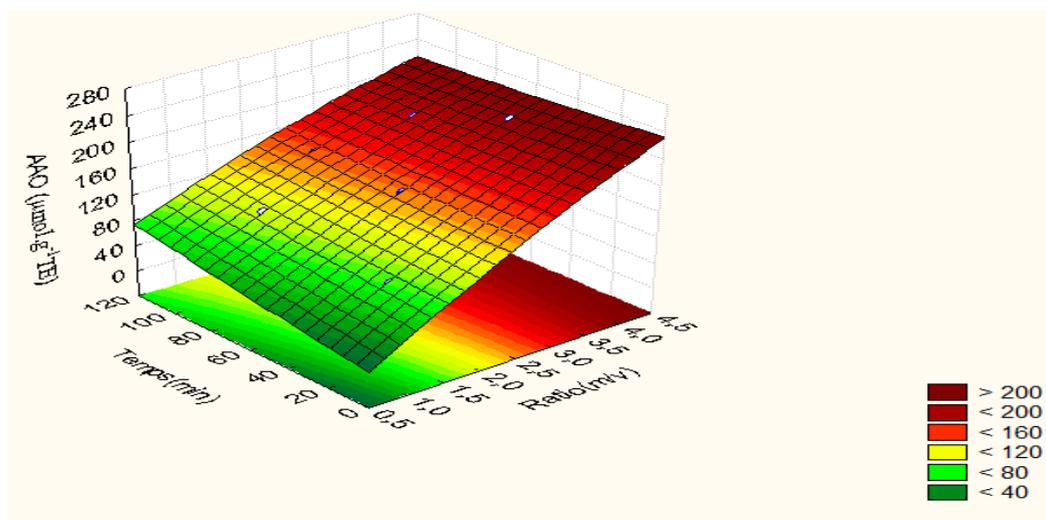


Figure 13 : Influence des différents paramètres sur l'extractions des antioxydants

III.3. Validation expérimentale des conditions optimales d'extraction

Le tableau VII présente les conditions optimales communes d'extraction des flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante. Ces conditions optimales d'extraction ont été déterminées par une fonction de désirabilité (*Statistica 8.0*). Pour avoir un extrait de feuilles d'*A. cordifolia* contenant le maximum de flavonoïdes totaux avec une meilleure activité antioxydante, il faudrait que l'extraction se fasse par décoction pendant 55 min avec 4 g de broyat de feuilles dissous dans 100mL d'un mélange eau/éthanol (70/30, V/V). Dans ces conditions la quantité des flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante prévue sont respectivement de 64,04 mg. g⁻¹ EQ et 204,05 μmol. L⁻¹ TE (tableau VII).

Tableau VII : Valeur prédite et expérimentale des réponses

Réponses	Valeur prédite	Valeur expérimentale
Flavonoïdes totaux (mg. g ⁻¹ EQ)	64,04 ^a	63,17± 0,67 ^a
Activité antioxydante (μmol. g ⁻¹ TE)	204,05 ^b	207,85 ± 1,33 ^b

Les lignes ayant les mêmes lettres minuscules ne sont pas statistiquement différents 5%

L'analyse statistique des données du tableau VII, indique que la teneur en flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de l'extrait préparé dans les conditions optimales sont proches des valeurs prédites. Par ailleurs, l'analyse statistique des données indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs prédites et celles obtenues expérimentalement ($p > 0,05$) (Chan *et al.*, 2009 ; Koffi *et al.*, 2015). Donc le PCC est appliqué avec succès pour l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes totaux et des antioxydants totaux des feuilles d'*A. Cordifolia*.

III.4. Caractéristiques physico-chimiques et composition minérale de l'extrait optimisé

III.4.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait optimisé

Les caractéristiques physico-chimiques de l'extrait optimisé sont mentionnées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Paramètres Physico- chimiques de l'extrait optimisé

Paramètres	pH	Conductivité(μS/Cm)	°Brix	%MS
Valeurs expérimentales	3,95 ± 0,03	6,00 ± 0,03	2,8±0,00	1,44±0,01

Les résultats du tableau VIII indique que l'extrait optimisé des feuilles d'*A. cordifolia* est acide (pH $3,95 \pm 0,03$). Ce pH acide pourrait contribuer à la conservation de qualité sanitaire de cet extrait. En effet, en milieu acide, la croissance bactérienne est fortement inhibée. (Naman *et al.*, 2005). On constate également une faible valeur de la conductivité. Cette valeur basse de la conductivité indique une faible présence de minéraux (meilleur conducteur de courant électrique) dans l'extrait optimisé (Naman *et al.*, 2005). De plus, la valeur relativement faible du degré Brix laisse présager que les matières sèches solubles telles que les sucres réducteurs, les acides, les sels, les pectines et les matières azotées sont présentes en faible quantité dans l'extrait hydroalcoolique d'*A. cordifolia*. Le tableau VIII indique également une valeur faible du taux de matière sèche qui pourrait s'expliquer par une faible présence de matière organique.

III.4.2. Composition minérale de l'extrait optimisé

Les minéraux dosés dans l'extrait optimisé sont : le potassium, le calcium, le magnésium, le sodium, le manganèse, le fer, le cuivre et le zinc. Les concentrations de ces différents minéraux sont mentionnées dans le tableau IX.

Tableau IX : Teneur en minéraux de l'extrait optimisé

Minéraux dosés	Valeurs expérimentales (mg/kg)
Potassium	0,59
Calcium	1,88
Magnésium	0,27
Sodium	27,92
Manganèse	1,27
Cuivre	0,76
Fer	8,04
Zinc	23,03

L'analyse de la composition minérale de l'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* révèle qu'il est plus riche en sodium (27,92 mg/kg) et zinc (23,03 mg/kg) comparativement aux autres minéraux dosés. Après ces deux minéraux, nous avons par ordre décroissant le fer (8,04 mg/kg) suivi du calcium (1,88 mg/kg), manganèse (1,27 mg/kg), cuivre (0,76 mg/kg) et du potassium

(0,59 mg/kg). Cependant, les teneurs des minéraux dosés dans l'extrait de feuilles d'*A. cordifolia* sont faibles comparativement à celles déterminées, dans le même type d'extrait, par d'autres auteurs (Ebenyi & Uraku, 2017 ; Solomon *et al.*, 2017). Cette différence de teneurs en minéraux pourrait être due à l'origine géographique du matériel végétal. Par ailleurs, Ebenyi & Uraku (2017) ont rapporté dans leurs travaux que les minéraux (Mg, Zn, Na, Mn et Fe) présents dans l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles étaient plus abondants comparativement à ceux de l'extrait aqueux. Donc la différence de solvant utilisé pour faire l'extraction pourrait également jouer sur la teneur en minéraux extraits. Il faut noter que tous les minéraux présents dans l'extrait optimisé jouent un important rôle dans le mécanisme physiologique humain et animal. Par exemple, le zinc est impliqué dans la formation de l'hème de l'hémoglobine et la contraction musculaire. En outre, le zinc contribue à la fonction immunitaire, à la cicatrisation des plaies, à la production de spermatozoïdes, au développement et à la croissance du fœtus (Ebenyi & Uraku, 2017). Selon Flood *et al.* (2005), le calcium a une activité anticarcinogène, lui permettant de réduire le risque de cancer colorectal. Il est également un facteur majeur dans l'ossification ainsi que dans la coagulation sanguine. En association avec le zinc, le calcium permet de lutter contre l'ostéoporose (Flood *et al.*, 2005). Quant au potassium, associé au sodium, il joue un rôle clé dans le maintien du potentiel électrique au sein des cellules membranaires et dans la conduction des impulsions nerveuses (Taylor, 2003). En association avec le potassium ou le magnésium, le calcium permet de lutter contre l'ostéoporose (Flood *et al.*, 2005). Le fer, par contre, est l'un des constituants fondamentaux des globules rouges. Cobanoglu *et al.* (2010) estiment que le cuivre aide à l'absorption et à l'assimilation de la teneur en fer de l'hémoglobine. Il régule également la production d'insuline. Son déficit peut provoquer des maladies comme l'anémie.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'optimiser par plan d'expérience les conditions d'extractions des flavonoïdes totaux et des antioxydants des feuilles d'*Alchornea Cordifolia*. En résumant les différentes étapes d'extraction menées sous différentes conditions optimales. Il en ressort que pour avoir un extrait de feuilles d'*A. cordifolia* contenant le maximum de flavonoïdes totaux avec une meilleure activité antioxydante, il faudrait que l'extraction se fasse par décoction pendant 55 min avec 4 g de broyat de feuilles dissous dans 100 mL d'un mélange eau/éthanol (70/30, V/V). Du point de vue qualité, les résultats ont révélé que l'extrait optimisé est une importante source de composés phytochimiques et de minéraux nécessaires au fonctionnement normal du corps humain. Cet extrait est également doté d'une bonne activité antioxydante qui pourrait être bénéfique dans la lutte contre le stress oxydatif.

En perspective, nous souhaitons déterminer la composition chimique de l'extrait optimisé d'*A. cordifolia*. De plus, nous envisageons évaluer la toxicité de cet extrait afin de le proposer à notre population.

REFERENCES

- Achi N. K., Onyeabo C., Ekeleme-Egedigwe C. A. & Onyeonula J. C. (2017). Phytochemical, proximate analysis, vitamin and mineral composition of aqueous extract of *Ficus capensis* leaves in South Eastern Nigeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(3) : 117-122.
- Adeshina G.O., Kunle O. F., Onaolopo J. A., Ehinmidu J.O. & Odama L. E. (2012). Antimicrobial Activity of the Aqueous and Ethyl Acetate Sub-Fractions of *Alchornea cordifolia* Leaf. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(1) : 31- 41.
- Adeneye A.A., Oreagba A.I., Ishola, I.O. & Kalejaiye H.A. (2014). Evaluation Of The AntiArthritic Activity Of The Hydroethanolic Leaf Extract Of *Alchornea Cordifolia* In Rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11 : 402-410.
- Agbor G.A., Léopold T. & Jeanne N.Y. (2004). The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Phytotherapy Research*, 18 : 873-876.
- Agyare C., Ansah A., Ossei P., Apenteng J. & Boakye Y. (2014). Wound healing and Anti-infective Properties of *Myrianthus arboreus* and *Alchornea cordifolia*. *Medicinal Chemistry*, 4(7): 533-539.
- Al-Dhabi N.A., Ponmurugan K. & Maran J.P. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrason Sonochemistry*, 34 : 206-213.
- Al-Farsi M. A. & Lee C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. *Journal of Food Chemistry*, 108 : 977-985.
- Amor B. 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, France, 175 p.
- AOAC (1975). Analytic Official Methods of Analysis of the Association Chemists. Éd. AOAC. Washington DC : 626-627.
- Arbonnier M. (2002). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD, 2e édition revue et augmentée, paris (France), 573p.

- Ashok P. K. & Upadhyaya K. (2012). Tannins are astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(3): 45- 50.
- Bagre I., Bahi C., Gnahoué G., Djaman A. J. & Guede G. (2007). Composition phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits des feuilles *Moringa morindoides* (baker) milne-redhead (rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *Journal of Sciences Pharmacology and Biology*, 8(1): 15-23.
- Banzouzi J.-T., Prado R., Menan H., Valentin A., Roumestan C., Mallie M. & Blache Y. (2002). In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3): 399–401.
- Bohui G. S.P., Adima A.A., Niamké B.F. & N'Guessan J-C. (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46 :50-58.
- Catarino M.D., Talhio O., Rabahi A., Silva A.M.S. & Cardoso S.M. (2016). The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. *Studies In Natural Product Chemistry*, 48: 65-99.
- Chan S. W., Lee C. Y., Yap C. F., Wan A. & Ho C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*. 16 : 203-213.
- Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., wan-Aida W.M. & Ho C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time, and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18 : 566–573.
- Chira K., Suh J-H., Saucier C. & Teissèdre P-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2) : 75-82.
- Cobanoglu U., Demir H., Sayir F., Duran M. & Mergan D. (2010). Some mineral, trace element and heavy metal concentrations in lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(5) : 1383-1388.

- Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: An overview. *In: Goldberg G (ed) Plants: Diet and Health*. British Nutrition Foundation, Chapman Hall (Londres), pp. 27-48.
- Cushnie T.T. & Lamb A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial. *Intermicrobial Agent*, 38(2) : 99-107.
- Cuyckens F. & Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoïds. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(4) : 1-15.
- Ebenyi & Uraku. (2017). Phytochemical and Nutritional Evaluation of Aqueous and Ethyl Acetate Leaf Extracts of *Alchornea Cordifolia*. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 1(5) : 2572-8377.
- Eliakim-Ikechukwu C.F. & Obri A.I. (2009). Histological changes in the pancreas following administration of ethanolic extract of *Alchornea cordifolia* leaf in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 24 (2) : 149 -15.
- Feinberg M. (1996). La validation des méthodes d'analyse : approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire, Paris:Masson. 395 pp.
- Flood A. U., Peters N., Chatterjee J.J., Lacey C., Schairer & Schatzkin A. (2005). Calcium from Diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(1) : 126-132.
- Friis I. & Harris T. (2013): *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Muell. Arg. (Euphorbiaceae), a disjunct Guineo-Congolian tree found in Ethiopia as dominant in riverine forest. *Webbia*, 68(2) : 147–154.
- Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4) : 162-169.
- Goupy J. (2005) Pratiquer les plans d'expériences. Editions DUNOD, 2005.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expérience. Revue MODULAD, 34 : 74-116.

- Hamid H.A., Ramli A.N.M., Zamri N. & Yusoff M.M. (2018). UPLC-QTOF/MS-based phenolic profiling of Melastomaceae, their antioxidant activity and cytotoxic effects against human breast cancer cell MDA-MB-231. *Food chemistry*, 265 : 253-259.
- Huang W. Y., Cai Y. Z. & Zhang Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition Cancer*, 62(1) : 1-20.
- Ishola I O., Agbaje E.O., Akinleye M.O., Ibeh C. O.& Adeyemi O.O. (2014). Antidepressant like effect of the hydroethanolic leaf extract of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) in mice: Involvement of monoaminergic system. *Journal of Ethnopharmacol*, 158 : 364-372.
- Ismaila O., Ishola R.B., Ashorobi. & Olusegun A. (2012). Evaluation of the antinociceptive activities of the aqueous root extract of *Alchornea cordifolia* (Schumach and Thonn) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *International Journal of Applied Research in Natural Product*, 5 : 37-42.
- Kamenan A., Kouakou-Siransy G., N'guessan I., Dally I. & Kablan B. (2013). Anxiolytic activity of an aqueous extract of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) leaves. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7 : 816-821.
- Kirschweng B., Tátraaljai D., Földes E. & Pukánszky B. (2017). Natural antioxidants as stabilizers for polymers. *Polymer Degradation And Stability*, 145 : 25-40.
- Koffi N. E. (2014). Contribution à l'optimisation de l'extraction et à l'étude chimique des polyphénols de deux plantes de Côte d'Ivoire : *Tectona grandis* Linn (Verbenaceae) et *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae). Thèse de doctorat, UFR des Sciences Fondamentales et Appliquées (SFA), Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), 153 p.
- Koffi N. E., Meudec E., Adjé F. A., Lozano P. R., Lozano Y. F. & Bekro Y. A. (2015). Effect of reverse osmosis concentration coupled with drying processes on polyphenols and antioxidant activity obtained from *Tectona grandis* leaf aqueous extracts. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2 : 54-59.
- Kryscio R.J., Abner E.L., Caban-Holt A., Lovell M., Goodman P., Darke A.K., Yee M., Crowley J. & Schmitt F.A. (2017). Association of antioxidant supplement use and

- dementia in the prevention of Alzheimer's disease by vitamin E and selenium trial (PREADVISE). *JAMA neurology*, 74 :567-573.
- Lubrano V. & Balzan S. (2015). Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World journal of experimental medicine*, 5 : 218.
- M'bra V. P. (2017). Evaluation de l'activité hépatoprotectrice de *Alchornea cordifolia*, et de sarenta une préparation à base de plantes. Thèse de doctorat en pharmacologie, Université Félix Houphouët-Boigny, (Abidjan, Côte d'Ivoire), 87p.
- Mahmoudi S., Khali M. & Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & technologie b- sciences agronomiques et biologiques*, 9 : 35-39.
- Marik P.E., Khangoora V., Rivera R., Hooper MH. & Catravas J. (2017). Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *CHEST*, 151(6) : 1229-1238.
- Marinova D., Ribavora F., Antanassova M. (2005). Total phenolics in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3) : 255-260.
- Mavar-Manga H., Lejoly J., Quetin-Leclercq, J. & Schmelzer G.H. (2007). *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg. In: Medicinal plants/Plantes médicinales 1. Schmelzer G.H. & Gurib-Fakim (Eds), (Wageningen, Netherlands), pp 111.
- Mavar-Manga H., Haddad M., Pieters L., Baccelli C., Penge A. & Quetin-Leclercq J. (2008). Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg. *Journal of Ethnopharmacol.* 115 : 25–29.
- Miller C S. & Gosling W.D. (2014): Quaternary forest associations in lowland tropical West Africa. *Quaternary Science Reviews*, 84 : 7–25.
- Munhoz V. M., Longhini R., Souza J. R. P., Zequi J. A. C., Mello E. V. S. L., Lopes G. C. & Mello J. C. P. (2014). Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: process optimization and screening for biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5) : 576–583.

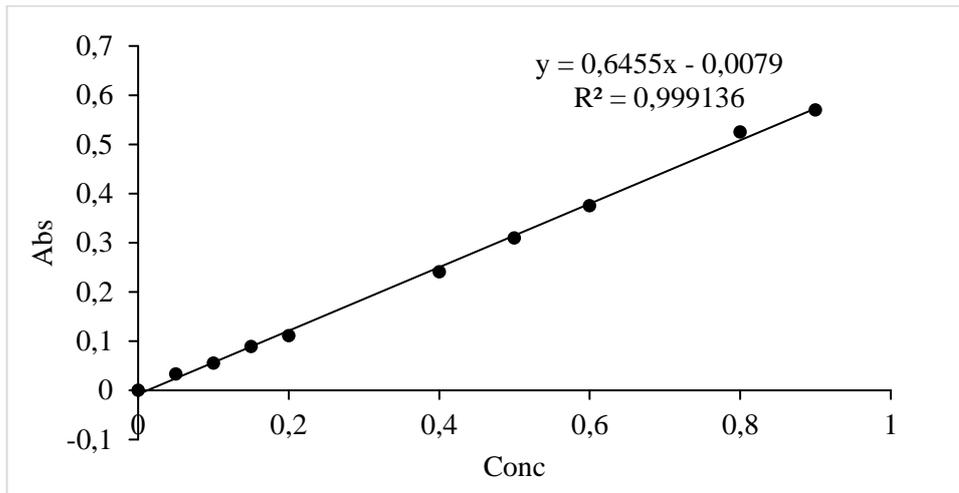
- Naman M., Faid M. & El Adlouni C. (2005). Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *International Journal Of Agriculture & Biology*, 7 : 773–776.
- N'da K.P. (2016). Optimisation de l'extraction des flavonoïdes totaux d'*Hibiscus Sabdariffa Linn* par les techniques séparatives membranaires. Mémoire de Master, substance naturelle, Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny, (Yamoussoukro, Côte d'Ivoire), 53p.
- Ngaha N.M.I., Dahlan I. & Massoma L.D. (2016). *Alchornea Cordifolia*, a Special Plant for Traditional Medicine: A Review. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*. 3(2) : 140-144.
- Ngene J.P., Ngoule C.C., Kidik P.C., Ottou P.M., Dibong S.D. & Mpondo Mpondo E. (2015). Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Application Bioscience*, 88 (1) : 8194-8210.
- Nibir Y.M., Sumit A.F., Akhand A.A., Ahsan N. & Hossain M.S. (2017). Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4): 352–357.
- Noundou X. (2012). Isolation and identification of anti-cancer compounds from *Alchornea* species and their encapsulation in nanostructure drug delivery system. *PHD thesis* University of Johannesburg. reviced from <http://ujdigispace>.
- Noundou X.S., Krause R.W.M., van Vuuren S.F., Ndinteh D.T. & Olivier D.K. (2016). Antibacterial effects of *Alchornea cordifolia* (Schumach. And Thonn.) Müll. Arg extracts and compounds on gastrointestinal, skin, respiratory and urinary tract pathogens. *Journal of. Ethnopharmacol*, 179 : 76–82.
- Nyamien Y., Adjé F., Niamké F., Koffi E., Chatigre O., Adima A. & Biego H. G. (2015). Effect of Solvents and Solid-Liquid Ratio on Caffeine Extraction from Côte d'Ivoire Kola Nuts (*Cola nitida*). *International Journal of Science and Research*, 4 (1) : 218-222.
- Okwu D. E. & Emenike I. N. (2006). Evaluation of the phytonutrients and vitamin contents of citrus fruits. *International Journal of Molecular Medicine and Advanced Medical Sciences*, 1 : 375-381.

- OMS. (2004). Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2004-2023. Genève, 78p.
- Pan G., Yu G., Zhu C. & Qiao J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3): 486 - 490.
- Philip C.N.A., Elijah I.O. & Amos E.K. (2014). Performance Evaluation of New Zealand White Rabbits Fed *Alchornea cordifolia* Leaf Meal as Replacement for Soya Bean Meal, *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2(2): 51-54.
- Pietta P.-G. (2000). Flavonoïds as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7) : 1035-1042.
- Pisoschi A.M. & Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : a review. *European journal of medicinal chemistry*, 97 : 55-74.
- Procházková D., Boulová I. & Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoïds. *Fitoterapia*, 82 : 513-523.
- Saraka A.I., Kouabenan A., Coulibaly k. & Zirihi G.N. (2018). Enquête ethnobotanique sur les Euphorbiaceae médicinales utilisées chez les Baoulés du District de Yamoussoukro. *Journal of Applied Biosciences*, 126 : 12734-12748.
- Solomon E., Litumanya E., Tchatchambe B.N., Van-Damme P., Termote C., Tchatchambe W.B. & Dhed’a D. (2017). Nutritional and toxic substances from leaves of four wild food plants consumed by the riparian population of Yoko forest reserve in Ubundu Territory in the province of Tshopo (DR Congo). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 21(2) : 298-305.
- 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, *Journal of Food Engineering*, 81 : 200-208.
- Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.-O. & Dommes J. (2007). Optimization of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage. *Journal of Food Chemistry*, 105 : 1268-1275.

- Taylor M. D. (2003). Nerve impulse conduction and electrical conduction. Rothwell Press, (London) 245p.
- Teow C. C., Truong V. D., Feeters R. F., Thompson R. L., Pecota K. V. & Yencho G. C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103(3) : 829-838.
- Terao J. (2009). Dietary flavonoids as antioxidants. In : Food Factors for Health Promotion. *Karger*, 67 : 87-94.
- Tra Bi F.H., Irié G.M., N'gaman K.C.C. & Mohou C.H.B. (2008). Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature*, 5(1) : 39-48.
- Wajzman J., Lozano Y. & Chemat F. (2011). Extraction, séparation et purification : du végétal à l'éco-extrait. In : Eco-extraction du végétal : procédés innovants et solvants alternatifs. Chemat Farid. (Dunod), Paris (France) pp 289-319.
- Wang X., Wu Q., Wu Y., Chen G., Yue W. & Liang Q. (2012). Response Surface Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from *Sparganii rhizoma* and Evaluation of Their in Vitro Antioxidant Activities. *Molecules*, 17(6) : 6769–6783.
- Wang B., Qu J., Luo S., Feng S., Li T., Yuan M., Huang Y., Liao J., Yang R. & Ding C. (2018). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from Olive (*Olea europaea*) Leaves, and Evaluation of Their Antioxidant and Anticancer Activities. *Molecules*, 23(10) : 2513.
- Yao K. J.-B., Actchibri A.-O.L., Koffi N.E., N'da K.P. & Adima A.A. (2016). Optimisation of total flavonoids and total antioxidants extraction from *Dacryodes edulis* leaves. *International Journal of Current Research*, 8(11) : 42130-42135.
- Yoon J. (2007). Application of experimental design and optimization to PFC model calibration in uniaxial compression simulation. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, 44(6) : 871-889.
- Yusof A. M., Abd G. S., Zaidan U., Halimi M. & Zainudin B. (2019). Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from cocoa shells (*Theobroma cacao*) using response surface methodology. *Molecules*, 24(4) : 711.

Zhu X.-Y., Mang Y.-L., Xie J., Wang P. & Su W.-K. (2011). Response surface optimization of mechanochemical-assisted extraction of flavonoids and terpene trilactones from *Ginkgo* leaves. *Industrial Crops and Products*, 34(1) : 1041–1052.

ANNEXES

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (Flavonoïdes totaux)**Annexe 2 : Matériel utilisé**

Spectrophotomètre UV- Visible



Spectrophotomètre d'Absorption Atomique



Réfractomètre



Balance



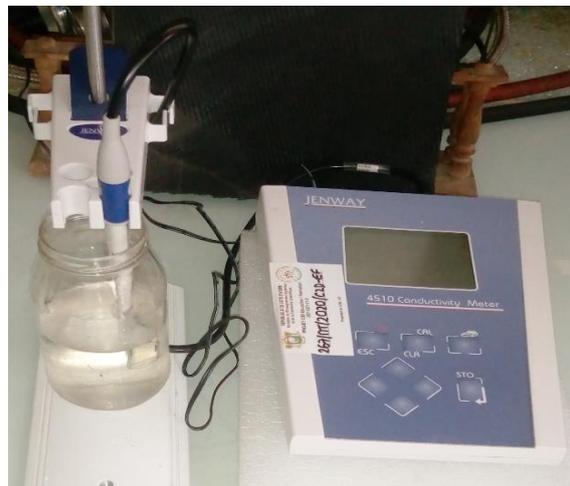
Etuve



Vortex



pH-mètre



conductivimètre



Agitateur



Verreries

RESUME :

Ce travail a pour objectif d'optimiser les conditions d'extraction des flavonoïdes et des antioxydants des feuilles d'*A. cordifolia* à l'aide d'un plan central composite. Pour ce faire, l'influence des paramètres tels que la taille du matériel végétal, le solvant, le mode d'extraction, le ratio (matière végétale/solvant) et le temps d'extraction a été étudiée. L'analyse des résultats indique que pour extraire aux mieux les flavonoïdes totaux et les antioxydants des feuilles d'*A. cordifolia*, il faudrait que l'extraction se fasse par décoction pendant 55 min avec 4 g de broyat de feuilles dissous dans 100 mL d'un mélange eau/éthanol (70/30, V/V). Dans ces conditions la quantité des flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante obtenues sont respectivement de 63,67 mg/g EQ et 205,72 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ TE. Par ailleurs, il faut noter que l'extrait optimisé contient des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les saponines, les polyphénols (tanins et flavonoïdes) et les terpènes/stérols). De plus, il contient à des proportions variables les minéraux tels que le potassium, le calcium, le magnésium ; le sodium, le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc.

Mots clés : *Alchornea cordifolia*, Antioxydants, Flavonoïdes, Plan Central Composite, Optimisation.

ABSTRACT :

The aims of this of this work is to optimize the extraction conditions of flavonoids and antioxidants from the leaves of *A. cordifolia* using a central composite design. To do this, the influence of parameters such as the size of the plant material, the solvent, the extraction mode, the ratio (plant material/solvent) and the extraction time were studied. The results indicate that to best extract total flavonoids and antioxidants from the leaves of *A. cordifolia*, extraction should be done by decoction for 55 min with 4 g of leaf powder dissolved in 100 mL of a water/ethanol mixture (70/30, V/V). Under these conditions the total flavonoids and the antioxidant activity obtained are 63.67 mg/g QE and 205.72 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ TE, respectively. It should also be noted that the optimized extract contains secondary metabolites such as alkaloids, saponins, polyphenols (tannins and flavonoids) and terpenes/sterols). In addition, it contains minerals such as potassium, calcium, magnesium, sodium, iron, manganese, copper and zinc in varying proportions.

Keywords : *Alchornea cordifolia*, Antioxidants, Flavonoids, Central Composite Design, Optimization.