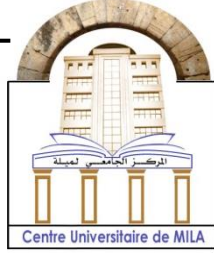


N° Ref :.....



Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila
Institut des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques et Agricoles
Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de
Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée
Thème :

**Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des feuilles
de *Cupressus sempervirens L.***

Présenté par :

- **BOUMISSA HANINE**
- **MESSIOUD AMINA**

Devant le jury :

AMIMOUR.M (MCB)	Centre Universitaire de Mila	Président
AMIRA.A (MAB)	Centre Universitaire de Mila	Examineur
AHMED GAID. K (MCB)	Centre Universitaire de Mila	Promoteur

Année Universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENTS

Nous tenons d'abord à remercier Allah le tout puissant qui à nous donner la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

On tient à remercier très sincèrement notre promotrice Mme **AHMED GAID. K**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce mémoire, pour son infinie gentillesse, sa disponibilité constante et pour avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires pour la réussite de ce travail.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury :

Mme **AMIMOUR .M**, qui a nous fait l'honneur et l'immense plaisir de présider le jury de soutenance. Ainsi que, Mme **AMIRA.A** qui a accepté d'examiner ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et notre respect.

A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, par un geste, une parole, ou un conseil, on leur dit merci.

Nous exprimons nos gratitudees à nos familles **BOUMISSA** et **MESSIOUD** pour leur soutien et leur confiance tout au long de ce travail.

Dédicaces

C'est avec tous de mes sentiments que je dédie ce travail ;

À ma très chère mère.

À mon cher père.

À mon seul frère.

À mes chères amies.

À tous ceux qui mes ont chers.....

Dédicace

Avant tout je remercie Dieu qui m'a donné la puissance, la santé, la volonté et le courage pour achever ce travail Je dédie ce modeste travail :

A la source de la gentillesse et de la tendresse,

A la femme la plus précieuse de l'univers, Chère maman : Zahia A celle qui cherchait ma stabilité et ma réussite.

A la personne que je chéris chaque jour et que je suis de plus en plus reconnaissante de faire partie de ma vie, à papa Ahmad.

A mes chers frères : Walid, Younes et Anis

A Celles qui adoucissent la vie par leur présence, et les oreilles se réjouissent d'entendre leurs voix, mes chères sœurs :

Zineb, Wissam, Chaima et Hadil

A tous les membres de ma famille :Messioud

A tous mes amis

Sans oublier mon ami qui m'ont accompagné dans ce travail Hanine

A Ceux dont je me suis souvenu, et que j'ai oublié.

Amina

Résumé

Ce travail vise à optimiser les conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles du cyprès (*Cupressus sempervirens L.*) par macération dans le méthanol, en utilisant le plan composite centré (PCC). Les facteurs choisis pour l'optimisation sont la concentration de poudre végétale dans le méthanol et le temps de macération. Les résultats ont permis de déterminer les conditions optimales pour maximiser la teneur des extraits en polyphénols totaux. L'extraction optimale a été atteinte avec une teneur de 152 mg EAG/g, obtenue avec une concentration de poudre de 12,67% et un temps d'extraction de 7,28 heures.

L'extrait méthanolique ainsi optimisé a ensuite été soumis à des tests phytochimiques, révélant la présence de polyphénols, d'alcaloïdes, de mucilages, de coumarines et de tanins, mais l'absence de stérols.

Concernant le pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé, les tests ont montré une activité importante contre la souche *Klebsiella pneumoniae*. Pour *Escherichia coli*, l'extrait concentré (100mg/ml) a également démontré un effet notable. En revanche, une sensibilité relativement faible a été observée pour les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : *Cupressus sempervirens L.*, polyphénols, plan composite centré, tests phytochimique, pouvoir antibactérien.

Abstract

This study aims to optimize the extraction conditions of polyphenols from the cypress tree leaves (*Cupressus sempervirens L.*) through maceration in methanol, using the central composite design (CCD). The chosen factors for optimization were the plant powder/methanol concentration and the maceration time. The results allowed to determine the optimal conditions to maximize the polyphenol content. The optimal extraction was achieved with a polyphenol content of 152 mg GAE/g, obtained with a powder-to-solvent concentration of 12.67% and an extraction time of 7.28 hours.

The optimized methanolic extract was then subjected to phytochemical tests, revealing the presence of polyphenols, alkaloids, mucilages, coumarins, and tannins, but the absence of sterols.

Regarding the antibacterial activity of the optimized extract, tests showed a significant activity against the *Klebsiella pneumoniae* strain. For *Escherichia coli*, the concentrated extract (100mg/ml) also demonstrated a notable effect. However, relatively low sensitivity was observed for the *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Keywords: *Cupressus sempervirens L.*, polyphenols, central composite design, phytochemical tests, antibacterial activity.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين ظروف استخراج البوليفينولات من أوراق شجرة السرو *Cupressus sempervirens L.* من خلال النقع في الميثانول، باستخدام تصميم المركب الإحصائي المركزي. تم اختيار نسبة الميثانول إلى مسحوق النبات ووقت النقع كعوامل للتحسين. سمحت النتائج بتحديد الظروف المثلى لزيادة محتوى البوليفينولات. تم تحقيق الاستخلاص الأمثل بمحتوى بوليفينولات يبلغ 152 ملغ/GAE غ، تم الحصول عليها بتركيز مادة تبلغ 12.67% ووقت استخلاص يبلغ 7.28 ساعات.

تم بعد ذلك إخضاع المستخلص الميثانولي المحسن لاختبارات فيتوكيميائية، كاشفة عن وجود البوليفينولات، الفلويات، الصمغيات، الكومارينات والتانينات، مع غياب الستيرويدات.

فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص المحسن، أظهرت الاختبارات نشاطاً كبيراً ضد سلالة *Klebsiella pneumoniae* بالنسبة لسلالة *Escherichia coli*، أظهر المستخلص المركز أيضاً تأثيراً ملحوظاً. ومع ذلك، لوحظت حساسية منخفضة نسبياً ضد سلالات *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*.

الكلمات الرئيسية: *Cupressus sempervirens L.* : بوليفينولات، تصميم مركب مركزي، اختبارات فيتوكيميائية، نشاط مضاد للبكتيريا.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nomenclatures de la plante <i>Cupressus sempervirens</i> L.	3
Tableau 2 : Plan composite centré à deux facteurs	26
Tableau 3 : Niveaux des variables étudiés	26
Tableau 4 : Niveaux de sensibilité des souches en fonction des diamètres des zones d'inhibition.....	29
Tableau 5 : Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles du cyprès par le PCC.....	29
Tableau 6 : Coefficients de régression estimés	31
Tableau 7 : Analyse de la variance (ANOVA).....	32
Tableau 8 : Résultats du criblage phytochimique	35
Tableau 9 : Diamètres d'inhibition (mm) des souches étudiées sous l'action de l'extrait optimisé.....	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Feuilles de <i>Cupressus sempervirens</i>	4
Figure 2 : Cyprès vert (<i>Cupressus sempervirens</i> L.).....	6
Figure 3: Aire de répartition du <i>Cupressus sempervirens</i> . L.....	7
Figure 4: Propriétés pharmacologiques du cyprès	10
Figure 5 : Structure du noyau phénol	12
Figure 6 : Types des Acides phénoliques.....	13
Figure 7: Types des flavonoïdes	14
Figure 8 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose).....	15
Figure 9 : Autres types de polyphénols	15
Figure 10 : Formes mésomère du phénol	16
Figure 11 : Etapes de préparation de poudre des feuilles du cyprès	24
Figure 12 : Graphique de contour de l'extraction de polyphénols	33
Figure 13 : Diagramme d'optimisation de l'extraction des polyphénols	34
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols	38
Figure 15 : Pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé des feuilles de <i>C. sempervirens</i> sur quelques souches bactériennes	39

LISTE DES ABREVIATIONS

CHS: *Cupressus sempervirens, Varhorizontalis*

CSP: *Cupressus sempervirens pyraidalis*

HE : Huiles essentielles

ACHe: Acétylcholinestérase

BchE: Butyrylcholinestérase

C: Degré celcius

DMSO: Diméthyl sulfamides

HCl: Acide chlorhydrique

HSV-1: Les virus de l'herpès

MCV: Maladies cardiovasculaires

OH: Groupe hydroxyle

TYRO: Tyrosine

G+ : Gram positif

G- : Gram négatif

+M : Mésoèmère positif

-M : Mésoèmère négatif

PCC : Plan central composite

Tpm : Tour par minute

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 01 : Présentation de la plante <i>Cupressus sempervirens L.</i>	
1 Présentation de la plante	3
2 Nomenclature	3
3 Taxonomie.....	4
4 Description botanique.....	4
5 Habitat et écologie.....	6
6 Répartition géographique	7
6.1 Dans le monde	7
6.2 En Algérie.....	8
7 Composition chimique	8
8 Utilisations du Cyprès Vert	9
9 Propriétés pharmacologiques.....	9
9.1 Activitéantibactérienne.....	10
9.2 Activitéantivirale	10
9.3 Effetantiparasitaireetinsecticide	11
9.4 Effethypolipidémiant.....	11
9.5 Effet anti-acétylcholinestérase.....	11
9.6 Toxicitéeteffetssecondaires	12
Chapitre 02 : Les polyphénols	
1 Généralités.....	12
2 Classificationdespolyphénols	12
2.1 Polyphénolssimples	12
2.1.1 Acidesphénoliques.....	12
2.1.2 Les flavonoïdes.....	13
2.2 Polyphénols complexes (tanins).....	14
2.3 Autres types	15

3	Propriétés chimiques des polyphénols.....	16
3.1	Polarisabilité.....	16
3.2	Acidité.....	17
3.3	Solubilité.....	17
3.4	Nucléophilie.....	17
3.5	Propriété antioxydante.....	17
4	Propriétés thérapeutiques.....	17
4.1	Polyphénols et maladies cardiovasculaires.....	17
4.2	Polyphénols et cancer.....	18
4.3	Polyphénols et diabète.....	18

Chapitre 03 : Méthodes d'extraction des polyphénols

1	Généralités.....	19
2	Techniques d'extraction des polyphénols.....	19
2.1	Méthodes conventionnelles.....	19
2.1.1	La percolation.....	19
2.1.2	La macération.....	19
2.1.3	La décoction.....	20
2.1.4	Extraction par Soxhlet.....	20
2.1.5	Extraction par reflux thermique.....	20
2.2	Techniques non-conventionnelles.....	20
2.2.1	Extraction par ultrasons.....	20
2.2.2	Extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	21
2.2.3	Décharge électrique à haute tension.....	21
2.2.4	Extraction assistée par enzyme.....	21
3	Facteurs influençant les performances de l'extraction.....	21
3.1	Taille des particules.....	21
3.2	Nature du solvant.....	22
3.3	La température.....	22
3.4	Temps d'extraction.....	23

3.5	Vitesse d'agitation.....	23
-----	--------------------------	----

Matériel et Méthodes

1	Matériel.....	24
1.1	Matériel végétal.....	24
2	Méthodes.....	25
2.1	Extraction par macération.....	25
3	Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux.....	25
3.1	Modèle statistique et facteurs optimisés.....	25
3.2	Analyse statistique.....	27
3.3	Validation du modèle.....	27
4	Dosage des polyphénols.....	27
5	Tests phytochimiques.....	27
6	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	28

Résultats et Discussion

1	Résultats et Discussion.....	29
1.1	Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols.....	29
1.2	Validité du modèle.....	30
1.3	Interprétation des Coefficients.....	30
1.4	Test de confirmation.....	33
2	Résultats du screening phytochimique.....	35
3	Pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé.....	36
	Conclusion et perspectives.....	37

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale



Les plantes médicinales représentent à la fois des produits finis destinés à la consommation et des matières premières pour l'extraction de substances actives. Actuellement, une part significative de la recherche scientifique se concentre sur l'étude des molécules antioxydantes d'origine naturelle. Parmi celles-ci, les polyphénols, des composés largement répandus dans le règne végétal, suscitent un intérêt croissant en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé (**Boucifet et al., 2023**). Ils sont également prisés comme additifs dans diverses industries telles que l'agroalimentaire, la médecine, la pharmacie et la cosmétique (**Suhaj, 2006**). Leur structure leur confère une activité antioxydante remarquable, comparable à celle des vitamines C et E (**Boucifet et al., 2023**).

La méthode d'extraction des composants bioactifs à partir des matériaux végétaux joue un rôle crucial dans leur isolement et leur purification. Les étapes nécessaires pour obtenir un extrait végétal incluent la réduction de la taille, l'extraction, la filtration, la concentration et le séchage (**Azmiret et al., 2013 ; Živković et al., 2018**). Parmi les diverses méthodes d'extraction des polyphénols, la macération est privilégiée pour la détermination des composés polyphénoliques en raison de sa simplicité, de son installation expérimentale minimale, de son faible coût et de son caractère respectueux de l'environnement (**Ćujić et al., 2016**).

Les polyphénols sont largement présents dans le règne végétal (**Torreggiani et al., 2005**). Le cyprès, dont les parties sont riches en composés phénoliques et en huiles essentielles (**Ben Nouri et al., 2015**), est une plante médicinale et ornementale très courante en Algérie (**Bouyahyaoui, 2017**), ses parties sont largement utilisées dans les remèdes populaires pour soulager les maux de tête, les symptômes du rhume, la toux et la bronchite (**Ben Nouri et al., 2015**).

Dans ce contexte, notre travail vise à optimiser une méthode d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Cupressus sempervirens L.* par un système d'extraction simple, fiable et économique, permettant d'obtenir un rendement satisfaisant en polyphénols. Pour atteindre cet objectif, les conditions d'optimisation (concentration poudre/solvant, temps) ont été soumises à une analyse statistique en utilisant un plan d'expériences factoriel complet ; le plan composite centré.

Introduction générale



L'extrait optimisé, présentant une teneur optimale en polyphénols, a ensuite été soumis à des tests phytochimiques pour identifier les groupes chimiques présents, ainsi qu'à un test du pouvoir antibactérien afin de mieux comprendre les effets thérapeutiques de la poudre végétale étudiée.

Notre mémoire se compose de deux grandes parties : La première offre un aperçu bibliographique sur les polyphénols, les techniques de leur extraction, et présente l'espèce *Cupressus sempervirens L.* ainsi que ses propriétés pharmacologiques et ses divers usages. La deuxième partie, la partie expérimentale, décrit le déroulement de l'optimisation statistique, les différents tests utilisés lors du criblage phytochimique, ainsi que la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Elle expose ensuite l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion.

PARTIE 1 :
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Présentation de la plante
« *Cupressus sempervirens L.* »



1 . Présentation de la plante

Cupressus sempervirens L., connu sous le nom de cyprès méditerranéen ou cyprès commun, est un conifère à feuilles persistantes de taille moyenne caractérisé par une forme de couronne très variable, un feuillage vert foncé et de petits cônes bruns ovoïdes. Ses habitats naturels sont les montagnes semi-arides autour du bassin méditerranéen oriental et du Moyen-Orient. Cependant, comme il a une longue tradition de culture depuis l'époque des civilisations anciennes (Caudullo et Rigo, 2016). Le genre *Cupressus*(*Cupressaceae*) se compose de douze espèces réparties en Amérique du Nord, dans le Bassin Méditerranéen et en Asie subtropicale à haute altitude (Rawat et al., 2010).

C.sempervirens est considéré comme un arbre médicinal, car ses feuilles séchées sont utilisées pour les douleurs d'estomac et pour traiter le diabète, et ses fruits séchés sont utilisés pour traiter l'inflammation, les maux de dents et la laryngite, ainsi que comme contraceptif et astringent (Mascolo et al., 1987). De plus, ses graines séchées ont été utilisées pour traiter les blessures, les ulcères, les ecchymoses, les plaies, les boutons, les pustules, les éruptions cutanées et l'érysipèle, et l'huile essentielle des feuilles et des cônes est utilisée en externe pour les maux de tête, les rhumes, la toux et la bronchite. En ce qui concerne ses avantages médicaux et pharmacologiques, *C.sempervirens* est largement utilisé comme ingrédient cosmétique en parfumerie et pour la fabrication des savons, y compris son huile essentielle distillée à partir des pousses (Usher, 1974).

2 . Nomenclature

Les noms attribués au *Cupressus sempervirens* L. sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Nomenclatures de la plante *Cupressus sempervirens* L. (Rahmani, Z. (2022)

Nom scientifique	<i>Cupressus sempervirens</i> L
Nom arabe	السرو
Nom vernaculaire	Sarwel
Nom français	Cyprès d'Italie, cyprès toujours vert.
Nom anglais	Italian cypress, ever green cypress.



3 . Taxonomie

L'espèce *Cupressus sempervirens L.* est classée comme suit (AL-snafi, 2016):

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Gymnospermes
- Classe: *Pinopsida*.
- Ordre : *Pinales*.
- Famille : *Cupressaceae*.
- Genre : *Cupressus*.
- Espèce: *sempervirens*.

4 . Description botanique

Cupressus sempervirens est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 30 mètres de hauteur. Les feuilles mesurent de 0,5 à 1 mm, sont de couleur vert foncé et obtuses. Les cônes mâles font de 4 à 8mm, les femelles de 25 à 40 mm. Ils sont elliptiques-oblongs (rarement globuleux), verts lorsqu'ils sont jeunes et d'un jaune gris brillant une fois mûrs, avec 8 à 14 écailles courtes et obtuses. Chaque caille porte de 8 à 20 graines (IUCN. 2005).

4.1 . Appareil végétatif

- **Les feuilles :** *C.sempervirens* est un conifère à feuillage persistant. Sur de courtes branches, de petites feuilles glanduleuses, squami formes, vert foncé, et aromatiques, sont disposées en au moins quatre rangs avec des pointes émoussé.



Figure 1 : Feuilles de *Cupressus sempervirens* (Frezza et al., 2022)

- **Les fleurs :** Les fleurs mâles sont jaunes à brun clair, riches en pollen allergène (de février à début mars), et se trouvent à l'extrémité des branches, tandis que les femelles, globuleuses et vertes, sont regroupées en bouquets à l'extrémité des nouvelles pousses.
- **Les cônes :** Les cônes, de forme globulaire et verte (mesurant de 3 à 4 cm), sont brillants et légèrement pointus, avec 6 à 14 écailles ligneuses polygonales qui deviennent brun clair à brun foncé à maturité (tous les deux ans). Ils renferment de nombreuses graines ailées (**Camus, 1914**).
- **Les graines :** Les graines sont petites, mesurant entre 4 et 7mm de longueur, et sont munies de deux ailes de chaque côté.
- **Floraison :** Chaque année, la floraison précoce au début du printemps entraîne de nombreuses allergies en raison de la grande quantité de pollen produite. Dans certaines variétés, la surabondance de fruits peut perturber l'esthétique de l'arbre, en particulier chez les formes colonnaires, en provoquant un écartement des branches. Il existe des variétés sélectionnées pour leur faible production de fruits. La pollinisation est principalement assurée par le vent.
- **Pollen :** Le pollen des Cupressacées présente une homogénéité morphologique qui rend difficile la détermination au niveau du genre ou de l'espèce. En février et mars, le genre *Cupressus* produit une grande quantité de pollen, ce qui peut entraîner des réactions allergiques lorsque dispersé (**Boudy, 1950**).



Figure 2 : Cypress vert (*Cupressus sempervirens L.*) (Cheraief *et al.*, 2006)

5 . Habitat et écologie

Le cypress se trouve naturellement dans des climats méditerranéens avec des étés secs et chauds et des hivers pluvieux, ou dans des climats semi-arides dans les régions orientales et intérieures de sa zone de répartition (Farjon, 2010). C'est une espèce légèrement exigeante, tolérante à la sécheresse et à la chaleur (Intini *et al.*, 2004). Sa période de croissance végétative coïncide avec le printemps et l'automne : pendant la période hivernale, elle est en dormance, tandis qu'elle est en repos pendant les chaudes journées estivales, période à laquelle le cypress peut rapidement reprendre vie après la pluie grâce à son système racinaire peu profond mais étendu. Les jeunes plantes ne tolèrent pas les températures basses, tandis que les adultes peuvent survivre à des températures descendant jusqu'à -20 °C (Santini *et al.*, 2000).

Cette espèce croît rapidement lorsqu'elle est jeune sur la plupart des sols, à l'exception des sols sablonneux ou gorgés d'eau. Elle prospère mieux que d'autres espèces sur les sols rocheux, secs et compacts, même si elle préfère les sols riches, profonds, humides et bien aérés, avec un pH neutre, où cependant elle est moins compétitive (Del Favero, 2010)

Le cyprès peut vivre plus d'un siècle dans les peuplements naturels, les plantes âgées de 200 à 500 ans ne sont pas rares (Intini *et al.*, 2004). L'un des plus anciens cyprès vivants se trouve en Italie et est daté de plus de 800 ans. Le cyprès méditerranéen forme des boisements ouverts, car son litière pourrait empêcher le développement de la végétation de sous-étage en raison d'effets allélopathiques (Del Favero , 2010).

6 . Répartition géographique

6.1 . Dans le monde

Le genre *Cupressus* est largement répandu avec douze espèces, principalement dans l'hémisphère nord (Rawat *et al.*, 2011) Ces espèces sont influencées par divers facteurs tels que le climat, le sol et les perturbations humaines et naturelles. Parmi elles, trois sont présentes en Afrique du Nord, souvent confondues sous le nom de *Cupressus sempervirens*. Ces espèces incluent une variété endémique au Maroc, une autre en Algérie, ainsi que trois variétés en Tunisie dans le monde (Nehdi,2013).



Figure 3: Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L. (Nichane, 2016)



6.2 . En Algérie

Parmi les peuplements forestiers de l'Atlas algérien, les cupressacées sont particulièrement intéressantes. Les cyprès se trouvent à des taux de recouvrement variables sur les deux massifs de l'Atlas algérien, souvent en association avec d'autres végétaux ou formant des peuplements clairsemés et isolés. Cependant, peu de données sont disponibles sur leur répartition sectorielle et leur peuplement. Les espèces endémiques ou naturalisées incluant le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana A. Camus*), le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica Gaussen*) et le cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens L.*).

Le cyprès de l'Arizona (*Cupressus arizonica Greene*), une espèce introduite et peu utilisée, tolère également bien les conditions d'un milieu xérothermique. Le cyprès vert (*Cupressus sempervirens L.*) est le plus répandu et offre une grande diversité de formes, utilisé à des fins ornementales, en brise-vent ou en tant qu'arbre forestier (**Bouyahyaoui, 2017**).

7 . Composition chimique

Des recherches sur les composants chimiques contenues dans *Cupressus sempervirens L.* ont mis en lumière la présence de plusieurs éléments actifs aux propriétés potentiellement bénéfiques pour la santé humaine. Parmi ces composés, on trouve :

- ✓ Des flavonoïdes (cupressuflavone, amentoflavone, rutine, quercitrine, quercétine et myricitrine)
- ✓ Des composés phénoliques (anthocyanidines, catéchines, flavones, flavonols et isoflavones, tanins et catéchol.)
- ✓ Des huiles essentielles (HE) (**Ben Nouri et al., 2015**).

Des analyses approfondies ont révélé que la composition en composés volatiles de *Cupressus sempervirens L.*, communément appelé cyprès commun, varie significativement en fonction des provenances géographiques. Les principaux composants identifiés dans différentes parties de l'arbre (rameaux et cônes) incluent, entre autres, l' α -Pinène, le δ -3-carène, le cedrol, le Terpinolène, le Limonène et l'acétate d' α -terpényle (**Ismail et al., 2013**).



8 . Utilisations du Cyprès Vert

Cupressus sempervirens L. se distingue comme une plante aromatique et médicinale et traditionnelle, riche en vertus pour la santé humaine (**Amara et Boughérara, 2017**).

Les feuilles séchées de cette plante sont employées comme un stimulant menstruel et pour apaiser les douleurs stomacales, en plus d'être utilisées dans le traitement du diabète. Quant à son fruit séché, il est utilisé pour traiter l'inflammation, les maux de dents, la laryngite, et il est également considéré comme un contraceptif, un astringent et un remède contre les flatulences. Les graines séchées sont employées dans le traitement de diverses affections cutanées telles que les plaies, les ulcères, les ecchymoses, les boutons, les pustules, les éruptions cutanées et l'érysipèle. En ce qui concerne l'huile essentielle du cyprès, elle est utilisée en application externe pour soulager les maux de tête, les symptômes du rhume, la toux et la bronchite (**BenNouri et al., 2015**).

Les cônes ont également été employés pour leurs propriétés anti-diarrhéiques, antiseptiques, astringentes, toxifuges, anti-hémorroïdaires, vasoconstrictrices et antirhumatismales (**Kassem et al., 1991**). L'huile essentielle de cette plante est appliquée en externe pour soulager les maux de tête, les symptômes du rhume, la toux et la bronchite (**Amara et Boughérara, 2017**). Ses huiles sont employées dans divers domaines tels que la pharmacie, les cosmétiques, les parfums et l'industrie alimentaire (**Bouyahyaoui, 2017**).

La décoction des cônes et des feuilles du cyprès était utilisée pour les hémorroïdes. Il a été également décrit comme déodorant et diurétique, pour favoriser la circulation veineuse vers les reins et la zone de la vessie, et pour améliorer le tonus de la vessie, ainsi que comme co-adjuvant dans la thérapie de l'incontinence urinaire et de l'énurésie (**Mahmood et al., 2013**).

9 . Propriétés pharmacologiques

La figure ci-dessous présente une multitude de propriétés pharmacologiques du cyprès :

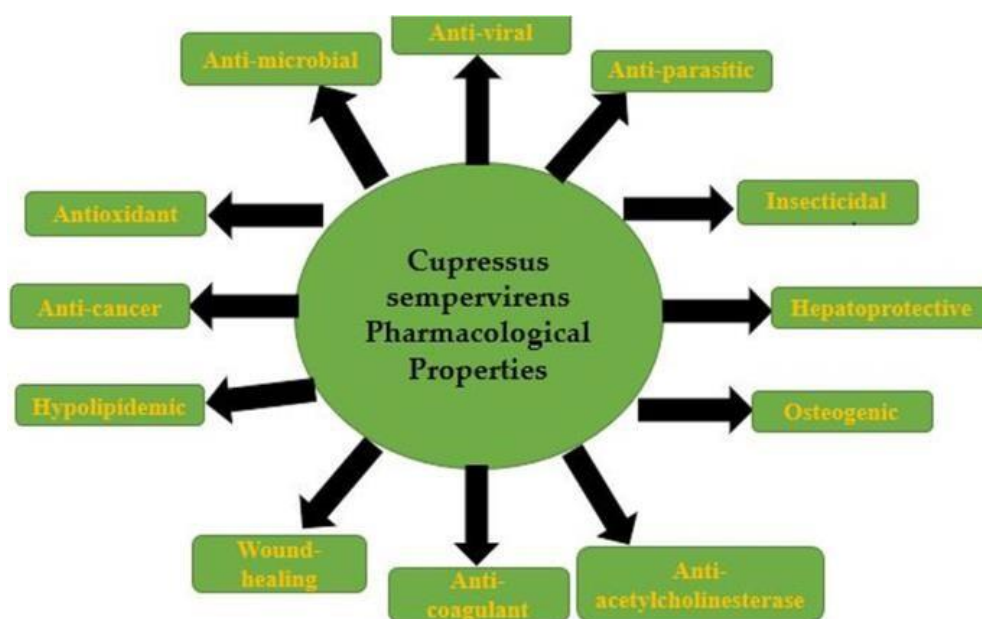


Figure 4: Propriétés pharmacologiques du cyprès (Batiha *et al.*, 2022)

9.1 . Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de méthanol, d'éthanol et d'acétate d'éthyle des parties aériennes de *Cupressus sempervirens* a été étudiée contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *K. pneumoniae* et *S.typhimurium*. Tous les extraits ont induit une inhibition de la croissance bactérienne contre toutes les bactéries testées (Boukhris *et al.*, 2012). Une autre étude a porté sur l'activité antibactérienne des extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle de feuilles de *Cupressus sempervirens* contre six bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhimurium*) en utilisant la méthode de diffusion en puits d'agar. Parmi les extraits de plantes, une activité antimicrobienne significative a été obtenue avec les extraits méthanoliques, suivis des extraits d'acétate d'éthyle et d'éthanol. L'extrait méthanolique a montré une activité inhibitrice maximale contre *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *S. aureus*. L'extrait éthanolique a présenté une activité plus élevée contre *P. aeruginosa*. Une activité inhibitrice plus grande contre *S. typhimurium* et *E. coli* a été observée avec l'extrait d'acétate d'éthyle de *Cupressus sempervirens* (Zhang *et al.*, 2012).

9.2 . Activité antivirale

Dans une étude menée par EL-Sheikh *et al.*, (2011), les extraits d'éthanol du *Cupressus*

sempervirens, *C.semipervirens* ainsi que les variants : *horizontalis* et *cereiformis* ont été utilisés pour tester leur influence sur le virus de l'herpès (HSV-1). Les résultats ont montré que les trois plantes ont une activité antivirale contre le virus. L'extrait le plus actif était l'extrait obtenu à partir de *C.semipervirens*. Parmi les différentes parties testées, l'extrait du fruit possédait l'activité anti-HSV la plus forte.

9.3 . Effet antiparasitaire et insecticide

Selon **Moussa et al.,(2011)**, les extraits éthanoliques, d'acétone et d'éther de pétrole des feuilles du Cyprès de Provence égyptien ont été testés contre les larves du 3^{ème} stade dumoustique *Culex pipiens*. Les résultats obtenus ont indiqué que les extraits d'éther de pétrole étaient plus efficaces que les extraits éthanoliques et d'acétone. Une réduction remarquable à la fois du pourcentage de pupation et de l'émergence des adultes a été obtenue. De plus, tous les extraits ont exercé un effet toxique retardé sur les pupes et les adultes après le traitement des larves, et différents degrés d'anomalies morphogéniques ont été observés aux stade simmature et adulte. (**Moussa et al., 2011**)

9.4 . Effet hypolipidémiant

Les effets de l'extrait de cône de cyprès sur le profil lipidique ont été étudiés chez des rats Wistar. L'administration orale de l'extrait a entraîné une diminution substantielle du cholestérol total sérique, qui était significative même après 6 semaines de traitement. De plus, ces animaux ont présenté des niveaux de cholestérol total inférieurs par rapport aux témoins après le début du traitement. L'administration de l'extrait a également entraîné une réduction substantielle des triglycérides sériques, en comparant les semaines 0 à 6-24 (**Ali et al.,2010**).

9.5 . Effet anti-acétylcholinestérase

En 1998, Flemming a démontré que les extraits de dichlorométhane, d'acétone, d'acétate d'éthyle et de méthanol des cônes et des feuilles de *Cupressus sempervirens var.* et *var. pyramidalis* ont été testés pour leur activité inhibitrice contre l'acétyl cholin estérase, la butyryl cholin estérase et la tyrosinase. Les extraits ont montré une inhibition faible à modérée des cholinestérase à 200 µg/ml. L'extrait de dichlorométhane de cônes a présenté la plus forte inhibition contre l'acétylcholinestérase, tandis que la meilleure inhibition contre la butyrylcholinestérase a été causée par l'extrait d'acétone des feuilles. (**Flemming, 1998**).



9.6 . Toxicité et effets secondaires

De nombreuses études ont montré que le pollen de *Cupressus sempervirens* était le composant majeur des aérosपोres en hiver et au début du printemps. Une série de patients rencontrés de 1994 à 1996 à Rome a révélé une incidence de 9,33 % de réponses positives au test cutané au pollen de cyprès chez une population présentant un statut atopique. Cette série comprenait 16 (19,05 %) sujets allergiques uniques et 68 (80,95 %) sujets allergiques multiples. Parmi les premiers, les symptômes rencontrés étaient la rhinite(62,5%) et l'asthme(37,5 %) (**Al-Snafi, 2016**).

Les risques pour la santé ou les effets secondaires suivant l'administration correcte des dosages thérapeutiques désignés ne sont pas enregistrés.

Une irritation rénale était probable avec la prise de doses plus élevées (**IUCN. 2005**).

Chapitre 2

Les polyphénols



1 . Généralités

Depuis plusieurs années, les chercheurs et les acteurs de l'industrie agroalimentaire portent un intérêt croissant à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés antioxydantes de ces composés, leur présence abondante dans l'alimentation et leur rôle potentiel dans la prévention des maladies associées au stress oxydatif sont les principales motivations de cet engouement.

Les polyphénols, également connus sous le nom de composés phénoliques, sont des molécules propres au règne végétal (**Torreggiani *et al.*, 2005**) et sont présentes dans toutes les parties des plantes, des racines aux fruits. Bien qu'ils ne soient pas essentiels à la survie des plantes, ces substances jouent un rôle crucial dans leurs interactions avec l'environnement, contribuant ainsi à leur adaptation et à leur survie dans leur écosystème.

Environ 10000 composés naturels sont regroupés sous le terme "phénols", caractérisés par la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, au quel est lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction, comme un éther, un ester ou un hétéroside (**Kakhlon et Cabantchik 2002 ; Welch *et al.*, 2002**).

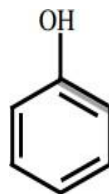


Figure 5 : Structure du noyau phénol (**Stookey, 1970**)

2 . Classification des polyphénols

2.1 . Polyphénols simples

2.1.1 . Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont constitués de cycles aromatiques avec un groupe acide carboxylique (-COOH). Ces phénols représentent la principale classe de composés phénoliques végétaux. En raison de leur propriétés antioxydantes, ils protègent contre les maladies cardiovasculaires (**Behl *et al.*, 2020**).

Le cycle aromatique peut perdre son électron, formant des radicaux hydrogène libres qui agissent comme agents réducteurs et éteignent les radicaux libres. Les aliments végétaux, notamment les graines, les écorces de fruits et les légumes à feuilles, sont la principale source d'acides phénoliques. Ceux-ci représentent un large éventail d'applications cosmétiques, nutritionnelles et thérapeutiques (Rashmi et Negi, 2014).

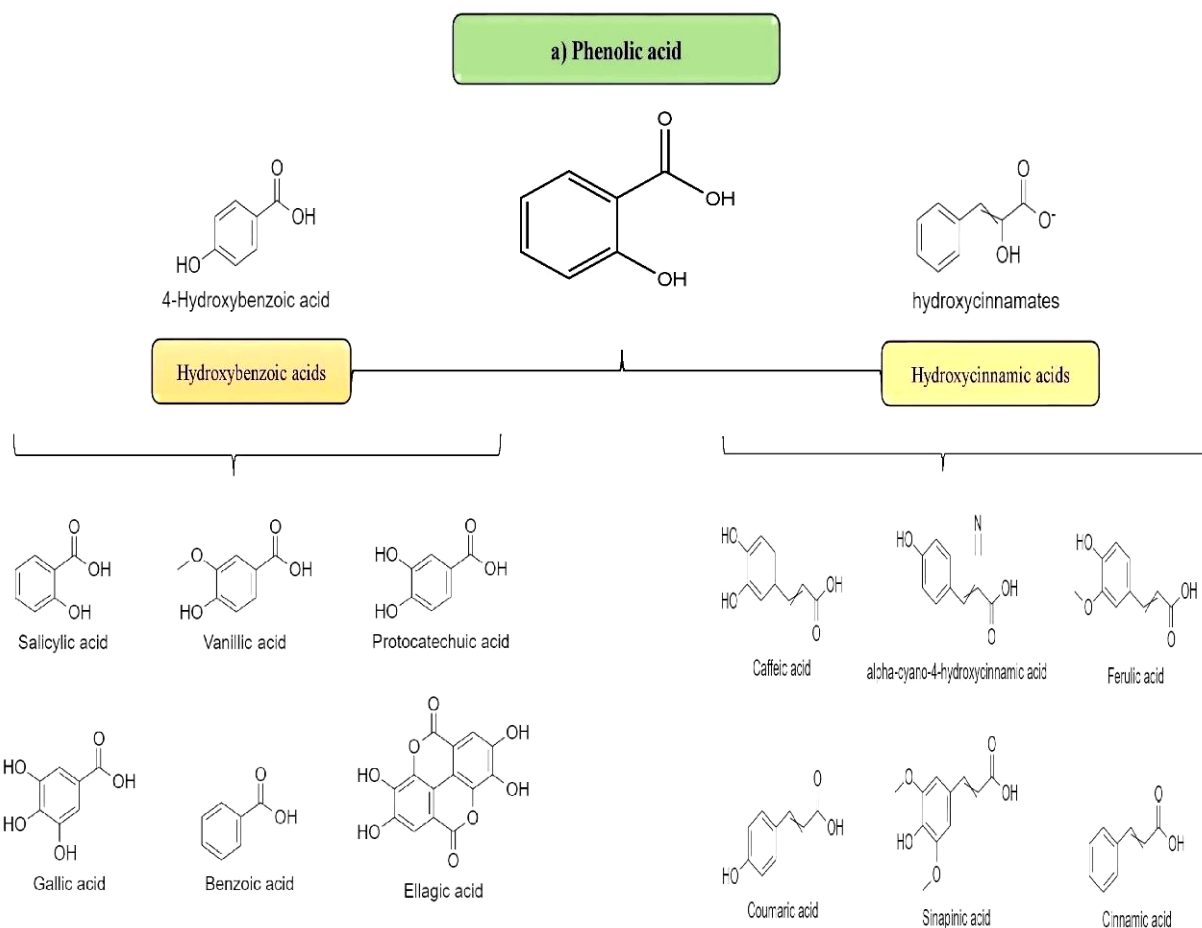


Figure 6 : Types des Acides phénoliques (Prabhu, *et al.* 2021).

2.1.2 . Les flavonoïdes

Un flavonoïde est un groupe principal de métabolites végétaux de composés polyphénoliques. Cette structure, composée de 15 atomes de carbone, comprend deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois atomes de carbone (Harborne, 1998).

Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction du cycle C auquel le cycle B est attaché, de leur configuration et de l'oxydation du cycle C. Les principales catégories de flavonoïdes, comprenant les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavan-3-ols, les flavanones et les anthocyanidines, constituent la classe principale de flavonoïdes (Rasouli *et al.*, 2017 ; Singla *et al.*, 2019)

On les trouve principalement dans les baies, l'oignon, le thé, les raisins et les pommes, et ils présentent de nombreux attributs bénéfiques pour la santé, notamment des propriétés de signalisation cellulaire, antithrombogènes et neuroprotectrices (**Ballard et Junior, 2019**).

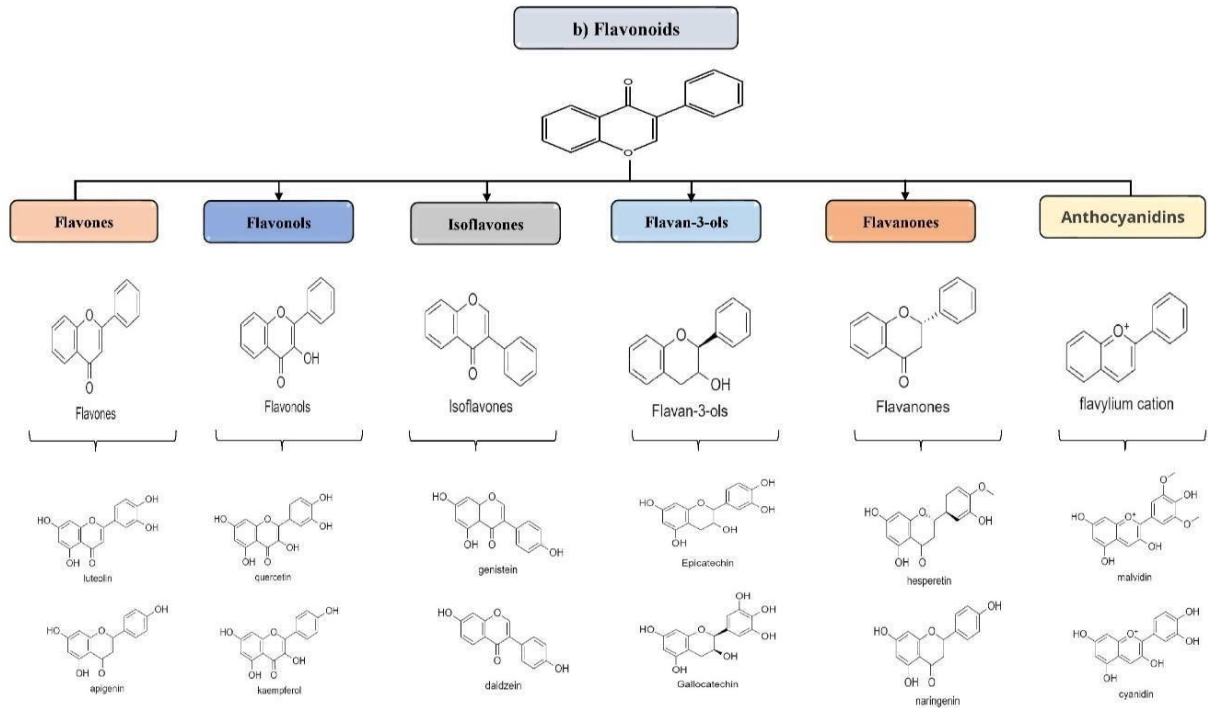


Figure 7: Types des flavonoïdes (**Prabhu, et al. 2021**).

2.2 . Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins sont des polyphénols essentiels présents dans les vacuoles cellulaires. Historiquement, le terme "tanin" englobe des composés polyphénoliques ayant la capacité de se lier aux protéines, ce qui explique leur utilisation dans le tannage du cuir. Structuellement, ils sont classés en deux groupes principaux : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Les tanins hydrolysables** : sont des esters formés à partir du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, notamment l'acide ellagique. Ils peuvent être facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique, en particulier par l'action de la tannase.
- **Les tanins condensés** : également appelés pranthocyanidines, sont des polymères composés d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6.

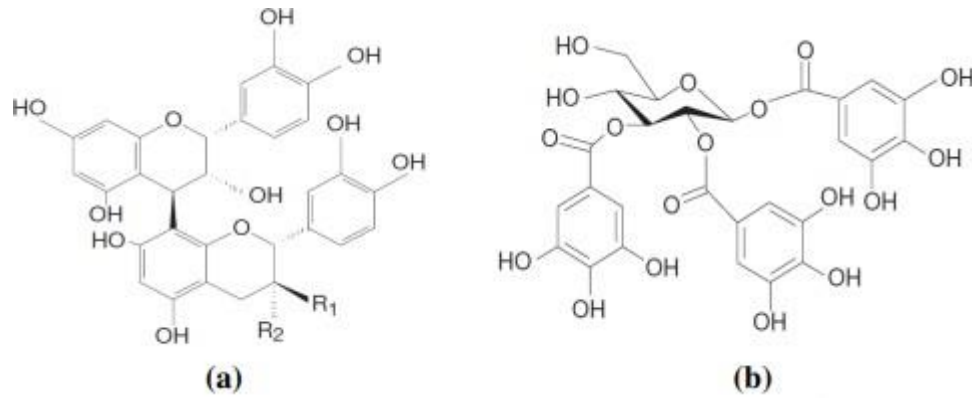


Figure 8 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) (Prabhu, et al. 2021)

2.3 . Autres types

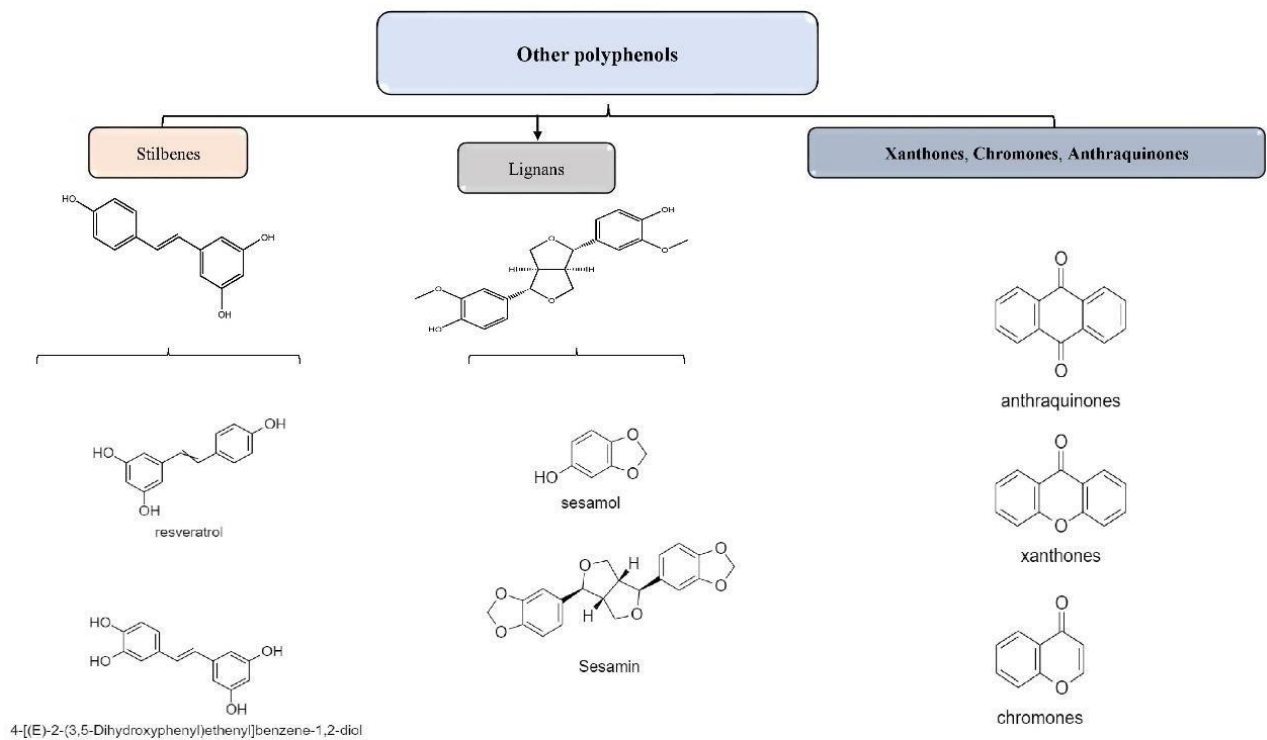


Figure 9 : Autres types de polyphénols (Prabhu,et al. 2021)

- **Lignines**

Dans les plantes et les arbres, la lignine est particulièrement importante car elle contribue à la formation de la paroi cellulaire. Ils sont importants car ils contribuent à donner force et rigidité aux arbres. Il existe trois types de réticulations obtenues à partir du phényl propane et ces réticulations sont l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool paracoumarylique. Certains aliments riches en lignine sont les graines de lin, les tomates, les pêches, les pommes et quelques baies (Popa *et al.*, 2008).

- **Les stilbènes**

Les stilbènes sont des composés organiques qui ont une structure compacte avec une fraction d'éthylène centrale et un groupe phényle. Le groupe phényle est situé aux extrémités des doubles liaisons carbone (Chou *et al.*, 2018).

3 . Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont principalement influencées par les noyaux phénoliques, en particulier par les substituants qui attirent les électrons (M-) et ceux qui les donnent (M+). L'effet (M+) du groupe OH se manifeste par la conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle, augmentant ainsi la délocalisation électronique et générant une charge négative partielle sur les atomes C2, C4 et C6. Cet effet (M+) peut être représenté par quatre formes mésomères (Laouini, 2014).

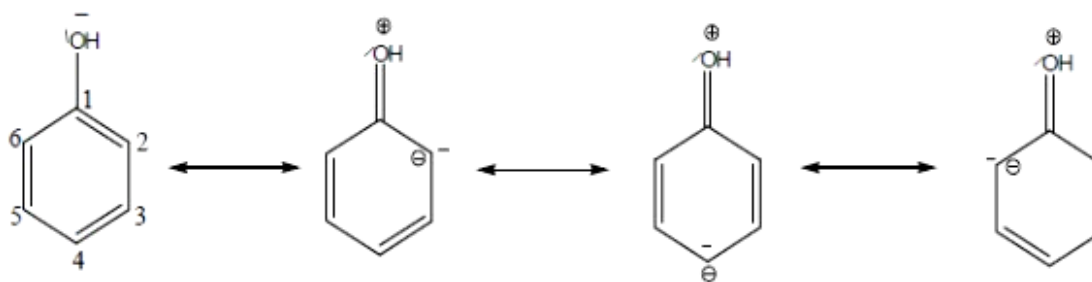


Figure 10 : Formes mésomère du phénol (Laouini, 2014)

3.1 . Polarisabilité

Les phénols en solution aqueuse développent des interactions de dispersion avec d'autres composés polarisables, grâce à leur polarisabilité et à l'effet hydrophobe. Cela

conduit au relargage de certaines molécules d'eau de solvation, ce qui stabilise les complexes moléculaires formés.

3.2 . Acidité

La déprotonation des phénols forme des ions phénates avec une forte délocalisation électronique. La solvation de ces ions par liaison hydrogène avec l'eau explique leurs propriétés acides faibles. La polarisabilité est amplifiée lors de la formation des anions phénates. Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques présentent un caractère acide renforcé, ce qui favorise une dissociation partielle à pH neutre, grâce à la stabilisation de l'ion phénate par délocalisation de la densité électronique (**Laouini, 2014**).

3.3 . Solubilité

Les composés phénoliques sont solubles dans la majorité des solvants organiques polaires.

3.4 . Nucléophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est principalement due à l'atome d'oxygène et aux atomes de carbone en position ortho et para par rapport au groupe hydroxyle(OH), résultant de l'effet mésomère positif (+M). Cette caractéristique conduit à des réactions de substitution électrophile aromatique (**Nkhili,2009**).

3.5 . Propriété antioxydante

Les composés phénoliques sont des antioxydants efficaces capables de neutraliser les radicaux libres en cédant un électron ou un atome d'hydrogène. Grâce à cette propriété, ils jouent un rôle crucial dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs (**Boubekri, 2014**).

4 . Propriétés thérapeutiques

4.1 . Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Le potentiel antioxydant des polyphénols est directement lié à leurs propriétés cardioprotectrices. Ces composés contribuent à réduire la pression artérielle, améliorer la fonction endothéliale et inhiber l'agrégation plaquettaire. Ils le font en réduisant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et en diminuant la réponse inflammatoire.

Les flavonoïdes présents dans le cacao et le soja montrent des résultats favorables pour la santé cardiovasculaire. Un régime riche en flavanols, notamment ceux contenus dans le cacao, diminue l'incidence des maladies cardiovasculaires, de l'hypertension et abaisse la pression artérielle. Des études ont révélé que la consommation fréquente de thé noir réduit le risque d'hypertension. Les raisins pourpres exercent aussi des effets bénéfiques sur la santé cardiaque, contribuant ainsi à une meilleure prévention des maladies cardiovasculaires (**Abbas, et al 2017**).

4.2 . Polyphénols et cancer

Les polyphénols et les composés bioactifs présents dans le thé, le vin rouge, le cacao, les fruits, les jus de fruits et l'huile d'olive influencent la carcinogenèse et le développement des tumeurs au niveau cellulaire. Par exemple, ils peuvent interagir avec les nutriments, les métabolites réactifs, les carcinogènes activés et les mutagènes (**Gopalakrishnan et Tony Kong, 2008**). De plus, ils peuvent moduler l'activité de protéines clés impliquées dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et influencer l'expression de nombreux gènes associés au cancer.

Les flavanols du thé vert, étudiés dans des modèles animaux, ont démontré des effets significatifs et des propriétés anticancéreuses sur les lignées cellulaires humaines et dans des études d'intervention humaine. De plus, la consommation de thé vert a été associée à une réduction significative du risque de cancer des voies biliaires, de la vessie, du sein et du côlon (**Karin et Greten, 2005 ; Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Abbas, et al., 2017**).

4.3 . Polyphénols et diabète

L'apport de polyphénols et le maintien de la sécrétion d'insuline par les cellules β en culture ont été observés dans de nombreuses études. Une forte consommation de polyphénols a également été associée à une protection contre les dommages oxydatifs induits par une augmentation du glucose chez les rats, et la sécrétion d'insuline peut également être modulée chez les humains (**Tull et al., 2010 ; Rodrigo et al., 2011**).

Les principaux composants des polyphénols sont stockés dans le tractus intestinal et, sans être absorbés, sont dirigés vers le côlon. Le saccharose et l'amidon réagissent avec ces composants. Les extraits riches en polyphénols réduisent l'activité des enzymes telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, qui sont impliquées dans la libération de glucose à partir de

l'amidon dans le tractus gastro-intestinal. L'inhibition de ces enzymes peut varier en fonction de la composition phénolique des extraits (McDougall *et al.*,2005 ; Boath *et al.*, 2012).

Chapitre 3

Techniques d'extraction des polyphénols



1 . Généralités

Durant les dernières décennies, la demande croissante pour des produits végétaux riches en polyphénols reflète un intérêt accru pour les options alimentaires saines et fonctionnelles s (**Iriondo-Dehond *et al.* 2018**). Répondre à cette demande nécessite le développement de techniques d'extraction innovantes qui préservent la qualité des aliments tout en maximisant la récupération des polyphénols. La recherche continue dans ce domaine est essentielle pour exploiter pleinement les bienfaits pour la santé offerts par ces composés naturels.

Plusieurs techniques d'extraction sont utilisées, notamment le Soxhlet et la macération, qui sont des méthodes traditionnelles et bien établies dans le domaine de l'extraction des composés bioactifs.

Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par ultrasons (**Zhou *et al.* 2019**), et l'extraction assistée par micro-ondes (**Rodsamran et Sothornvit, 2019**) offrent des avantages significatifs en termes d'efficacité et de respect de l'environnement.

2 . Techniques d'extraction

2.1 . Méthodes conventionnelles

Les méthodes d'extraction conventionnelles incluent principalement la percolation, la décoction, l'extraction par reflux à chaud, l'extraction Soxhlet et la macération.

2.1.1 . La percolation

Elle est utilisée pour séparer les composés actifs à partir d'un extrait liquide. Elle consiste en un percolateur étroit (généralement en forme de cône). L'échantillon est mélangé avec de l'eau, et la solution est ajoutée par le haut à travers la colonne dans un récipient fermé. Le mélange s'infiltré avec le temps, obtenant ainsi l'extrait pur. L'extrait humide enrichi est ensuite concentré dans des évaporateurs pour obtenir la concentration désirée (**Hansen et Møller .1975 ; Rathore *et al.* 2012**).

2.1.2 . La macération

La macération est l'une des méthodes de référence pour la détermination des composés polyphénoliques (**Ćujić *et al.* 2016**). Cela est dû à sa simplicité, à son installation expérimentale minimale, à son faible coût et à ses caractéristiques respectueuses de l'environnement. La vitesse d'agitation et le temps sont les deux facteurs les plus importants à considérer dans cette technique.



2.1.3 . La décoction

Elle consiste à faire bouillir l'extrait aqueux brut jusqu'à un certain volume pendant un temps spécifique pour obtenir les substances thermiquement stables. Le liquide se dépose puis il est refroidi et ensuite filtré. Cette technique peut être utilisée pour extraire les constituants hydrosolubles. Cependant, il convient de noter que cette procédure est inefficace pour les composés sensibles à la chaleur et à la lumière, mais elle reste largement utilisée pour les plantes médicinales (**Rijo et al. 2014 ; Hashemi et al. 2019**).

2.1.4 . Extraction par Soxhlet

C'est le processus le plus largement utilisé pour les besoins d'extraction impliquant la concentration de l'analyte conduisant à la séparation des constituants bioactifs des produits naturels. La préparation de l'échantillon est la plus critique et peut être effectuée en utilisant diverses techniques (**De Castro et Priego-Capote 2010**). Cette technique permet de répéter sans fin le processus d'extraction avec du solvant frais jusqu'à ce que le soluté dans la matière première soit complètement épuisé (**Penchev, 2010**).

2.1.5 . Extraction par reflux thermique

Cette technologie implique le chauffage de la matrice pendant un temps particulier, ce qui entraîne une réaction chimique complexe. Comme le processus utilise un extracteur à reflux comme réacteur principal, un meilleur transfert de masse et une meilleure efficacité de contact sont obtenus entre le solvant et la matrice traitée (**Tian et al. 2016**). La vapeur descend jusqu'à l'Erlemeyer, contrôlant ainsi la température de la réaction. La technologie a été préférée en raison de sa simplicité et de sa facilité d'utilisation (**Zhang et al. 2018**).

2.2 . Techniques non-conventionnelles

2.2.1 . Extraction par ultrasons

La matière première est plongée dans l'eau ou dans le solvant, tout en étant exposée aux ultrasons. (20 à 100 kHz). Cette technique émergente présente une grande reproductibilité en un temps record, trois fois plus rapide qu'une extraction traditionnelle par solvant, sa mise en place est simple et nécessite peu de solvant et d'énergie (**Chemat et al., 2004**).



2.2.2 . Extraction par Solvant Assistée par Micro-Ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une autre technique avancée utilisée pour l'isolement des composés polyphénoliques. L'introduction d'un champ électrique et magnétique entraîne le transfert de chaleur et la conduction, ce qui résulte en un moment dipolaire entre le solvant et l'échantillon.

La rotation entraîne également des collisions successives, ce qui produit de l'énergie thermique dans un environnement clos. Le phénomène se produit très rapidement car le chauffage se produit dans un milieu clos (**Wen et al. 2020**).

2.2.3 . Décharge électrique à haute tension

C'est une technologie durable impliquant l'application de hautes tensions dans une solution aqueuse. Le principe peut être décrit en deux phases : la première phase implique l'introduction de légères ondes de choc dans l'échantillon alimentaire, formant ainsi de petites bulles. En ajustant l'intensité du champ électrique, on initie la deuxième phase, ce qui entraîne la libération des ingrédients actifs de l'échantillon (**Roselló-Soto et al. 2015**).

2.2.4 . Extraction assistée par enzyme

C'est une technologie durable qui implique l'introduction d'enzymes dans un mélange pour améliorer l'efficacité globale. Le mécanisme de base implique la rupture de la paroi cellulaire du matériau alimentaire par hydrolyse à l'aide d'une enzyme en tant que catalyseur dans des conditions d'extraction optimales pour la libération des composants bioactifs (**Nadar et al. 2018**).

3 . Factures influençant les performances de l'extraction

3.1 . Taille des particules

La nature et la taille des particules ont une influence directe sur la vitesse d'extraction. En effet, lorsque le soluté est réparti dans tout le grain, le solvant va d'abord dissoudre le soluté à la surface puis devra progresser à l'intérieur du grain afin de dissoudre les particules de soluté (**Andrei, 2011**).



3.2 . La nature du solvant

Dans les processus d'extraction, le type de solvant est le paramètre principal qui affecte l'efficacité du processus, car il détermine deux facteurs importants : la solubilité des composés cibles; et la pénétrabilité dans la matrice.

Les caractéristiques du solvant à prendre en compte comprennent:

- La sélectivité : elle garantit la solubilisation des composés cibles et leur pureté.
- La réactivité : le solvant ne doit pas réagir avec les composés cibles.
- La stabilité chimique et thermique : elles doivent être assurées dans les conditions d'extraction.
- La viscosité : une faible viscosité augmente le taux de transfert de masse en augmentant le coefficient de diffusion.
- Le point d'ébullition : un faible point d'ébullition nécessite peu d'énergie pour l'élimination du solvant de l'extrait.
- L'inflammabilité : les solvants inflammables doivent être évités.
- La toxicité et les problèmes réglementaires : les problèmes environnementaux et de santé doivent être pris en compte, à la fois pour le consommateur des produits naturels et pour l'opérateur du système d'extraction.
- Les aspects économiques : le coût du solvant peut représenter une part importante des coûts de fabrication à l'échelle industrielle (**Rostagno, 2013**).

3.3 . La température

La température a généralement un effet significatif sur le processus d'extraction car les changements de celle-ci modifient les propriétés à la fois du soluté et du solvant. La température affecte la solubilité et la diffusivité des solutés ainsi que la viscosité et la tension de surface des liquides. De plus, elle peut fournir l'énergie nécessaire pour perturber les interactions intermoléculaires entre les composants de la matière première et rendre les composants cibles disponibles pour le solvant d'extraction.

D'autre part, dans l'extraction des produits naturels, il est nécessaire d'utiliser des conditions moins agressives, telles qu'une température modérée et une protection contre la lumière et l'oxygène, pour prévenir la dégradation de certains composés thermosensibles qui diminueraient la qualité du produit. Par exemple, lors de l'extraction du bêta-carotène à partir de cynorrhodons ; le rendement augmente avec l'augmentation de la température, mais au-dessus de 45°C, une dégradation du bêta-carotène est observée (**Rostango, 2013**).



3.4 . Temps d'extraction

Les quantités de substances extraites varient en fonction du temps de dépôt du matériel dans le solvant (temps nécessaire pour que le solvant pénètre dans les vacuoles, pour que le composé se dissoute, etc.). En règle générale, une augmentation de la température qui reflète l'agitation moléculaire permet de réduire les temps de contact, tout en ne réduisant pas significativement le rendement (**Ben Amor, 2008**).

3.5 . Vitesse d'agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération. Dans le cas de l'extraction aqueuse, l'agitation permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide (couche limite) et d'augmenter le coefficient de transfert.

Si l'agitation est maintenue durant une longue période, elle va favoriser les chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (**BenAmor,2008**).

PARTIE 2 :

Partie pratique

MATERIEL & METHODES



1 . Matériel

1.1 . Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans ce travail est constituée des feuilles du cyprès (*Cupressus sempervirens L.*). Elles ont été récoltées en 20 février 2024 dans le village de BouFouh (Commune de Zeghaia), situé aux coordonnées 36°28'18"N, 6°12'47"E, à une altitude de 509 mètres au-dessus du niveau de la mer. Cette zone est caractérisée par un climat méditerranéen humide.

La partie aérienne de la plante a été lavée à l'eau courante pour éliminer la poussière, puis séchée à l'ombre dans un endroit sec pendant 10 jours jusqu'à déshydratation complète. Une fois séchées, les feuilles ont été broyées et stockées jusqu'à leur utilisation.



Figure 11 : Etapes de préparation de poudre des feuilles du cyprès (photos personnelles)



2 . Méthodes

2.1 . Extraction par macération

Afin de quantifier et de maximiser le taux de polyphénols totaux à extraire, la poudre des feuilles de *C. Sempervirens* a été soumise à une extraction méthanolique par macération dans le méthanol sous agitation constante de 100 tpm.

La concentration de la poudre et le temps de macération ont été sujets à l'optimisation. Après filtration du mélange, une évaporation à sec a été réalisée afin d'obtenir les extraits secs à étudier.

3 . Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux

3.1 . Modèle statistique et facteurs optimisés

L'optimisation du taux de polyphénols extraits a été réalisée en modifiant les conditions du procédé d'extraction. Le temps de macération ainsi que la concentration (poudre végétale /solvant) ont été optimisés. Cette optimisation a été réalisée selon les données proposées par la matrice du plan composite centré (PCC) (Tableau 2).

Le PCC est un modèle quadratique qui ne nécessite pas un nombre excessif d'expériences. Il permet de déterminer à la fois le niveau optimal de chaque facteur et les interactions entre les facteurs à optimiser. Chaque facteur est testé à cinq niveaux : $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ et $+\alpha$ (Tableau 3). Pour un PCC à deux facteurs, α est égal à 1,41.

La réponse recherchée qui est la teneur en polyphénols est exprimée par l'équation polynomiale du second degré :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Où :

\hat{Y} : Teneur de l'extrait en polyphénols (la réponse)

X_i, X_j : Formes codées des variables indépendants

β_0 : Constante du modèle

β_i : Coefficient linéaire

β_{ii} : Coefficient quadratique

β_{ij} : Coefficient d'interaction

**Tableau 2** : Plan composite centré à deux facteurs

N° Expérience	Variable 1 (X ₁)	Variable 2 (X ₂)
1	-1,00000	-1,00000
2	1,00000	-1,00000
3	-1,00000	1,00000
4	1,00000	1,00000
5	-1,41421	0,00000
6	1,41421	0,00000
7	0,00000	-1,41421
8	0,00000	1,41421
9	0,00000	0,00000
10	0,00000	0,00000
11	0,00000	0,00000
12	0,00000	0,00000
13	0,00000	0,00000

Les variables ainsi que leurs niveaux testés sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Niveaux des variables étudiés

Facteur	Symbole	Niveau minimale (-1)	Niveau maximale (+1)
Concentration de poudre végétale (%)	X ₁	10	25
Temps (h)	X ₂	6	26



3.2 . Analyse statistique

La génération de la matrice d'expérience du plan composite centré, l'analyse statistique des résultats ainsi que le traçage du graphique de contour de la réponse étudiée ont été effectuées à l'aide du logiciel MINITAB version 17.

3.3 . Validation du modèle

Après interprétation des résultats du PCC, un test de confirmation et de validation du modèle est nécessaire pour confirmer les informations obtenues.

Ce test consiste à vérifier si les valeurs des facteurs choisies comme optima induisent la réponse maximale proposée par le PCC, ceci est dû en comparant le résultat de la réponse observée avec la réponse prédite par le plan.

4 . Dosage des polyphenols totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été déterminé par la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965) en utilisant la réaction de Folin-Ciocalteu.

Pour ce faire, 0,2 ml de l'extrait à étudier est ajouté à 0,8 ml de NaCO_3 (75 mg/ml dans de l'eau distillée), puis 1 ml de la solution de Folin-Ciocalteu (diluée au dixième dans de l'eau distillée) est ajouté. Après incubation de deux heures à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm par rapport à un échantillon blanc sans extrait.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire :

$$(y = ax + b).$$

Celle ci est construite avec des concentrations connues d'acide gallique (0- 100 $\mu\text{g/ml}$).

Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EqAG/mg}$) (Yakhlef *et al.*, 2011).

5 . Tests phytochimiques

1. **Recherche des polyphénols** : Un extrait méthanolique est préparé en mélangeant 20g de poudre végétale avec 500ml d'éthanol (80%), puis à le chauffer au bain Marie à 60° pendant 10 minutes, puis à le filtrer à chaud.

Dans une deuxième étape, quelques gouttes de FeCl_3 (2%) sont mélangées avec 2 ml d'extrait éthanolique. Un précipité noir verdâtre indique la présence de polyphénols (Koffi *et al.*, 2009).

2. **Recherche des stérols** : Mélanger 5 ml d'extrait éthanolique avec 5 ml d'anhydride acétique et 5 ml de chloroforme, puis, ajouter 1 ml d' H_2SO_4 concentré sans agiter et laisser reposer 20 minutes. Un anneau rouge-brun et une teinte violette indiquent la présence de stérols (Trease et Evans, 1987).
3. **Recherche des alcaloïdes** : Mélanger 0,2 g de poudre végétale avec 10 ml d' H_2SO_4 (10%), agiter, filtrer, puis ajouter quelques gouttes du réactif de Dragendorff. Un précipité rouge-orange indique la présence d'alcaloïdes (Vercauteren *et al.*, 2020).
4. **Recherche des mucilages** : Mélanger 1 ml d'extrait aqueux (10%) avec 5 ml d'éthanol absolu et agiter pendant 15 minutes. Un précipité floconneux indique la présence de mucilages (Mahamane, 2018).
5. **Recherche des coumarines** : Mélanger la poudre végétale avec deux volumes d'éthanol, laisser reposer 2 à 3 heures, filtrer, puis ajouter 5 ml de KOH (10%) et 5 ml de HCl (10%) au filtrat. Un précipité brun révèle la présence de coumarines (Trease et Evans, 1987).
6. **Recherche des tanins** : Mélanger 1 ml d'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée, ajouter 2 à 3 gouttes de FeCl_3 (1%). Une couleur verte ou bleu-vert indique la présence de tanins, avec des variations spécifiques pour les tanins galliques et catéchiques (Trease *et al.*, 1987, Douhou *et al.*, 2003).

6 . Evaluation de l'activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé des feuilles de cyprès a été rigoureusement testé contre quatre pathogènes bactériens couramment rencontrés : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour évaluer l'efficacité antibactérienne de l'extrait.

Avant d'entamer le travail, les disques, les milieux de culture, l'eau physiologique, et les tubes Eppendorf, ont été stérilisés à l'autoclave.

L'extrait a été préparé à des concentrations de 100 mg/ml et 50 mg/ml, dilué dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Avant de procéder aux tests, chaque souche bactérienne a été cultivée pendant 24 heures dans un bouillon nutritif, garantissant ainsi une croissance optimale des bactéries. Les suspensions microbiennes ont ensuite été standardisées à une densité de 0,5 McFarland, afin de s'assurer que la concentration bactérienne était uniforme pour tous les tests.

Pour l'application de la méthode de diffusion sur disque, 100 µL de chaque suspension bactérienne ont été uniformément étalés par écouvillonnage en stries serrées sur la surface de boîtes de Pétri contenant de l'agar MH (Mueller-Hinton), un milieu nutritif couramment utilisé pour les tests de sensibilité aux antibiotiques. Des disques de papier filtre Whatman, imprégnés avec 30 µL de l'extrait de cyprès à différentes concentrations, ont été placés sur les surfaces de l'agar inoculé.

Afin de valider l'expérience et d'établir un contrôle, un disque imprégné uniquement de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Cela a permis de vérifier que toute inhibition de croissance bactérienne observée était due à l'extrait et non à l'effet du solvant DMSO.

Les boîtes d'agar préparées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, une température optimale pour la croissance des bactéries testées. Après cette période d'incubation, la sensibilité des souches bactériennes à l'extrait optimisé a été déterminée en mesurant les zones d'inhibition autour des disques. Ces zones d'inhibition, qui apparaissent comme des cercles clairs autour des disques, indiquent l'absence de croissance bactérienne et donc l'efficacité de l'extrait étudié.

Les résultats obtenus ont été soigneusement enregistrés et les niveaux de sensibilité des différentes souches bactériennes ont été résumés dans un tableau (voir ci-dessous). Ce tableau présente les diamètres des zones d'inhibition pour chaque concentration d'extrait, permettant une comparaison directe de l'efficacité antibactérienne de l'extrait de cyprès contre chaque pathogène testé. Ces données fournissent des informations précieuses pour l'évaluation de l'utilisation potentielle de l'extrait de cyprès comme agent antibactérien naturel.

Tableau 4 : Niveaux de sensibilité des souches en fonction des diamètres des zones d'inhibition



Diamètre (mm)	Sensibilité
≤ 8	Nulle
9-14	Sensible
15-19	Très sensible
> 20	Extrêmement sensible

RESULTATS & DISCUSSION



1 . Résultats et Discussion

1.1 . Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols

L'analyse des résultats obtenus après dosage de la teneur en polyphénols totaux des treize extraits proposés par le PCC a donné les résultats affichés dans le tableau 05.

La détermination des teneurs en polyphénols a été réalisée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage, exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (Annexe 01)

Tableau 5 : Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles du cyprès par le PCC

N° d'essai	Concentration poudre %	Temps	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)
1	10,000	6,0000	152,83
2	25,000	6,0000	125,33
3	25,000	26,0000	111,16
4	10,000	26,0000	120,33
5	6,8934	16,0000	133,66
6	28,1066	16,0000	121,16
7	17,5000	1,8579	143,66
8	17,5000	30,1421	110,33
9	17,5000	16,0000	147,33
10	17,5000	16,0000	148,33
11	17,5000	16,0000	141,16
12	17,5000	16,0000	147,83
13	17,5000	16,0000	149,50



D'après les résultats, la teneur en polyphénols totaux observée varie entre 110,33 et 152,83 mg EAG/g. Cette variation suggère une influence significative des variables choisies "concentration" et "temps" sur le rendement d'extraction des polyphénols.

Ainsi, le plan central composite (PCC) s'avère particulièrement utile, car il permet de tester différents niveaux de ces facteurs ainsi que leurs interactions, afin de maximiser la réponse. En effet, l'efficacité d'extraction des composés phénoliques à partir des matières végétales est influencée par plusieurs paramètres, tels que la température, la durée d'extraction (**Ben Amor, 2008**) et la nature du solvant (**Rostango, 2013**).

1.2 . Validité du modèle

Afin de vérifier la validité du modèle mathématique, quelques conditions doivent être vérifiées :

- Le coefficient de corrélation (R^2) de 98,43% montre une très bonne adéquation et une proximité entre les valeurs prédites et expérimentales (**Boateng, 2023**), il indique que 98,43% de la variance des données est expliquée par le modèle, et que seul 1,57% ne sont pas expliqués par le modèle, ceux-ci sont probablement dû aux erreurs de manipulation.
- Le R carré ajusté (97,30%) et le R carré prédictif (97,51%) sont également très élevés, confirmant la fiabilité et la robustesse du modèle (**Chan et al., 2009**).
 - Le modèle global est très significatif avec une valeur de p de 0,000, indiquant que les variables explicatives (concentration, temps et leurs interactions) expliquent de manière significative la variation de la teneur en polyphénols.
 - La valeur de l'erreur standard (S) est 2,52, ce qui est relativement faible, indiquant que les prédictions du modèle sont précises.

1.3 . Interprétation des Coefficients

- La constante de l'équation de régression est de 147,00, avec une très haute valeur de T et une valeur de p significative ($p < 0,05$).



- Le coefficient du concentration (poudre/méthanol) est de -4,501, ce qui signifie qu'une augmentation du ratio au-delà de la valeur précisée par le modèle entraîne une diminution de la variable dépendante.

La valeur de T est élevée (en valeur absolue) et la valeur de p est significative, indiquant que cet effet est statistiquement significatif.

De même, **Hossain et al. (2012)** a démontré que la variation du concentration (matière sèche/solvant) influence le taux d'extraction des polyphénols totaux et que leurs teneurs augmentent avec l'augmentation du volume de solvant.

Tableau 6 : Coefficients de régression estimés

Terme	Coeff	Coeff T	Valeur de T	Valeur de p	FIV
Constante	147,00	1,13	130,13	0,000	-
Concentration	-4,501	0,893	-5,04	0,001	1,00
Temps	-11,726	0,893	-13,13	0,000	1,00
Concentration²	-9,741	0,958	-10,17	0,000	1,02
Temps²	-9,948	0,958	-10,39	0,000	1,00
Concentration*Temps	9,17	1,26	7,26	0,000	1,00

- Le coefficient du temps est de -11,726, ce qui indique qu'une augmentation du temps réduit la variable dépendante. Cette relation est hautement significative statistiquement. Le temps d'extraction est un facteur important dans l'extraction des composés phénoliques, car des périodes prolongées peuvent améliorer les rendements d'extraction, mais des périodes excessives peuvent entraîner des changements indésirables dans le composé extrait (**Tiwari, 2015**).

Selon nos résultats, à partir du seuil défini par le PCC, chaque minute supplémentaire de macération dans le méthanol induit une baisse de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait obtenu.

- Le terme quadratique de la concentration a un coefficient de -9,741, suggérant un effet non linéaire de la concentration sur la variable dépendante. La significativité statistique de ce coefficient est élevée.
- Le terme quadratique du temps a un coefficient de -9,948, suggérant un effet non linéaire du temps sur la variable dépendante. Cette relation est également très significative.
- L'interaction entre le facteur concentration et le temps a un coefficient de 9,17, ce qui indique que l'effet de la concentration dépend du temps et vice versa. Cette interaction est significative statistiquement.

En général, tous les termes du modèle (constante, facteur concentration de la poudre, facteur temps, termes quadratiques et interaction) sont statistiquement significatifs ($p < 0,05$). Les valeurs de T élevées et les faibles valeurs de p indiquent que les coefficients sont hautement significatifs.

Tableau 7 : Analyse de la variance (ANOVA)

Source	DL	SomCar	CM ajust	Valeur <i>F</i>	Valeur de <i>p</i>
Modèle	5	2791,08	558,22	87,50	0,000
- Linéaires	2	1262,01	631,00	98,91	0,000
- Concentration	1	162,07	162,07	25,40	0,001
- Temps	1	1099,94	1099,94	172,41	0,000
- Carré	2	1192,90	596,45	93,49	0,000
- Concentration*	1	660,02	660,02	103,46	0,000
Concentration					
- Temps*Temps	1	688,44	688,44	107,91	0,000
- Interaction à 2 facteurs	1	336,17	336,17	52,69	0,000
- Concentration*Temps	1	336,17	336,17	52,69	0,000
Erreur	7	44,66	6,38	-	-
- Inadéquation de l'ajustement	3	0,17	0,06	0,01	0,999
- Erreur pure	4	44,49	11,12	-	-
Total	12	2835,74	-	-	-



- La somme des carrés de l'erreur est relativement faible (44,66), ce qui indique que la variabilité non expliquée par le modèle est faible.
- L'inadéquation de l'ajustement a une valeur de p très élevée (0,999), suggérant que le modèle est adéquat pour les données observées.
- L'erreur pure est relativement faible (44,49), confirmant la précision des mesures.

La figure ci-dessous présente le graphique de contour de l'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles du cyprès en fonction du temps et de la concentration de la poudre.

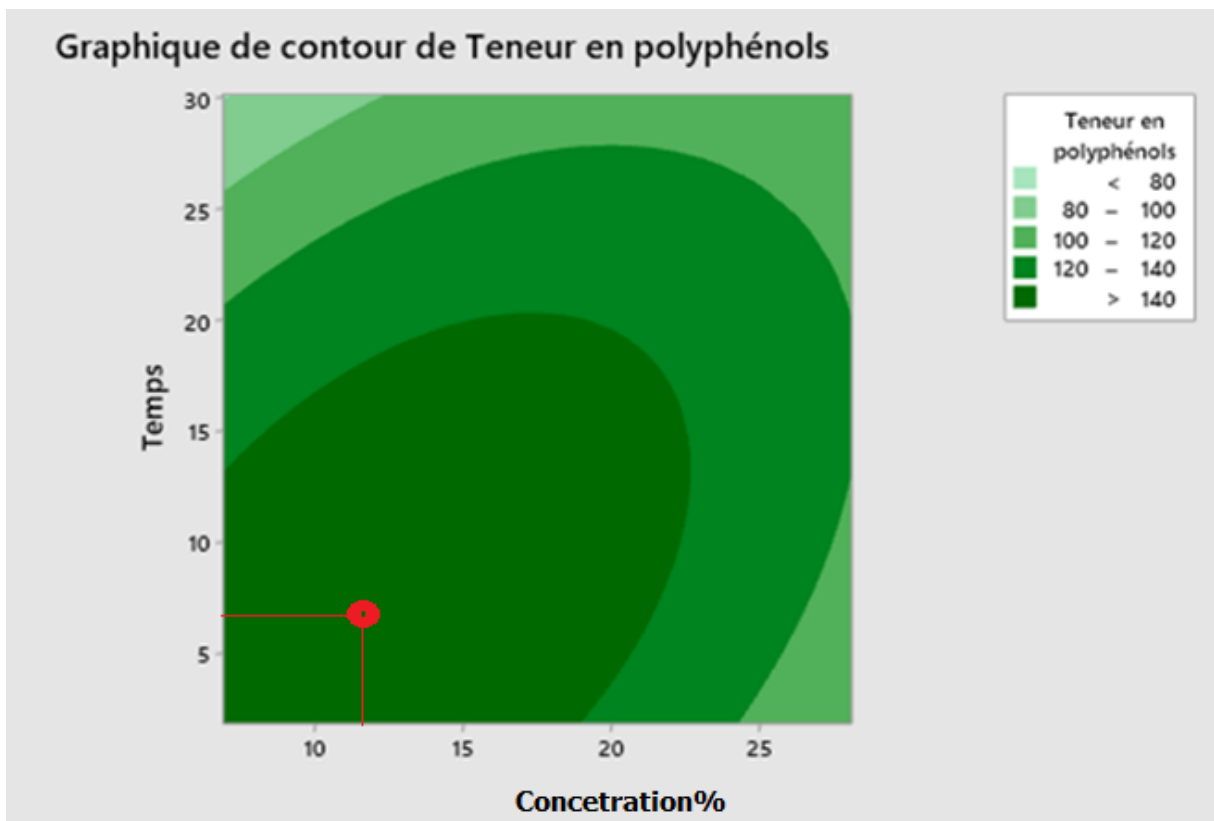


Figure 12 : Graphique de contour de l'extraction de polyphénols

La formule finale du modèle est

$$y=147,00-4,501 \cdot X_1-11,726 \cdot X_2-9,741 \cdot X_{12}-9,948 \cdot X_{22}+9,17 \cdot X_1 X_2$$

1.4 . Test de confirmation

Pour maximiser l'extraction en polyphénols totaux, le modèle, d'après l'analyse des résultats, prédit des valeurs optimales pour les deux variables étudiées, pour lesquelles la réponse recherchée atteindra un niveau optimal, les optima des deux variables ainsi que la valeur prédite de la réponse sont présentées dans la figure suivante :

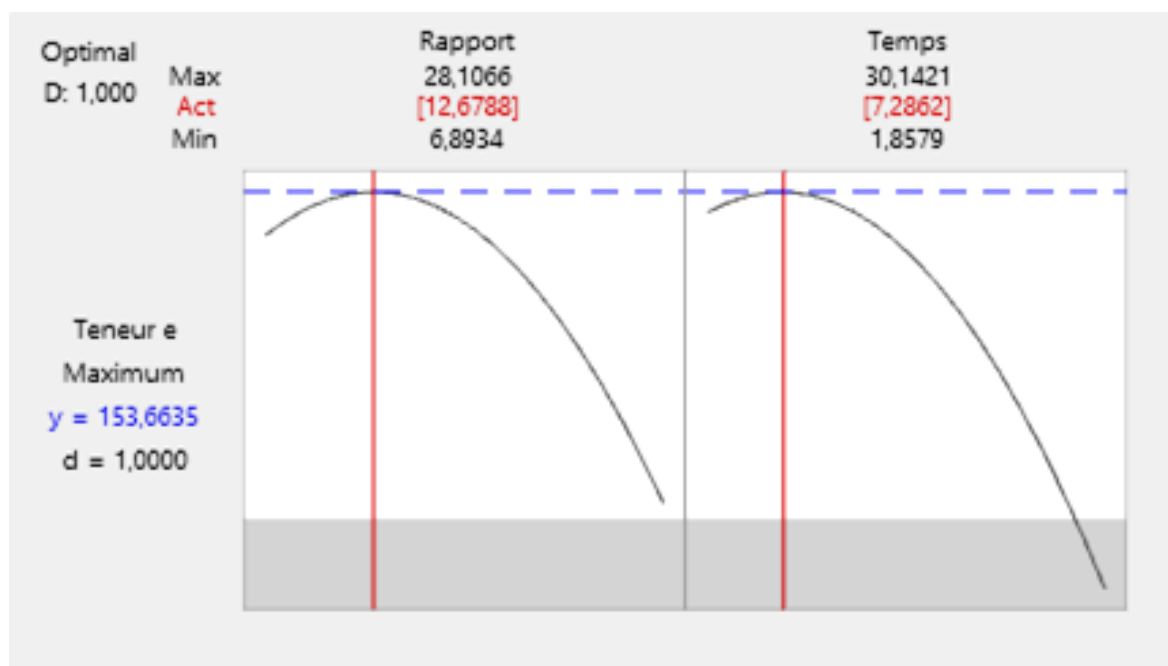


Figure 13 : Diagramme d'optimisation de l'extraction des polyphénols

Les résultats du test de confirmation, réalisé avec une concentration poudre méthanol de 12,67% pendant 7,28 heures, ont abouti à l'obtention d'un extrait dont la teneur en polyphénols totaux est de 152,00 mg EAG/g, ce qui est légèrement inférieur à la valeur prédite par le modèle (153,66 mg EAG/g). Cela confirme une fois de plus la validité du modèle.

Une étude réalisée par **Aloui et al. (2020)** sur l'extrait méthanolique des feuilles de *C. sempervirens* de la région de Tabarka en Tunisie, a rapporté une teneur en polyphénols totaux de 163,93 mg E AG/g MS. Notre résultat de 153,66 mg E AG/g MS, bien que légèrement inférieur, reste relativement élevé et montre que les feuilles de *C. sempervirens* de notre région d'étude sont riches en composés phénoliques.

Cette valeur est supérieure à celle rapportée par l'étude **d'Anka et al. (2020)**, où la teneur des extraits éthanolique des feuilles a été trouvée à $77,39 \pm 1,17$ mg E AG/g MS. Cette variation peut être expliquée par la nature du solvant (**Rostingo, 2013**).



2 Résultats du screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques réalisées sur l'extrait optimisé des feuilles de *C. sempervirens* sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8 : les résultats du criblage phytochimique de l'extrait optimisé

Composé	Résultat	Observation
Polyphénols	+++	Apparition d'une couleur noir verdâtre
Alcaloïdes	+	Apparition d'un précipité orange
Tanins	++	Apparition d'une couleur bleu noir
Stérols	-	Absence d'un anneau rouge-brun
Coumarines	+	Apparition d'une précipitation brune
Mucilages	+	Apparition d'un précipité floconneux

(+++): Une forte présence.

(++): Une présence moyenne.

(-): Une absence.

Les résultats de notre étude montrent la présence de polyphénols, d'alcaloïdes, de mucilages, de coumarines et de tanins. Cependant, les stérols étaient absents.

La présence abondante de polyphénols dans notre plante a été rapportée par plusieurs travaux (**Ebru., 2023 ; Alouiet al., 2020**). Les coumarines et les tanins galliques sont fortement observés lorsque l'extraction au chloroforme est utilisée. **Sabanne et Khaldi (2019)**, ainsi qu'**Aliouat et Boudaoud (2018)**, montrent l'existence de coumarines et de tanins galliques dans les feuilles de *Cupressus sempervirens L.* dans leurs recherches. Nos expériences ont également indiqué la présence d'alcaloïdes, ce qui oppose les résultats de **Rahmani (2020)**, qui a noté l'absence de ce métabolite dans les extraits de la plante étudiée.



3 . Pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait optimisé contre sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 ; Diamètres d'inhibition (mm) des souches étudiées sous l'action de l'extrait optimisé.

Souche bactérienne	Extrait optimisé		Témoin (DMSO)
	100 mg/ml	50 mg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,25± 0,25	7,00± 1,00	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7,00±0,50	6,00±0,00	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	14,25±0,25	12±1,00	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8,00±0,00	6,5±0,50	0

Les résultats de notre étude montrent une efficacité variable de l'extrait méthanolique contre différentes souches bactériennes (Annexe 02).

- L'effet antibactérien le plus significatif a été observé contre *Klebsiella pneumoniae* (G-), avec des zones d'inhibition de 14 mm pour l'extrait concentré et de 12 mm pour l'extrait dilué. Ces résultats sont très proches de ceux de **Chaudhary et al. (2012)**, qui ont rapporté un diamètre d'inhibition de 14,77 mm pour la même souche pour un extrait méthanolique de 1mg/ml.
- Pour *Escherichia coli* (G-), notre étude a montré une inhibition de 9 mm avec l'extrait concentré et de 7 mm avec l'extrait dilué, tandis qu'**Ankaa et al. (2020)** ont noté un diamètre d'inhibition de 8 mm.
- Concernant *Staphylococcus aureus* (G+), nous avons observé des diamètres d'inhibition de 8 mm (extrait concentré) et de 6-7 mm (extrait dilué), tandis que **Ankaa et al. (2020)** et **Chaudhary et al. (2012)** ont rapporté des inhibitions plus élevées, de 12 mm et de 12,25 mm respectivement.

- Enfin, pour *Pseudomonas aeruginosa*(G-), notre étude a montré des zones d'inhibition de 7 mm (extrait concentré) et de 6-7 mm (extrait dilué), ce qui est en accord avec les résultats de **Ankaa et al. (2020)**, qui ont observé une inhibition de 7 mm. En revanche, **Chaudhary et al. (2012)** ont rapporté une inhibition beaucoup plus importante de 12,5 mm.



Conclusion et perspectives

Cette étude a permis d'optimiser les conditions d'extraction des polyphénols à partir des feuilles de cyprès (*Cupressus sempervirens L.*) en utilisant un plan composite centré.

Les paramètres optimaux, comprenant une concentration de poudre végétale de 12,67% et un temps de macération de 7,28 heures, ont permis d'atteindre une teneur élevée en polyphénols de 152 mg EAG/g. Le coefficient de corrélation (R^2) de 98,43% indique une excellente adéquation. De plus, le R carré ajusté (97,30%) et le R carré prédictif (97,51%) sont également très élevés, confirmant la fiabilité du modèle.

Les tests phytochimiques ont confirmé la présence de divers composés bioactifs, notamment les polyphénols, les alcaloïdes, les mucilages, les coumarines et les tanins, avec une absence notable de stérols. L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique optimisé a révélé une efficacité significative contre les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, bien que l'effet ait été moins prononcé contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats soulignent le potentiel de l'extrait de feuilles de cyprès comme source de composés bioactifs aux applications thérapeutiques possibles, en particulier en tant qu'agents antibactériens. De plus, cette étude démontre que l'utilisation du plan composite centré pour optimiser les conditions d'extraction des polyphénols est efficace, produisant des résultats précis et un meilleur rendement d'extraction.

Plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées :

- Examiner d'autres paramètres et solvants d'extraction : Étudier l'influence de divers autres facteurs et solvants d'extraction pour comparer les rendements en polyphénols et autres composés bioactifs.
- Réaliser des tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* : Pour garantir la sécurité de l'utilisation de ces extraits dans des applications thérapeutiques.
- Explorer des applications potentielles dans divers domaines : Investiguer l'utilisation potentielle des extraits de cyprès dans des secteurs tels que la cosmétique et l'agroalimentaire.



ANNEXE 1

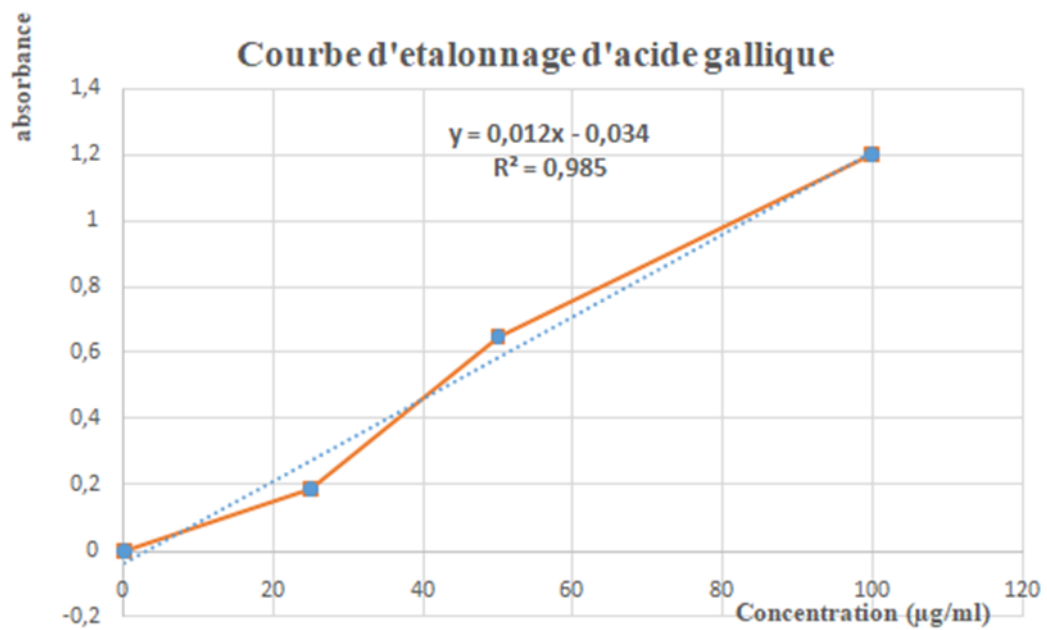
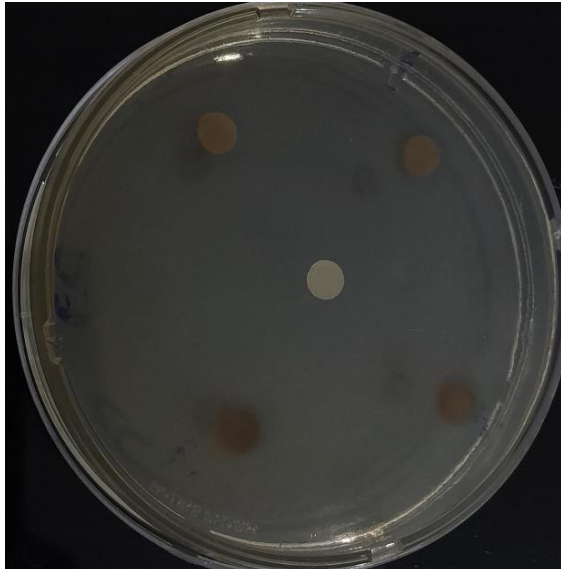


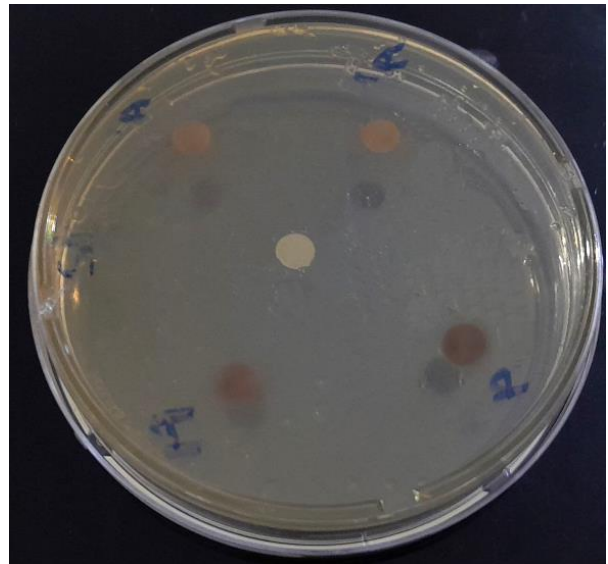
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols



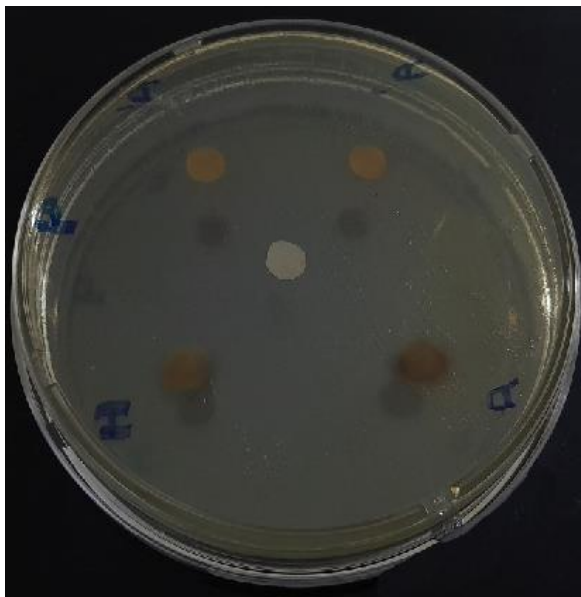
ANNEXE 2



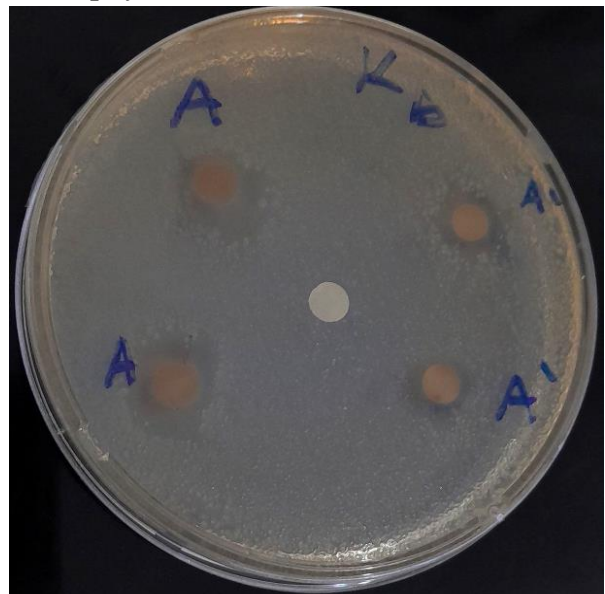
Escherichia coli ATCC 25922



Staphylococcus aureus ATCC 25923



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Figure 15 : Pouvoir antibactérien de l'extrait optimisé des feuilles de *C. sempervirens* sur quelques souches bactériennes (photos personnelles)



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. & Suleria, H. A. R. (2017).** Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689-1699.
- **Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006).** Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421.
- **Ali, Z. Y., Atia, H. A., & Ibrahim, N. H. (2010).** Possible hepatoprotective potential of *Cynarascolumus*, *Cupressus sempervirens* and *Eugenia jambolana* against paracetamol-induced liver injury: in-vitro and in-vivo evidence. *Nat. Sci*, 10, 75-86.
- **Aliouat, K., Boudaoud, N., (2018).** Polyphénols de quelques plantes médicinales de la famille thymelaeaceae et cypresseaceae et l'étude de leurs activité antioxydante. Mémoire de Master, Université Bouira 71p.
- **Aloui F., Nefzia., Jedidis, Selmi H., Hasnaoui F., Dallalis., Bouraoui H., Mouhbi R., Abbas C. (2020).** Phytochemical analysis and in vitro digestibility evaluation of leaf and cones parts of *Cupressus sempervirens* originating from Tunisia. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 71(2), 4311-4318 4311
- **Al-Snafi, A. E. (2016).** Medical importance of *Cupressus sempervirens*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(6), 66-76.
- **Altiok E., Baycin D., Bayraktar O., Ulku S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*. 62: 342–348.
- **Amara, Y. Boughérara, (2017).** Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cyprés Vert (*Cupressus Sempervirens* .L.), *Algerian Journal of Natural Products* 5 :2, pp 455-462.
- **Andrei.S. (2011).** Etude Visant L'optimisation De L'extraction Des Polyphénols À Partir De Pépins De Raisin .
- **Anka L., Rammal H., Kobeissi A. and Bou Saab H. (2020).** Chemical composition and biological potentials of Lebanese *Cupressus sempervirens* L. leaves' extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 14(6), pp. 292-299, June, 2020

- **Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F. & Omar, A. K. M. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- **Ballard, C. R., & Junior, M. R. M. (2019).** Health benefits of flavonoids. In *Bioactive compounds* (pp. 185-201). Woodhead Publishing.
- **Batiha, G. E. S., Teibo, J. O., Shaheen, H. M., Akinfe, O. A., Awad, A. A., Teibo, T. K. A., & Papadakis, M. (2023).** Bioactive compounds, pharmacological actions and pharmacokinetics of *Cupressus sempervirens*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3), 389-403.
- **Behl, T., Bungau, S., Kumar, K., Zengin, G., Khan, F., Kumar, & Mosteanu, D. E. (2020).** Pleotropic effects of polyphenols in cardiovascular system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110714.
- **Ben Amor, 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) (Doctoral dissertation, La Rochelle).
- **Ben Nouri, W. Dhifi, S. Bellili, H. Ghazghazi, Ch. Aouadhi, A. Chérif, M. Hammami, W. Mnif, (2015).** "Chemical Composition, Antioxidant Potential, and Antibacterial Activity of Essential Oil Cones of Tunisian *Cupressus sempervirens*", Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Chemistry*. p.1-8.
- **Boateng, I. D., Kuehnel, L., Daubert, C. R., Agliata, J., Zhang, W., Kumar, R., ... & Wan, C. (2023).** Updating the status quo on the extraction of bioactive compounds in agro-products using a two-pot multivariate design. A comprehensive review. *Food & Function*, 14(2), 569-601.
- **Boath, A. S., Stewart, D., & McDougall, G. J. (2012).** Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food chemistry*, 135(3), 929-936.
- **Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Doctoral dissertation, Université Mohamed

Khider Biskra).

- **Boucif, O. E. W., Benhammou, B. N., Rached, K. M., & Rabah, R. A. H. A. B. (2023).** Valorisation Phytochimique De *Cupressus Sempervirens* L. De La Foret De Terni (Monts De Tlemcen).
- **Boudy, P. (1950).** Économie forestière nord-africaine.
- **Boukhris M, Regane G, Yangui T, Sayadi S and Bouaziz M. (2012).** Chemical composition and biological potential of essential oil from Tunisian *Cupressus sempervirens* L. Journal of Arid Land Studies; 22(1): 329-332.
- **Bouyahyaoui, A. (2017).** Contribution à la valorisation des substances naturelles: Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien (Doctoral dissertation, Thèse Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences biologique. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 89p).
- **Camus, A. (1914).** Les cyprès (genre *Cupressus*): Monographie, systématique, anatomie, culture, principaux usages (Vol. 2). P. Lechevalier.
- **Caudullo, G., & De Rigo, D. (2016).** *Cupressus sempervirens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species. Publications Office of the European Union, Luxembourg. pp. e015be7.
- **Chan, S., Lee, C., Yap, C., Aida, W. W., & Ho, C. (2009).** Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limaupurut (*Citrus hystrix*) peels. International Food Research Journal, 16(2), 203-213.
- **Chaudhary H.J, Shahid W., Bano A., Ullah F., Munis F. ,FahadS.and Ahmad I. (2012).** In vitro analysis of *Cupressus sempervirens* L. plant extractsantibacterialactivity. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(2), pp. 273-276, 16
- **Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V., & Chemat, F. (2004).** Comparison of conventional and ultrasound- assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. Flavour and Fragrance Journal, 19(3), 188-195.
- **Chéraif, I., Jannet, H. B., Hammami, M., & Mighri, Z. (2006).** Composition Chimique De

L'huile Essentielle Des Cones Du *Cupressus Sempervirens* L. Poussant En Tunisie. Journal-SocieteAlgerienne De Chimie, 16(1), 91.

- **Chou, Y. C., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2018).** Stilbenes: chemistry and molecular mechanisms of anti-obesity. *Current Pharmacology Reports*, 4, 202-209.
- **Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016).** Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142.
- **De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010).** Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- **Del Favero, R. (2010).** I boschidelleregion centralid'Italia. Tipologia, funzionamento, selvicoltura.
- **El-Sheikh, T. M., Hassan, M. I., Moselhy, W. A., Amer, M. S., & Shehata, A. Z. (2011).** Evaluation of the biological activity of some *Cupressus sempervirens* (*Cupressaceae*) extracts against the mosquito vector *Culex pipiens* L. (*Diptera: Culicidae*). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology*, 4(1), 33-48.
- **Farjon, A. (2010).** *A Handbook of the World's Conifers* (2 vols.) (Vol. 1). Brill.
- **Flemming, T. (1998).** *PDR for herbal medicines*: Medical Economic Company.
- **Frezza, C., De Vita, D., Sciubba, F., Toniolo, C., Tomassini, L., Nicoletti, M. & Foddai, S. (2022).** There is not only *Cupressus sempervirens* L.: a review on the phytochemistry and bioactivities of the other *Cupressus* L. species. *Applied Sciences*, 12(14), 7353
- **Gopalakrishnan, A.; Tony Kong, A.-N.** Anticarcinogenesis by Dietary Phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in Normal Cells and Cytotoxicity by Modulation of Transcription Factors NF- κ B and AP-1 in Abnormal Cancer Cells. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 1257–1270.
- **Hansen J, Møller I (1975)** . Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Anal Biochem* 68:87–94.
- **Hashemi, Z., Ebrahimzadeh, M. A., & Khalili, M. (2019).** Sun protection factor, total

phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of medicinal plants from Iran. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(7), 1443-1448.

- **Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C., Martin- Diana, A.B., Barry-Ryan, C.,(2012).** Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L) using response surface methodology. *Ultrason Sonochem*; 19, 582-590
- **Intini, M., & Della Rocca, G. (2004).** Il cipressocomune (*Cupressus sempervirens* L.):caratterishebotaniche, distribuzione, ecologia. Centro PromozionePubblicità, Firenze.
- **Iriondo-DeHond, M., Miguel, E., & Del Castillo, M. D. (2018).** Food byproducts as sustainable ingredients for innovative and healthy dairy foods. *Nutrients*, 10(10), 1358.
- **Ismail, A., Lamia, H., Mohsen, H., Samia, G., & Bassem, J. (2013).** Chemical composition, bio-herbicial and antifungal activities of essential oils isolated from Tunisian common cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *J. Med. Plants Res*, 7(16), 1070-1080.
- **IUCN : Centre for Mediterranean Cooperation (2005):** A guide to medicinal plants in north Africa .*C.sempervirens*.106.*Journal of Nutrition* 2010, 140, 1764–1768.
- **Kakhlon O., Cabantchik Z.I. (2002).** The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1. *Free Radical Biology&Medicine*. 33(8): 1037–1046.
- **Karin, M., &Greten, F. R. (2005).** NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews immunology*, 5(10), 749-759.
- **Koffi N., Beugré K., Guédé N., Dossahoua T. et Laurent A. (2009)** . Screening phytochimique de quelques plantes ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Cote d'Ivoire). *Sciences & Nature*.6 (2): 1-15.
- **Kassem, F. F., Harraz, F. M., El- Sebakhy, N. A., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., &Abou- Shleib, H. (1991).** Composition of the essential oil of Egyptian *Cupressus sempervirens* L. cones. *Flavour and fragrance journal*, 6(3), 205-207.
- **Laouini, S. E. (2014).** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de Phoenix dactylifera L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) (Doctoral

dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).

- **Mahamane H M. (2018).** Contribution à l'étude de l'activité pharmacologique de *Terminalia marcoptera* (Combretaceae) dans le but de l'élaboration d'un médicament traditionnel amélioré au Mali. Thèse de doctorat. Université de Toulouse 3.
- **Mahmood Z, Ahmed I, Saeed M and Sheikh MA (2013).** Investigation of physico-chemical composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from lignin containing *Cupressus sempervirens*. *BioResources*;8(2): 1625-1633.
- **Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F., Menghini, A., & Fasulo, M. P. (1987).** Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy research*, 1(1), 28-31.
- **McDougall, G.J.; Shpiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. (2005) .** Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2760–2766.
- **Moussa, A. M., Emam, A. M., Diab, Y. M., Mahmoud, M. E., & Mahmoud, A. S. (2011).** Evaluation of antioxidant potential of 124 Egyptian plants with emphasis on the action of *Punicagranatum* leaf extract on rats. *International food research journal*, 18(2).
- **Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018).** Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330.
- **Nehdi, I. A. (2013).** *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* seed oil: Chemical composition, physicochemical characteristics, and utilizations. *Industrial Crops and Products*, 41, 381-385.
- **Nichane, M. (2016).** Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen (Doctoral dissertation).
- **Nkhili, E. Z. (2009).** Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Avignon.

- **Penchev, P. I. (2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT; Académie bulgare des sciences. Institut de géniechimique (Sofia, Bulgarie)).
- **Popa, V. I., Dumitru, M., Volf, I., & Anghel, N. (2008).** Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial crops and products*, 27(2), 144-149.
- **Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R. (2021).** Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ.*, 6(1), 293-301.
- **Rahmani, Z. (2022).** Contribution à l'étude phytochimique, Electrochimique et biologique des extraits de *Cupressus sempervirens* (L) (Doctoral dissertation, Université KasdiMerbah Ouargla).
- **Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020).** Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, 109298.
- **Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017).** Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1700-1741.
- **Rathore, S. K., Bhatt, K., Dhyani, S., & Jain, A. (2012).** Preliminary phytochemical screening of medicinal plant *Ziziphus mauritiana* Lam. fruits. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(3), 160-162.
- **Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011).** Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.
- **Rawat, P., Khan, M. F., Kumar, M., Tamarkar, A. K., Srivastava, A. K., Arya, K. R., & Maurya, R. (2010).** Constituents from fruits of *Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia*, 81(3), 162-166.
- **Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014).** Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement*, 58, 249-255.

- **Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011).** Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(5-6), 410-424.
- **Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2019).** Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food bioscience*, 28, 66-73.
- **Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015).** High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 885-894.
- **Rostagno, M. A., & Prado, J. M. (Eds.). (2013).** Natural product extraction: principles and applications (Vol. 21). Royal Society of Chemistry.
- **Sabbane, B., Khaldi, K. (2019).** Quelques composés secondaires isolés à partir des plantes de la famille de cupressacée (*Cupressus sempervirens*, *Juniperus oxycedrus* et *Juniperus communis*): extraction, caractérisation et activité antibactérienne. Mémoire de Master univ de Bouira 98 p.
- **Sanches Silva, A., Reboredo-Rodríguez, P., Sanchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Barreca, D., Pittala, V., ... & Nabavi, S. M. (2020).** Evaluation of the status quo of polyphenols analysis: Part II—Analysis methods and food processing effects. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(6), 3219-3240.
- **Santini, A., & Donardo, V. (2000).** Genetic variability of the 'bark canker resistance' character in several natural provenances of *Cupressus sempervirens*. *Forest Pathology*, 30(2), 87-96.
- **Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen & Al-Hiary, M. (2019).** Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400.
- **Singleton, V. and Rossi, J. (1965)** Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- **Stookey, L. L. (1970).** Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical*

chemistry, 42(7), 779-781.

- **Suhaj, M. (2006).** Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 531-537.
- **Tian, B., Qiao, Y. Y., Tian, Y. Y., Xie, K. C., & Li, D. W. (2016).** Effect of heat reflux extraction on the structure and composition of a high-volatile bituminous coal. *Applied Thermal Engineering*, 109, 560-568.
- **Tiwari, B.K(2015).**, Ultrasound: a clean, green extraction technology, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 71 100–109.
- **Trease, E., & WC, E. (1987).** *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. Karumi Y, Onyeyili PA and Ogugbuaja, 2004, 179-182.
- **Torreggiani, Armida, et al. (2005)** . "Copper (II)–Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties." *Journal of Molecular structure* 744: 759-766.
- **Tull, A.J.; Cash, C.K.; Johnson, W.D.; Champagne, C.M.; Cefalu, W.T.** Bioactives in Blueberries Improve Insulin Sensitivity in Obese, Insulin-Resistant Men and Women.
- **Usher, G. (1974).** *A dictionary of plants used by man* (p. 619pp).
- **Vercauteren J., Crauste C., Vigor C. (2020)** . Polycopié de travaux pratiques voies d'accès aux substances actives médicamenteuses. Laboratoire de pharmacognosie. Université Montpellier.
- **Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2020).** Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(11), 1826-1841.
- **Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011).** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes

utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218

- **Zhang, J., Rahman, A. A., Jain, S., Jacob, M. R., Khan, S. I., Tekwani, B. L., & Ilias, M. (2012).** Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from *Cupressus sempervirens*. *Research and reports in medicinal chemistry*, 1-6.
- **Zhang, M., Zeng, G., Pan, Y., & Qi, N. (2018).** Difference research of pectins extracted from tobacco waste by heat reflux extraction and microwave-assisted extraction. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 359-363.
- **Zhou Y, Xu XY, Gan RY et al (2019)** Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant polyphenols from the seed coats of red sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.). *Antioxidants* 8:1–13.
- **Živković, J., Šavikin, K., Janković, T., Čujić, N., & Menković, N. (2018).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 194, 40-47.